

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Agrárias – ICA
Programa de Pós-graduação em Alimentos e Saúde

André Tiago Malveira

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE DESNUTRIÇÃO EM CAMUNDONGOS:
AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PERCENTUAL DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR
E DIFERENTES DIETAS**

Montes Claros

2023

André Tiago Malveira

**DESENVOLVIMENTO DE MODELO DE DESNUTRIÇÃO EM CAMUNDONGOS:
AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO PERCENTUAL DE RESTRIÇÃO ALIMENTAR
E DIFERENTES DIETAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Saúde (PPGAS) da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Alimentos e Saúde.

Área de concentração: Alimentos e Saúde

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Montes Claros

2023

Malveira, André Tiago.

M262d
2023

Desenvolvimento de modelo de desnutrição em camundongos [manuscrito]: avaliação comparativa do percentual de restrição alimentar e de diferentes dietas/ André Tiago Malveira. Montes Claros, 2023.
59 f.:il.

Dissertação (mestrado) - Área de concentração em Alimentos e Saúde. Universidade Federal de Minas Gerais / Instituto de Ciências Agrárias.

Orientador: Sérgio Henrique Sousa Santos

Banca examinadora: João Marcus de Oliveira Andrade, Caroline Honaiser Lescano.

Inclui referências: f. 48-50; 53-58

1. Desnutrição -- Teses. 2. Modelos animais em pesquisa -- Teses. 3. Tecido Adiposo -- Teses. I. Santos, Sérgio Henrique Sousa. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 613.2



Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Agrárias
Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ao 21 dias do mês de dezembro de 2023, às 8:00 horas, sob a Presidência do Prof. Sérgio Henrique Sousa Santos, Dr. Sc. (Orientador – UFMG/ICA) e com a participação dos Professores João Marcus de Oliveira Andrade, Dr. Sc. (Unimontes) e Caroline Honaiser Lescano, Dr. Sc. (Universidade Federal do Amazonas), reuniu-se, por videoconferência, a Banca de defesa de dissertação do Discente **André Tiago Malveira**, aluno do Curso de Mestrado em Alimentos e Saúde. O resultado da defesa de dissertação intitulada: “**Desenvolvimento de modelo de desnutrição em camundongos: avaliação comparativa do percentual de restrição alimentar e de diferentes dietas**”, sendo o aluno considerado **APROVADO**. E, para constar, eu, Professor Sérgio Henrique Sousa Santos, Presidente da Banca, lavrei a presente ata que depois de lida e aprovada, será assinada por mim e pelos demais membros da Banca examinadora.

OBS.: O aluno somente receberá o título após cumprir as exigências onde a candidata deverá, após a aprovação de sua Dissertação ou Tese e da realização das modificações propostas pela banca examinadora, se houver, encaminhar à secretaria do Colegiado do Programa, com a anuência do orientador, no mínimo 1 (um) exemplar impresso e 1 (um) exemplar eletrônico da dissertação no prazo máximo de 30 (trinta) dias.

Montes Claros, 21 de dezembro de 2023.

Documento assinado digitalmente
gov.br JOÃO MARCUS OLIVEIRA ANDRADE
Data: 28/12/2023 18:13:52-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

João Marcus de Oliveira Andrade
Membro

Documento assinado digitalmente
gov.br CAROLINE HONAISSER LESCANO
Data: 28/12/2023 24:51:06-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Caroline Honaiser Lescano
Membro

Documento assinado digitalmente
gov.br SÉRGIO HENRIQUE SOUSA SANTOS
Data: 28/12/2023 12:13:48-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Sérgio Henrique Sousa Santos
Orientador

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

Reitora: Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pesquisa: Fernando Marcos Reis

Pró-reitor de Pós-graduação: Isabela Almeida Pordeus

CURSO DE MESTRADO EM ALIMENTOS E SAÚDE (CMAS)

Coordenador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos

Subcoordenador: Prof^a Dr. Igor Viana Brandi

*Dedico este trabalho a minha querida
mãe. Sua grande força foi a propulsão que
permitiu o meu avanço.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre estar ao meu lado, principalmente nos momentos que os caminhos se mostraram mais abruptos. Ele foi o responsável por me sustentar, me dar força e coragem para seguir adiante.

A minha mãe Mara Aparecida Malveira, mulher forte, professora, que desde criança me mostrou a importância dos estudos e sempre esteve comigo nos momentos mais importantes da minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos por ter conduzido o meu trabalho, ter acreditado em mim e pelas valiosas contribuições dadas durante todo o processo.

Aos amigos, pela amizade incondicional e apoio demonstrado ao longo de todo o período que me dediquei a este trabalho. Agradecer a leveza dos momentos proporcionados pelo Lucas e a importância da Ciméia para que eu iniciasse todo o processo. Vocês foram e são incríveis!

Agradecer ao Gustavo, que me apoiou e me deu forças para continuar a batalha.

Aos colegas de pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais e Universidade Estadual de Montes Claros, vocês foram fundamentais durante toda caminhada. Obrigado por todo suporte e conhecimento compartilhado. Em especial, gostaria de citar a importância dos ensinamentos e da minha admiração pelos colegas: Victor Hugo, Cristina, e Caroline. Não poderia deixar de mencionar minha parceira Sonielle, que junto comigo vivenciou todas as nuances deste trabalho. Gostaria de agradecer a Mirian por seu apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

Enfim, a todos os amigos, familiares, profissionais e professores que contribuíram, de alguma forma nesta caminhada, meus sinceros agradecimentos! Obrigado por tudo!

"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."

Guimarães Rosa

RESUMO

A desnutrição é uma patologia complexa, associada ao aumento do risco de mortalidade, susceptibilidade a doenças infecciosas e déficit do desenvolvimento cognitivo. É um problema de saúde pública mundial. Modelos experimentais tem sido desenvolvidos para a compreensão dos mecanismos envolvidos na patologia da desnutrição. Contudo, devido às limitações, não há um consenso na literatura sobre qual modelo murino produz efeitos que mimetizam as condições em humanos. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo validar um modelo murino de desnutrição, baseado na restrição alimentar, utilizando dois tipos de dieta, para caracterizar os seus efeitos na desnutrição. O estudo foi conduzido com cinquenta e seis camundongos *Swiss* (machos com oito semanas de idade) divididos em oito grupos (n=7 cada) e alimentados com as seguintes dietas experimentais por 10 semanas. Os grupos foram divididos em: Dieta Padrão (ST) *ad libitum*; ST 20% restrição alimentar; ST 40% restrição alimentar; ST60% restrição alimentar; Dieta AIN93-M *ad libitum*; AIN93-M 20% de restrição alimentar; AIN93-M 40% de restrição alimentar; AIN93-M 60% de restrição alimentar. Foram mensurados parâmetros corporais, bioquímicos e histológicos, além da avaliação dos efeitos das restrições com a dieta AIN93-M sobre genes relacionados ao estresse oxidativo como GPX1 e GPX4 no tecido epididimal em qRT-PCR. Diante dos resultados obtidos, conclui-se que as restrições alimentares de 20%, 40% e 60% foram capazes de reduzir o peso corporal quando comparadas aos seus controles, destacando-se a perda de peso acentuada em animais com restrições de 60%, em especial aqueles alimentados com AIN-93 M. Os protocolos de restrição de 40% e 60% foram capazes de diminuir a adiposidade diante dois tipos de dietas, assim como a área dos adipócitos e a camada de gordura do tecido adiposo epididimal, e novamente de forma significativa nos grupos com restrição alimentar de 60%. Neste grupo de restrição, alimentado com dieta AIN93-M, observou-se alterações físicas, como pele esbranquiçada e pelagem opaca, alimentação voraz e postura curvada. A dieta AIN93-M apresentou-se como a melhor dieta para a condução deste protocolo. Através deste modelo, foi possível obter redução do peso corporal dos animais, alterações bioquímicas, como no perfil lipídico (diminuição do HDL e triglicerídeos) e hipoalbuminemia, assim como alterações histológicas, no tecido adiposo epididimal. Foi observado a presença do aumento do estresse oxidativo neste grupo de restrição, através da avaliação do gene GPX4. Diante do exposto, a restrição alimentar de 60% com a dieta AIN93-M foi o melhor protocolo para indução da desnutrição.

Palavras-chave: Desnutrição. Modelo Experimental. Tecido Adiposo Epididimal. Restrição Alimentar.

ABSTRACT

Malnutrition is a complex pathology, associated with increased risk of mortality, susceptibility to infectious diseases and impaired cognitive development. It is a global public health problem. Experimental models have been developed to understand the mechanisms involved in the pathology of malnutrition. However, due to limitations, there is no consensus in the literature about which murine model produces effects that mimic conditions in humans. Given the above, the present study aimed to validate a murine model of malnutrition, based on dietary restriction, using two types of diet, to characterize its effects on malnutrition. The study was conducted with fifty-six Swiss mice (eight-week-old males) divided into eight groups (n=7 each) and fed the following experimental diets for 10 weeks. The groups were divided into: Standard Diet (ST) ad libitum; ST 20% dietary restriction; ST 40% dietary restriction; ST60% dietary restriction; AIN93-M diet ad libitum; AIN93-M 20% dietary restriction; AIN93-M 40% dietary restriction; AIN93-M 60% dietary restriction. Body, biochemical and histological parameters were measured, in addition to evaluating the effects of restrictions with the AIN93-M diet on genes related to oxidative stress such as GPX1 and GPX4 in epididymal tissue in qRT-PCR. Given the results obtained, it is concluded that dietary restrictions of 20%, 40% and 60% were able to reduce body weight when compared to their controls, highlighting the accentuated weight loss in animals with restrictions of 60%, especially those fed with AIN-93 M. The 40% and 60% restriction protocols were able to reduce adiposity in two types of diets, as well as the area of adipocytes and the fat layer of the epididymal tissue, and again of significantly in groups with 60% dietary restriction. In this restriction group, fed with the AIN93-M diet, physical changes were observed, such as whitish skin and dull coat, voracious eating and hunched posture. The AIN93-M diet proved to be the best diet for carrying out this protocol. Through this model, it was possible to obtain a reduction in the animals' body weight, biochemical changes, such as in the lipid profile (decrease in HDL and triglycerides) and hypoalbuminemia, as well as histological changes in the epididymal adipose tissue. The presence of increased oxidative stress was observed in this restriction group, through the evaluation of the GPX4 gene. Given the above, food restriction of 60% with the AIN93-M diet was the best protocol for inducing malnutrition.

Keywords: Malnutrition. Experimental Model. Epididymal Adipose Tissue. Food restriction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de pessoas subnutridas no mundo continuou a aumentar em 2020	19
Figura 2 - Desnutrição: Inflamação e estresse oxidativo	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da Dieta Purina Labina (Padrão)	27
Tabela 2 - Dieta AIN93-M : Diet American Institute of Nutrition-Modified	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AIN93-M – Dieta do American Institute of Nutrition para manutenção de roedores

COVID-19 – Doença do Coronavírus 2019

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

POF – Programa do Orçamento Familiar

UNICEF – Fundo das Nações Unidas para a Infância

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	A necessidade dos nutrientes	15
2.2	Desnutrição, conceitos, formas clínicas	16
2.3	A problemática social da Desnutrição	17
2.4	Epidemiologia da Desnutrição	18
2.5	Consequências da doença	20
2.6	Fisiopatologia da Desnutrição	21
2.7	Desnutrição: Inflamação e estresse oxidativo	23
2.8	Modelos Experimentais de animais sua importância e limitações: modelo murino de desnutrição	24
2.9	Dieta padrão comercial peletizada e Diet American Institute of Nutrition-Modified (AIN93-M)	26
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo geral	30
3.2	Objetivos específicos	30
4	PRODUTO TÉCNICO-CIENTÍFICO	31
5	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

A alimentação é considerada uma necessidade básica na vida do ser humano, pois carrega consigo nutrientes, que são substâncias químicas vitais, uma vez que o nosso corpo não consegue sintetizá-los em quantidades suficientes, tornando-se essenciais para o funcionamento adequado de diversos sistemas e órgãos. A falta de nutrientes ou a forma incorreta de obtenção, podem induzir um déficit nutricional ou estado de desnutrição, que caracteriza-se como uma condição patológica resultante da falta de energia, proteínas e/ou compostos em proporções variadas (LACERDA *et al.*, 2006).

A Desnutrição protéico-energética é o tipo de desnutrição mais prevalente no mundo. Ocorre principalmente a partir de um déficit à nutrientes e é dividida em três formas: kwashiorkor, marasmo e um estágio intermediário denominado kwashiorkor marasmático. Geralmente descreve o kwashiorkor como desnutrição edematosa que gera características clínicas como alterações capilares, lesões cutâneas, anormalidades hepáticas. O marasmo é frequentemente descrito como desnutrição não-edematosa caracterizada por grave perda de peso, atrofia muscular, ausência de gordura subcutânea e edema e baixa relação peso-altura (PHAN *et al.*, 2021). O kwashiorkor marásmico é uma combinação de características clínicas de ambas as formas de desnutrição, incluindo a presença de edema, perda de gordura subcutânea e perda muscular. Embora a etiologia não seja clara, o kwashiorkor está frequentemente associado a dietas com deficiência de proteínas, e o marasmo está associado a dietas com restrição calórica que superam a deficiência de proteínas. O kwashiorkor marásmico pode ser associado a dietas deficientes em calorias e proteínas (FERREIRA *et al.*, 2021). Além de todas essas características citadas, a Desnutrição contribui para um estado inflamatório devido à produção de citocinas pró-inflamatórias e também está relacionada ao aumento do *stress* oxidativo, que pode levar ao aparecimento de diversas doenças crônicas (MARGINEAN *et al.*, 2013).

A Desnutrição permeia em questões sociais mais amplas e afetam comunidades vulneráveis em todo o mundo. Essa problemática social vai além das implicações físicas, abrangendo fatores econômicos, educacionais e estruturais que contribuem para a persistência dessa problemática de saúde global.

Sabe-se que, embora a desnutrição tenha apresentado uma redução em sua taxa de prevalência de 23,3% para 12,9% em um período de vinte e cinco anos, o número de indivíduos acometidos por esta síndrome ainda persiste elevado, exibindo valores equivalentes a 821 milhões em todo o mundo (FAO. *et al.*, 2018; FAO *et al.*, 2015). Em 2020, do total de

indivíduos subnutridos em todo o mundo, aproximadamente metade, 418 milhões, vive na Ásia. A situação também é alarmante na África, com mais de um terço (282 milhões) das pessoas desnutridas. Adicionalmente, na América Latina e no Caribe, as taxas de subnutrição vêm aumentando nos últimos anos, correspondendo a cerca de 8% da população, 60 milhões de pessoas (FAO, *et al.*, 2021).

A Desnutrição é um desafio global que afeta a saúde e o bem-estar de milhões de pessoas em todo o mundo. Nesse contexto, os modelos murinos de desnutrição emergem como ferramentas essenciais para estudar os complexos aspectos dessa condição, permitindo que os pesquisadores simulem e investiguem os efeitos da desnutrição em um ambiente controlado (DEBOER *et al.*, 2021). Um modelo que é amplamente utilizado, é o da restrição alimentar. Estes modelos podem levar a desnutrição e seguem o protocolo em restringir o consumo da ração dos grupos de animais em relação ao grupo controle. No entanto, há uma dificuldade de se encontrar um modelo murino de desnutrição de restrição ideal, já que alguns modelos trazem limitações e alguns estudos mostram que restrições alimentares foram benéficas do ponto de vista fisiológico (SALAMEH *et al.*, 2019).

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo validar um modelo murino de desnutrição, ao avaliar diferentes percentuais (20%, 40% e 60%) de restrição alimentar, com a utilização de duas dietas diferentes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A necessidade dos nutrientes

A vida humana é sustentada pela interação complexa de inúmeros processos biológicos que requerem a presença e a adequada ingestão de nutrientes essenciais. Os nutrientes são substâncias químicas vitais que nosso corpo não consegue sintetizar em quantidade suficiente, tornando-se essenciais para o funcionamento adequado de diversos sistemas e órgãos. Essas substâncias desempenham papéis fundamentais no metabolismo energético, na construção e reparação de tecidos, na regulação hormonal e na imunidade (VALENTE, 2022).

Os nutrientes podem ser categorizados em macronutrientes e micronutrientes. Os macronutrientes incluem carboidratos, proteínas e lipídios, que fornecem a energia necessária para as atividades diárias e constituem a estrutura básica das células. Já os micronutrientes, como vitaminas e minerais, são necessários em quantidades menores, mas são igualmente essenciais para a saúde, atuando como cofatores em reações enzimáticas e desempenhando papéis regulatórios (AIRES, 2022).

Cada nutriente desempenha funções específicas e interdependentes no corpo. Por exemplo, as proteínas são fundamentais na construção de tecidos, na produção de enzimas e hormônios, e no transporte de substâncias. Os carboidratos são a principal fonte de energia para o cérebro e os músculos, enquanto os lipídios são essenciais para a formação de membranas celulares, a absorção de vitaminas lipossolúveis e a regulação do metabolismo (VALENTE, 2022).

A carência de nutrientes essenciais pode levar a deficiências nutricionais, comprometendo a saúde e o funcionamento adequado do organismo. Por outro lado, o consumo excessivo de certos nutrientes, como gorduras saturadas e açúcares refinados, pode contribuir para problemas de saúde, como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares.

A compreensão das necessidades nutricionais individuais e a adoção de uma dieta balanceada e variada são fundamentais para garantir a ingestão adequada de nutrientes essenciais. A interseção entre a ciência da nutrição e a promoção da saúde desempenha um papel vital na prevenção de doenças e na melhoria da qualidade de vida. Portanto, a investigação contínua sobre a necessidade dos nutrientes e seu impacto na saúde humana é de suma importância para orientar práticas alimentares saudáveis e políticas de saúde eficazes (DEBOER *et al.*, 2021).

2.2 Desnutrição, conceitos, formas clínicas

Desnutrição é um desafio de saúde global complexo que surge quando a ingestão de nutrientes essenciais se mostra insuficiente para suprir as demandas do corpo. Esta condição compromete o adequado funcionamento dos sistemas biológicos, acarretando sérias implicações para a saúde, crescimento e desenvolvimento (MARQUES; TORRES, 2021).

Existem diversas formas de desnutrição, cada uma com características distintas e impactos específicos como a desnutrição aguda, também conhecida como grave, é marcada por uma rápida perda de peso e redução da massa muscular. Geralmente surge em situações de crise alimentar, fome ou doenças agudas, levando a uma ingestão insuficiente de alimentos (DEBOER *et al.*, 2021). Contudo a desnutrição crônica é um quadro onde a deficiência nutricional persiste ao longo do tempo, resultando em atraso no crescimento físico e desenvolvimento mental, mais frequentemente observado em crianças. Muitas vezes, isso é causado pela falta de acesso a alimentos nutritivos e cuidados médicos adequados (IBRAHIM *et al.*, 2017).

A subnutrição, por outro lado, é uma condição influenciada pela desnutrição aguda e crônica, refletindo uma condição atual resultantes de ingestão inadequada de alimentos,

episódios passados de desnutrição ou más condições de saúde, gerando uma interpretação complexa (WHO, 2021).

No que diz respeito às causas, a desnutrição pode ser primária, originando-se diretamente da falta de ingestão adequada de alimentos, ou secundária, decorrente de fatores como doenças crônicas, infecções ou condições que prejudicam a absorção e utilização de nutrientes (AIRES, 2022).

Quanto as formas de desnutrição, temos o kwashiorkor e o marasmo, que são frequentemente utilizados para categorizar essa condição. O kwashiorkor se destaca por edema, perda capilar e alterações cutâneas, enquanto o marasmo é caracterizado por extrema magreza e atrofia muscular. O marasmo é frequentemente descrito como desnutrição não-edematosa caracterizada por grave perda de peso, atrofia muscular, ausência de gordura subcutânea e edema e baixa relação peso-altura (AIRES, 2022).

Todavia, a desnutrição proteico-calórica envolve uma ingestão insuficiente tanto de calorias quanto de proteínas, o que gera déficits nutricionais afetando a energia, crescimento e funções do organismo. A desnutrição micronutricional, conhecida como desnutrição oculta, ocorre quando há carência de vitaminas e minerais essenciais no organismo, mesmo que a ingestão calórica pareça ser suficiente. Isso pode levar a problemas como anemia por falta de ferro, cegueira noturna devido à carência de vitamina A, entre outras complicações (MAHA *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que a má nutrição não apenas ameaça a saúde individual, mas também acarreta implicações sociais e econômicas. Ela pode resultar em menor produtividade, maior suscetibilidade a doenças e perpetuação de um ciclo de pobreza em diversas comunidades.

O entendimento das variadas formas de desnutrição é essencial para desenvolver estratégias eficazes de prevenção e tratamento. A abordagem multidisciplinar, que engloba saúde pública, nutrição, educação e sistemas de cuidados médicos, desempenha um papel crucial na redução da incidência de desnutrição e na promoção de uma qualidade de vida aprimorada para as populações em risco (AIRES, 2022).

2.3 A problemática social da Desnutrição

A desnutrição transcende os limites da saúde individual, permeando questões sociais mais amplas que afetam comunidades vulneráveis em todo o mundo. Essa problemática social vai além das implicações físicas, abrangendo fatores econômicos, educacionais e estruturais que contribuem para a persistência desse problema de saúde global (BARTLEY, 2020).

Nos cenários em que a desnutrição é predominante, muitas vezes se entrelaça com a

pobreza e a falta de acesso a alimentos nutritivos. Famílias de baixa renda muitas vezes enfrentam desafios para obter uma dieta equilibrada devido a restrições financeiras, levando a escolhas alimentares de menor valor nutricional. Isso cria um ciclo complexo, onde a falta de recursos financeiros leva à desnutrição, e a desnutrição, por sua vez, perpetua a pobreza ao afetar o desenvolvimento cognitivo e a capacidade produtiva das pessoas (BARTLEY, 2020).

Além disso, a educação desempenha um papel crucial na compreensão da importância de uma dieta equilibrada e nas práticas alimentares saudáveis. Comunidades carentes muitas vezes têm acesso limitado a informações nutricionais e à educação sobre alimentação adequada.

A desnutrição também está intimamente ligada a fatores estruturais, como infraestrutura de saúde precária, falta de saneamento básico e acesso limitado a água potável. Essas condições contribuem para a disseminação de doenças infecciosas que podem agravar ainda mais a desnutrição, criando um ciclo de saúde precária e carência nutricional (GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 2007).

Nos países em desenvolvimento, a desnutrição infantil pode ter impactos a longo prazo na formação da força de trabalho e no desenvolvimento econômico do país. Crianças que crescem desnutridas têm maior probabilidade de apresentar atrasos no desenvolvimento cognitivo e físico, o que limita suas oportunidades educacionais e profissionais no futuro (AIRES, 2022).

Enfrentar tal problemática requer abordagens holísticas e integradas. Isso envolve não apenas garantir acesso a alimentos nutritivos, mas também melhorar a educação alimentar, promover a igualdade de gênero, fortalecer os sistemas de saúde e criar políticas que abordem as raízes da desnutrição, como a pobreza e as desigualdades sociais (BARTLEY, 2020).

A desnutrição é um desafio que vai além da saúde individual, exigindo uma resposta coletiva para criar um impacto real e duradouro. Ao reconhecer as interconexões entre a desnutrição e os aspectos sociais, econômicos e estruturais, podemos trabalhar em direção a soluções abrangentes que melhorem a qualidade de vida das comunidades em risco e construam um futuro mais saudável e equitativo (SAMPAIO *et al.*, 2021).

2.4 Epidemiologia da Desnutrição

A epidemiologia da desnutrição abrange o estudo da distribuição, determinantes e impacto dessa condição de saúde em populações ao redor do mundo. Compreender os padrões e tendências da desnutrição é fundamental para direcionar intervenções eficazes, identificar grupos de risco e avaliar o progresso na luta contra essa problemática global (BARTLEY, 2020).

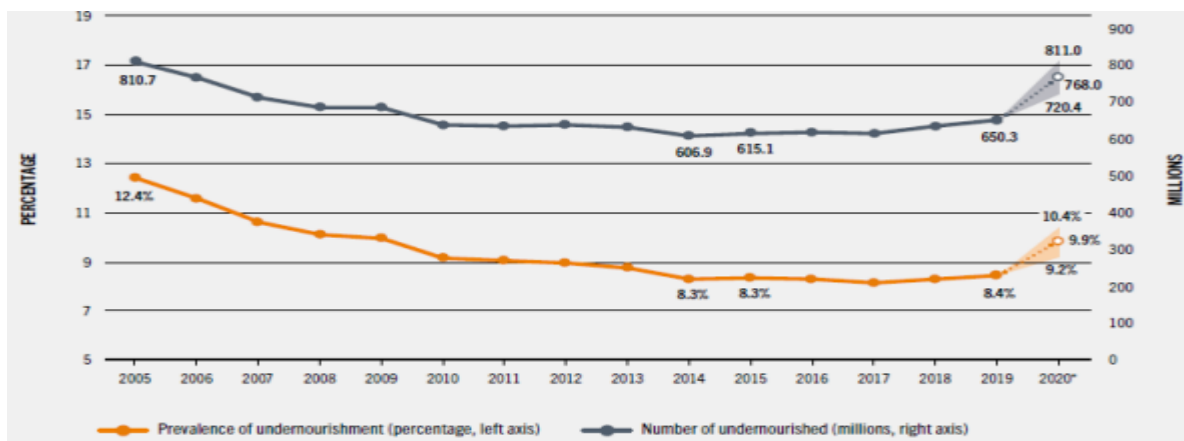
Essa morbidade é uma realidade que afeta predominantemente as regiões de baixa e média renda, onde as condições socioeconômicas desfavoráveis contribuem para a falta de acesso a alimentos nutritivos e cuidados de saúde adequados. Dados publicados pela FAO (2020) apontavam uma projeção de que até o final de 2020, 780 milhões de pessoas encontrariam-se em situação de insegurança alimentar devido à falta de acesso a alimentação adequada, fato que se agravou devido a pandemia da Covid-19 (NASCIMENTO & ANDRADE, 2010; FAO, 2020).

Em 2020, do total de indivíduos subnutridos em todo o mundo, aproximadamente metade, 418 milhões, vive na Ásia. A situação também é alarmante na África, com mais de um terço (282 milhões) das pessoas desnutridas. Adicionalmente, na América Latina e no Caribe, as taxas de subnutrição vêm aumentando nos últimos anos, correspondendo a cerca de 8% da população, 60 milhões de pessoas (FAO *et al.*, 2021).

Em 2020, cerca de 768 milhões de pessoas em escala global se encontravam em insegurança alimentar crônica, enquanto, em 2021, cerca de 193 milhões de pessoas experimentam a insegurança alimentar aguda em 53 países (WORLD FOOD PROGRAMME, 2022). Atualmente, cerca de 597 milhões de pessoas apresentam insegurança alimentar em 89 países (WORLD FOOD PROGRAMME, 2022). Ainda, segundo World Food Programme (2022), se as tendências atuais continuarem, o número de pessoas famintas será de 840 milhões a nível mundial em 2030.

Além disso, sabe-se que conflitos étnicos e as guerras contribuem para a insegurança alimentar e nutricional o qual promove um importante impacto na condição de saúde e no estado nutricional de crianças e da população no geral (BURKI, 2012).

Figura 1 - Número de pessoas subnutridas no mundo continuou a aumentar em 2020.



Fonte: FAO, 2021.

No Brasil, dados têm mostrado que, de 211,7 milhões de brasileiros, 116,8 milhões apresentam algum nível de insegurança alimentar, sendo que 43,4 milhões não possuem alimentos em quantidade suficiente e 19 milhões enfrentam a fome (PENSSAN, 2021).

Segundo relatório da ONU (2021), a má nutrição persistiu em todas as suas formas, com as crianças pagando um preço alto: em 2020, estimou-se que mais de 149 milhões de menores de cinco anos sofriam de atraso de crescimento ou eram muito baixos para sua idade; mais de 45 milhões –debilitadas ou muito magras para sua altura; e quase 39 milhões –acima do peso. Três bilhões de adultos e crianças permaneceram excluídos de dietas saudáveis, em grande parte devido aos custos excessivos além disso quase um terço das mulheres em idade reprodutiva sofre de anemia.

Nesse contexto, em relação a mortalidade infantil, foi registrado um total de 1629 óbitos de crianças de 0 a 14 anos, entre 2014 a 2018, sendo a principal causa a desnutrição. O maior número de óbitos por desnutrição ocorreu em menores de 1 ano. Considerando a faixa etária de 1 a 4 anos, esta apresentou o segundo maior número de óbitos, com valores iguais a 431 mortes. Dentre as regiões brasileiras, a região Nordeste se destaca das demais em relação ao número de óbitos, apresentando 646 mortes, já a região Sul foi a que apresentou a menor taxa (BARBOSA, 2020).

2.5 Consequências da doença

A desnutrição acarreta uma série de consequências adversas que afetam profundamente a saúde e o desenvolvimento das pessoas. Essas consequências vão desde o nível celular até o âmbito social, abrangendo diversas áreas da vida de indivíduos e comunidades (VALENTE, 2022).

A primeira consequência é o impacto na saúde. A desnutrição compromete funções vitais do organismo, resultando em perda de peso, fraqueza muscular, fadiga, sistema imunológico enfraquecido e maior suscetibilidade a infecções. Esse cenário, pode levar ao desenvolvimento de doenças crônicas, retardo no crescimento e desenvolvimento físico inadequado, especialmente em crianças (IBRAHIM *et al.*, 2017).

Além disso, a desnutrição prejudica o desenvolvimento cognitivo. Especialmente quando ocorre em idades precoces, durante os primeiros anos de vida, pode ter um impacto duradouro no desenvolvimento do cérebro e na função cognitiva. Isso pode resultar em dificuldades de aprendizado, baixo rendimento escolar e limitações nas habilidades intelectuais (IBRAHIM *et al.*, 2017).

Um efeito alarmante da desnutrição é o ciclo intergeracional que ela pode perpetuar.

Crianças desnutridas têm maior probabilidade de se tornarem mães desnutridas, contribuindo para a transmissão intergeracional de problemas de saúde e nutrição (VALENTE, 2022).

Outra consequência crítica é o aumento do risco de mortalidade. A desnutrição está diretamente ligada a um maior risco de mortalidade, especialmente em crianças menores de cinco anos. A falta de nutrientes essenciais enfraquece o sistema imunológico, tornando o organismo mais suscetível a infecções e doenças graves (BELCHIOR *et al.*, 2022).

No campo econômico e social, a desnutrição tem impactos negativos significativos. Afeta a capacidade das pessoas de realizar atividades diárias, incluindo trabalho e estudo, resultando em produtividade reduzida e menor potencial de crescimento econômico em comunidades afetadas (GRANTHAM-MCGREGOR *et al.*, 2007; VICTORA *et al.*, 2008).

Além disso, a desnutrição perpetua ciclos de pobreza e desigualdade. Comunidades vulneráveis têm maior probabilidade de enfrentar desnutrição devido à falta de acesso a alimentos nutritivos, serviços de saúde e educação. A desnutrição na infância pode resultar em complicações de saúde a longo prazo, aumentando o risco de doenças crônicas na vida adulta, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e hipertensão (VALENTE, 2022).

Em um nível mais amplo, países e regiões com altas taxas de má nutrição enfrentam um atraso no desenvolvimento social e econômico devido à força de trabalho debilitada e à falta de capital humano. Além disso, a desnutrição torna populações mais vulneráveis a crises humanitárias, como desastres naturais e epidemias, devido à sua capacidade reduzida de lidar com emergências.

Por fim, é importante ressaltar que a desnutrição aumenta a demanda por serviços de saúde, resultando em custos mais elevados para o sistema de saúde devido ao tratamento de doenças relacionadas à falta de nutrientes. Portanto, é crucial reconhecer as amplas implicações da desnutrição e trabalhar em direção a estratégias abrangentes que considerem não apenas a ingestão inadequada de nutrientes, mas também os fatores socioeconômicos, culturais e estruturais que contribuem para essa condição.

2.6 Fisiopatologia da Desnutrição

A fisiopatologia da desnutrição engloba um intrincado conjunto de mudanças biológicas que ocorrem como resposta à ingestão insuficiente de nutrientes essenciais. Essas mudanças afetam diversos sistemas do corpo, resultando em uma série de implicações para a saúde e o funcionamento adequado do organismo (LIMA, 2020).

Uma das primeiras consequências é o desregulamento do metabolismo energético. A ausência de calorias provenientes da alimentação inadequada leva o corpo a entrar em um

estado de conservação de energia. Isso resulta na diminuição do gasto calórico e na utilização dos estoques de gordura e músculos como fonte de energia (KOBYLINSKA *et al.*, 2022)

Além disso, ocorre degeneração dos tecidos. A falta de proteínas e aminoácidos essenciais, que são os blocos de construção dos tecidos, resulta em atrofia muscular e perda de massa magra. Consequentemente, surgem fraqueza muscular, perda de força e deterioração do tecido muscular (BELCHIOR *et al.*, 2022).

O sistema imunológico também é afetado. A desnutrição enfraquece a capacidade de defesa do corpo, tornando-o mais suscetível a infecções. A produção de células imunológicas é prejudicada, o que reduz a capacidade do organismo de combater doenças. As primeiras alterações na restrição alimentar são metabólicas, com rápida glicogenólise, aumento do consumo de aminoácidos livres, piruvato e lactato e consequente perda de massa muscular; seguida por uma fase posterior de conservação de proteínas e mobilização de gordura, que, por sua vez, gera lipólise e cetogênese, para utilização da energia armazenada (DIPASQUALE *et al.*, 2020). Por outro lado, sinais clínicos como comprometimento da altura, edema, hepatomegalia, diminuição de circunferência craniana e torácica surgem quando há persistência dos déficits de nutrientes na dieta associada com a fase crítica de desenvolvimento do indivíduo (GERUDE *et al.*, 2002).

O desequilíbrio hormonal é outra consequência. A desnutrição pode interferir na produção e regulação de hormônios importantes, como insulina, leptina e hormônios da tireoide. Esses desequilíbrios hormonais podem resultar em complicações metabólicas e outras questões de saúde (BELCHIOR *et al.*, 2022).

As carências de micronutrientes também desempenham um papel significativo. A desnutrição micronutricional leva à deficiência de vitaminas e minerais cruciais. Isso pode resultar em condições específicas, como anemia por deficiência de ferro, cegueira noturna devido à falta de vitamina A e comprometimento do sistema imunológico devido à carência de zinco, entre outros problemas.

No desenvolvimento cerebral, a desnutrição durante fases críticas, como a infância, pode prejudicar a formação e conexão de neurônios. Isso tem implicações de longo prazo no desenvolvimento cognitivo e nas funções cerebrais. Além disso, a desnutrição pode aumentar o risco de complicações cardiovasculares. Ela contribui para o desenvolvimento de problemas como doenças cardíacas e hipertensão, devido às alterações no metabolismo lipídico e na função cardiovascular (SAMPAIO *et al.*, 2021).

Disfunções gastrointestinais também surgem. A falta de nutrientes pode levar a problemas como má absorção de nutrientes, constipação e danos à mucosa do trato digestivo.

A desnutrição pode afetar a coagulação sanguínea, causando alterações que aumentam o risco de problemas de coagulação e sangramentos (DEBOER *et al.*, 2021).

Desequilíbrios eletrolíticos são outro efeito. A ausência de nutrientes pode levar a desequilíbrios nos níveis de eletrólitos no sangue, afetando a função cardíaca, muscular e nervosa. Portanto, é essencial compreender que a fisiopatologia da desnutrição não se limita à falta de calorias. Ela abrange uma série de processos interconectados que impactam a saúde e o funcionamento global do corpo. Para lidar com a desnutrição, são necessárias intervenções nutricionais, médicas e sociais abrangentes, com o objetivo de restaurar o equilíbrio nutricional e prevenir complicações de longo prazo (LIMA, 2020).

2.7 Desnutrição: Inflamação e estresse oxidativo

A Desnutrição contribui para um estado inflamatório devido à produção de citocinas pró-inflamatórias.

Estudos demonstraram uma relação entre desnutrição e níveis elevados de IL-6 e TNF α (MARGINEAN, 2013). Sabe-se também que níveis elevados de citocinas TNF α , IL-6 e IL-2 estão associados à diminuição da ingestão alimentar e podem contribuir para a anorexia. Outros estudos demonstraram a relação entre desnutrição e marcadores inflamatórios em grupos populacionais específicos, inclusive em crianças (ABO-SHOUSHA *et al.*, 2000), pacientes em diálise (KRZANOWSKI *et al.*, 2018) e pacientes com neoplasias (GIOULBASANIS *et al.*, 2012). Outra evidência da relação da desnutrição com a inflamação é o estudo de Takele *et al.*, (2016), que encontraram correlação significativa entre baixo IMC e níveis aumentados de IFN- γ , IL-2, IL-12, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, IL-33 e TNF α ; entretanto, não IL-8 ou PCR. Seus resultados mostram que, mesmo na ausência de infecções aparentes, indivíduos saudáveis desnutridos apresentam respostas imunológicas disfuncionais que podem causar aumento da suscetibilidade a doenças infecciosas com apresentações mais graves.

A perda de peso é mediada por algumas dessas citocinas através de vários mecanismos, como ingestão ineficiente e efeito catabólico nas reservas de energia, e uma associação positiva foi relatada entre essas moléculas e um baixo índice de massa corporal (IMC) (SHAKERSEIN *et al.*, 2016). Além disso, a investigação sugere que as dificuldades alimentares e de deglutição, a perda grave de apetite devido aos efeitos anorexigênicos do factor de necrose tumoral- α (TNF α), a elevada taxa metabólica, a perda de proteínas viscerais e a redução da massa isenta de gordura, juntamente com o stress oxidativo, podem contribuir para desnutrição e subsequente perda de peso (PHILLIPS, 2010). No que diz respeito à relação entre ERO e nutrição, foi determinado que existe um nível mais elevado de radicais livres e níveis mais baixos de

antioxidantes em pacientes desnutridos do que numa população adequadamente nutrida, tal fato indica estresse oxidativo. Em determinado estudo, foi demonstrado que a desnutrição pode apresentar baixos níveis de antioxidantes, bem como baixos níveis de glutathione (GSH).

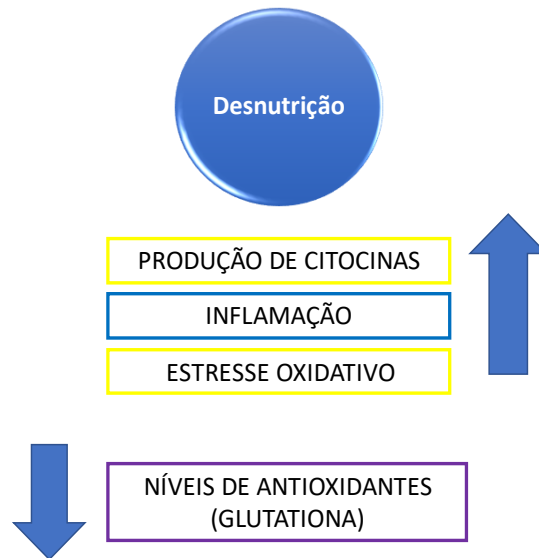


Figura 2. Desnutrição: Inflamação e estresse oxidativo (elaborada pelos autores)

A presença de *stress* oxidativo na Desnutrição, está associada à instalação de Doenças Cardiovasculares (KHARE, 2014).

2.8 Modelos Experimentais de animais sua importância e limitações: modelo murino de desnutrição

Os modelos experimentais em animais desempenham um papel de extrema importância na pesquisa biomédica, oferecendo valiosos insights sobre doenças humanas, terapias em potencial e os complexos mecanismos biológicos subjacentes. Esses modelos têm o poder de fornecer um ambiente controlado para investigar processos biológicos intrincados e compreender as bases de doenças, respostas imunológicas e interações entre células (CALABRESE, 2020).

Um dos principais benefícios dos modelos animais é a capacidade de realizar testes pré-clínicos de terapias. Antes de submeter tratamentos a testes em seres humanos, esses modelos permitem avaliar tanto a eficácia quanto a segurança das intervenções em estágios iniciais, minimizando riscos e otimizando o desenvolvimento de terapias promissoras.

Além disso, os modelos animais são essenciais na identificação de biomarcadores, substâncias indicativas da presença ou progressão de uma doença. A descoberta desses biomarcadores é fundamental para diagnósticos precoces e para monitorar a resposta aos

tratamentos, contribuindo para um cuidado mais personalizado e eficaz (CALABRESE, 2020).

Outra aplicação valiosa dos modelos animais é a realização de estudos de farmacocinética e farmacodinâmica. Eles ajudam a compreender como medicamentos são absorvidos, distribuídos, metabolizados e excretados pelo organismo, bem como a avaliar suas interações complexas no corpo (FAGUNDES & PLAPLER, 2021).

Nesse contexto, nos modelos experimentais indutores de desnutrição vêm ajudando a compreender os efeitos da deficiência proteica, energética e de micronutrientes específicos no desenvolvimento saudável. No entanto, alguns modelos genéticos de nocaute de proteínas específicas são citados por causar desnutrição (SALAMEH *et al.*, 2019).

Um modelo amplamente utilizado, a restrição calórico proteica consiste em limitar o consumo de ração diária do animal, fazendo com que o seu consumo total seja apenas parte do que o animal com ração *ad libitum* consome. O uso da restrição calórico proteica na literatura está bastante associado com estudos de longevidade. As primeiras observações de experimentos de restrição alimentar realizados em roedores demonstraram um aumento na longevidade dos animais (OSBORNE *et al.*, 1917; McCAY *et al.*, 1943). Desde então, diferentes protocolos foram criados para murinos. Alguns destes modelos são importantes por demonstrar os efeitos da deficiência energética nos diversos sistemas corporais, incluindo o impacto na função imunológica, condição geralmente comprometidas em crianças desnutridas (IBRAHIM *et al.*, 2017). Os modelos podem levar a desnutrição, impactam na homeostase corporal total e consistem em restringir o consumo da ração em relação ao grupo controle (SALAMEH *et al.*, 2019). Jahng *et al.* (2007) analisaram os efeitos da restrição calórica crônica em ratos recém desmamados ao alimentar os animais com 50% a menos de ração que o grupo controle por 60 dias. O desfecho deste estudo contou com perda de peso dos camundongos em restrição e sintomas de depressão. Estudo realizado por Pinheiro (2017), mostra que a restrição calórica de 60% em relação ao grupo controle favore o estado inflamatório em camundongos e também reduz o peso.

Outro modelo de restrição calórica avaliou os efeitos no timo ao disponibilizar 30% a menos de ração para o grupo desnutrido do que para os grupos controles. Os resultados desta restrição foi de atrofia no timo e redução de marcadores inflamatórios (PAN *et al.*, 2018). Na literatura, também é citado modelo de restrição calórica de 25% (NÚÑEZ *et al.*, 2013), como resultados obteve-se perda de peso e atrofia no timo e 15% (PARK *et al.*, 2017) em relação ao controle. Entretanto, esses modelos podem ser estressantes para roedores, nos quais níveis aumentados de corticosterona (MEHUS; PICKLO, 2017), aumento de ansiedade e depressão (JAHNG *et al.*, 2007) foram reportados.

Entretanto, é importante reconhecer as limitações dos modelos animais. As diferenças interespecies podem levar a resultados que não são diretamente extrapoláveis para humanos, devido às distintas respostas biológicas entre as espécies. Além disso, a complexidade das doenças humanas nem sempre é completamente capturada pelos modelos animais, o que pode resultar em interpretações limitadas ou enganosas (PARK *et al*, 2021).

Outra questão crítica é a ética envolvida na utilização de animais em pesquisa, a preocupação com o bem-estar dos animais e a busca por alternativas éticas e eficazes são aspectos essenciais a serem considerados. A variabilidade biológica e fatores não controlados também podem afetar a reprodutibilidade dos resultados em modelos animais, demandando, por vezes, amostras maiores para obter conclusões confiáveis (CALABRESE, 2020).

2.9 Dieta padrão comercial peletizada e *Diet American Institute of Nutrition-Modified* (AIN93-M)

Levando em conta as necessidades nutricionais dos animais, as dietas utilizadas em laboratório têm a principal finalidade manter a saúde do animal. Porém encontra-se pouca atualização em relação às necessidades nutricionais dos roedores e esse pode ser um motivo de questionamento em relação à composição das dietas comerciais (MOURA, 2014)

Formula-se a dieta comercial com alimentos processados, como grãos de trigo, milho, soja e farinha de peixe (COSTA *et al.*, 2014). Essas dietas são amplamente utilizadas por serem mais econômicas, terem grande durabilidade e serem bem aceitas pelos animais. Porém, como a dieta é fabricada com ingredientes naturais, mesmo a dieta sendo da mesma marca, nem sempre ela possui a mesma composição de nutrientes, levando em consideração que podem haver variações em relação à espécie, número e qualidade dos ingredientes utilizados (LEWIS *et al.*, 2006). A dieta do fabricante (Purina do Brasil Ltda) tem na composição básica da dieta “Labina” : carbonato de cálcio, farelo de soja, farelo de trigo, milho integral moído, óleo de soja degomado, cloreto de sódio (sal comum) e pré-mix vitamínico mineral. Os eventuais substitutivos são: Farelo de arroz, farelo de arroz desengordurado, farelo de glúten de milho, farelo de soja integral (grãos tostados), quirera de arroz, etoxiquin, gordura vegetal estabilizada, farinha de trigo. O fabricante em sua embalagem refere a lista de itens de enriquecimento além do nível de garantia do produto. Na tabela abaixo, encontra-se a composição da ração, segundo o fabricante:

COMPOSIÇÃO DA RAÇÃO PURINA LABINA ®	
COMPOSIÇÃO BÁSICA	NÍVEIS DE GARANTIA
<p>Milho integral moído*, farelo de soja*, soja integral desativada*, farelo de trigo, farinha de trigo, farelo de arroz, melaço, dextrina, fosfato monobicálcico, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), cromo aminoácido quelato, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, cloreto de colina, lisina, metionina, ácido propiônico, ácido acético, propionato de amônio, etoxiquim.</p> <p>Espécies doadoras do gene: *<i>Agrobacterium tumefaciens</i> e/ou <i>Arabidopsis thaliana</i> e/ou <i>Bacillus thuringiensis</i> e/ou <i>Streptomyces hygroscopicus</i> e/ou <i>Streptomyces viridochromogenes</i> e/ou <i>Zea mays</i>.</p>	<p>Umidade (máx.) 125,00 g/kg; proteína bruta (mín.) 230,00 g/kg; extrato etéreo (mín.) 40,00 g/kg; fibra bruta (máx.) 50,00 g/kg; matéria mineral (máx.) 90,00 g/kg; cálcio (mín.) 12,00 g/kg; cálcio (máx.) 13,00 g/kg; fósforo (mín.) 8.500,00 mg/kg; flúor (máx.) 30,00 mg/kg; sódio (mín.) 2.700,00 mg/kg; cromo (mín.) 2,00 mg/kg; ferro (mín.) 180,00 mg/kg; cobre (mín.) 30,00 mg/kg; manganês (mín.) 110,00 mg/kg; zinco (mín.) 110,00 mg/kg; iodo (mín.) 2,00 mg/kg; cobalto (mín.) 2,00 mg/kg; selênio (mín.) 0,20 mg/kg; vitamina A (mín.) 25.500,00 UI/kg; vitamina D3 (mín.) 4.000,00 UI/kg; vitamina E (mín.) 82,00 UI/kg; vitamina K3 (mín.) 6,40 mg/kg; vitamina B1 (mín.) 11,00 mg/kg; vitamina B2 (mín.) 12,00 mg/kg; niacina (mín.) 219,00 mg/kg; ácido pantotênico (mín.) 90,00 mg/kg; vitamina B6 (mín.) 11,00 mg/kg; ácido fólico (mín.) 13,00 mg/kg; biotina (mín.) 0,16 mg/kg; vitamina B12 (mín.) 40,00 mcg/kg; colina (mín.) 1.900,00 mg/kg; lisina (mín.) 12,50 g/kg; metionina (mín.) 4.000,00 mg/kg.</p>

Tabela 1. Dieta Purina Labina ®

A Dieta AIN-93M para manutenção, abreviação para "*Diet American Institute of Nutrition-Modified*", é uma outra uma formulação nutricional padronizada amplamente usada em estudos que envolvem modelos animais, utilizada para a manutenção especialmente roedores como ratos e camundongos. Ela foi desenvolvida pelo American Institute of Nutrition (Instituto Americano de Nutrição) com o propósito de oferecer uma base controlada e consistente para pesquisas que exploram os efeitos da dieta em diversas condições de saúde

(MAHAN, ESCOTT-STUM, 2020). A formulação da dieta, encontra-se abaixo:

INGREDIENTS	AIN93-M
BHT	0,001
Choline bitartrate	0,250
Methionine	0,180
Mix of vitamins	1,000
Mix of minerais	3,500
Cellulose	5,000
Soy Oil	4,000
Casein	14,000
Sucrose	10,000
Maltodextrin	15,500
Maise Starch	46,569
Total	100,00

Tabela 2. Dieta AIN93 - M

A principal vantagem da Dieta AIN-93M reside na sua padronização. Ao fornecer uma composição nutricional precisa e conhecida, ela reduz a variabilidade nos resultados dos estudos. Isso é fundamental para assegurar que quaisquer diferenças observadas sejam devidamente atribuídas à intervenção ou condição em estudo, e não a possíveis variações na dieta (TOLAZZI *et al.*, 2021).

Outro aspecto importante é o controle experimental que a Dieta AIN-93M permite. A formulação cuidadosa possibilita que os pesquisadores controlem com precisão a ingestão de nutrientes, algo essencial em investigações que requerem manipulação dietética específica para avaliar os efeitos em determinadas condições (DUFFY, 2022).

A reprodutibilidade dos resultados é outra característica positiva. A consistência na formulação da dieta contribui para a replicação dos resultados em diferentes estudos e laboratórios. Essa uniformidade é crucial para validar as descobertas e para garantir que os resultados sejam comparáveis e consistentes ao longo do tempo (MAHAN, ESCOTT-STUM, 2020).

Além disso, a Dieta AIN-93M é uma ferramenta essencial para explorar a relação entre nutrientes e doenças. Ela permite que os pesquisadores estudem os impactos da dieta em várias

condições de saúde, como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares e distúrbios metabólicos. Isso contribui para uma compreensão mais profunda dos mecanismos subjacentes a essas condições e para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas potenciais (TOLAZZI *et al.*, 2021).

No entanto, é crucial reconhecer suas limitações. A aplicação direta dos resultados obtidos com a Dieta AIN-93M em seres humanos pode ser limitada devido às diferenças fisiológicas entre as espécies. (DUFFY, 2022). Além disso, alguns autores passaram a evidenciar alterações metabólicas em roedores que eram alimentados com ambas dietas AIN-93 como alterações no perfil lipídico (LIEN *et al.*, 2001) e esteatose hepática (SILVA *et al.*, 2008), quando comparados à dieta comercial.

Contudo, a Dieta AIN-93M desempenha um papel fundamental na pesquisa nutricional com modelos animais, oferecendo uma base controlada para investigações científicas. Entretanto, ao planejar e interpretar estudos, os pesquisadores devem considerar cuidadosamente tanto suas vantagens quanto suas limitações, a fim de garantir resultados precisos e relevantes para a saúde humana (TOLAZZI *et al.*, 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Validar um modelo murino de desnutrição, avaliando diferentes percentuais de restrição alimentar (20%, 40% e 60%), utilizando dois tipos de dieta (Purina-Labina ® e AIN93-M), caracterizando os efeitos da desnutrição.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos das restrições impostas nas diferentes dietas, nos parâmetros corporais, como peso, ganho de peso, composição corporal e Índice de Lee;
- Avaliar os efeitos das restrições impostas nas diferentes dietas, nos parâmetros bioquímicos, como colesterol total, triglicerídeos, frações de colesterol, albumina etc;
- Avaliar a regulação glicêmica por meio de testes de sensibilidade insulínica e tolerância à glicose;
- Investigar os efeitos das restrições alimentares propostas nos modelos em relação a morfometria, histopatologia e tamanho total do tecido adiposo epididimal;
- Avaliar a expressão gênica de marcadores de estresse oxidativo no tecido adiposo epididimal.

4 PRODUTO TÉCNICO-CIENTÍFICO

Artigo 1: Development of a malnutrition model in mice: comparative evaluation of the percentage of food restriction and different diets

Development of a malnutrition model in mice: comparative evaluation of the percentage of food restriction and different diets

André Tiago Malveira¹, Victor Hugo Dantas Guimarães³, Sonielle Rodrigues Lima², Lucyana Conceição Farias³, Alfredo Maurício Batista de Paula³, André Luiz Sena Guimarães³, Sérgio Henrique Sousa Santos^{1,2,3}

1 Postgraduate Program in Food and Health. Federal University of Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

2 Institute of Agricultural Sciences (ICA), Postgraduate Program in Food and Health, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Montes Claros, Minas Gerais, Brazil.

3 Health Sciences Laboratory, Postgraduate Program in Health Sciences, State University of Montes Claros (Unimontes), Minas Gerais, Brazil.

André Tiago Malveira: andretiagofunorte@yahoo.com.br

Victor Hugo Dantas Guimarães: victorhg23354@hotmail.com

Sonielle Rodrigues Lima: soniellelima@gmail.com

Lucyana Conceição Farias: lucyanacfarias@gmail.com

Alfredo Maurício Batista de Paula: alfredo.paula@unimontes.br

André Luiz Sena Guimarães: andreluizguimaraes@gmail.com

Sérgio Henrique Sousa Santos: sergiosousas@hotmail.com

*Correspondence to Sérgio Henrique Sousa Santos, Institute of Agricultural Sciences. Federal University of Minas Gerais (UFMG); Avenida Universitária, 1.000 – Universitário, 39.404-547, Montes Claros, MG, Brazil. Email: sergiosousas@hotmail.com

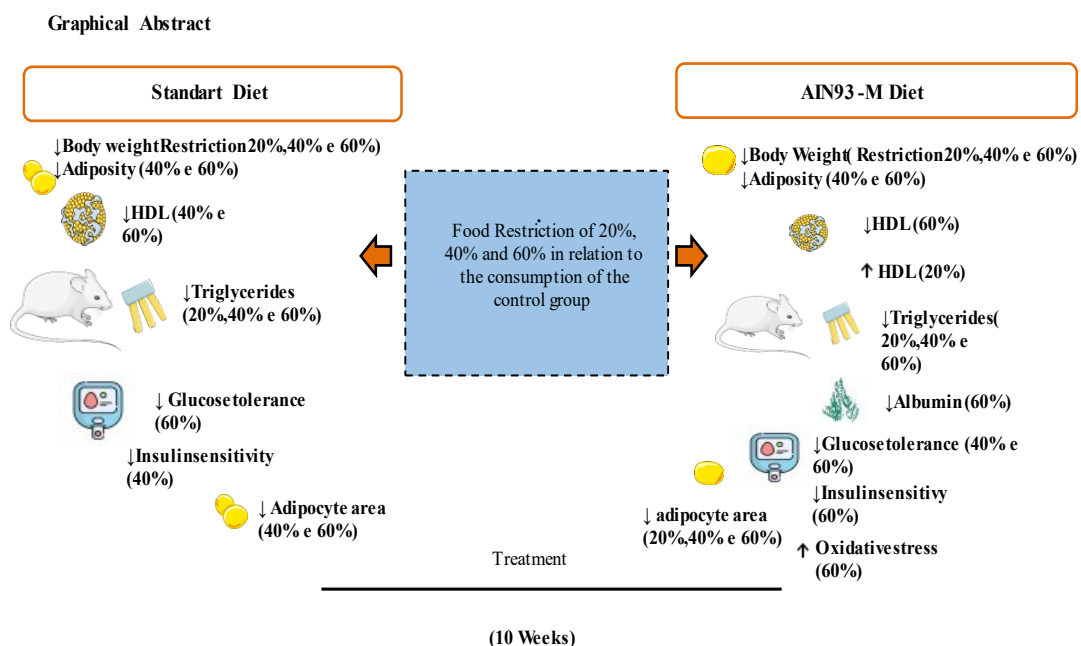
List of abbreviations

AIN93 – M – American Institute of Nutrition 93 diet for maintenance, ANOVA – Analysis of Variance, AUV – Area under the curve, BHT – butylated hydroxytoluene, CDNA – Complementary deoxyribonucleic acid, CEBEA – Commission on Ethics, Bioethics and Animal Welfare, DNA – Deoxyribonucleic acid, USA – United States of America, FR – Food Restriction, GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, H & E – Hematoxylin & Eosin histological stains, HDL – High density lipoprotein, ipTTG - Intraperitoneal glucose tolerance test, ipTSI - Intraperitoneal insulin sensitivity test, LDL – Low-density lipoprotein, RNA – Ribonucleic acid, RT-qPCR – Quantitative real-time PCR, SEM – standard mean error, ST – Standard (Standard), TAE – Epididymal Adipose Tissue and VLDL – Very Low Density Lipoprotein.

Abstract

Malnutrition is a complex pathology, associated with increased risk of mortality, susceptibility to infectious diseases and impaired cognitive development. It is a global public health problem. Experimental models have been developed to understand the mechanisms involved in the pathology of malnutrition. However, due to limitations, there is no consensus in the literature about which murine model produces effects that mimic conditions in humans. Given the above, the present study aimed to validate a murine model of malnutrition, based on dietary restriction, using two types of diet, to characterize its effects on malnutrition. The study was conducted with fifty-six Swiss mice (eight-week-old males) divided into eight groups (n=7 each) and fed the following experimental diets for 10 weeks. The groups were divided into: Standard Diet (ST) ad libitum; ST 20% dietary restriction; ST 40% dietary restriction; ST 60% dietary restriction; AIN93-M diet ad libitum; AIN93-M 20% dietary restriction; AIN93-M 40% dietary restriction; AIN93-M 60% dietary restriction. Body, biochemical and histological parameters were measured, in addition to evaluating the effects of restrictions with the AIN93-M diet on genes related to oxidative stress such as GPX1 and GPX4 in epididymal tissue in qRT-PCR. Given the results obtained, it is concluded that dietary restrictions of 20%, 40% and 60% were able to reduce body weight when compared to their controls, highlighting the accentuated weight loss in animals with restrictions of 60%, especially those fed with AIN-93 M. The 40% and 60% restriction protocols were able to reduce adiposity in two types of diets, as well as the area of adipocytes and the fat layer of the epididymal tissue, and again of significantly in groups with 60% dietary restriction. In this restriction group, fed with the AIN93-M diet, physical changes were observed, such as whitish skin and dull coat, voracious eating and hunched posture. The AIN93-M diet proved to be the best diet for carrying out this protocol. Through this model, it was possible to obtain a reduction in the animals' body weight, biochemical changes, such as in the lipid profile (decrease in HDL and triglycerides) and hypoalbuminemia, as well as histological changes in the epididymal adipose tissue. The presence of increased oxidative stress was observed in this restriction group, through the evaluation of the GPX4 gene. Given the above, food restriction of 60% with the Ain93-M diet was the best protocol for inducing malnutrition.

Keywords: Cachexia; Experimental Model; Undernourishment; Food restriction



1. Introduction

Malnutrition is a global public health problem with significant body physiopathological alterations as a result of a set of metabolic disorders associated with the absorption or ingestion of food, causing an imbalance of nutrients, and consequent impairment of metabolism (1). The instability between body demand and nutrient supply makes it impossible for organic systems to function properly, leading to homeostasis imbalances such as undernourishment (2).

In this sense, we can mention the clinical forms of malnutrition: marasmus, kwashiorkor, and protein-calorie deficiency. The kwashiorkor is described as edematous malnutrition generating clinical characteristics such as capillary changes, skin lesions, and liver abnormalities. Marasmus is often described as non-edematous malnutrition characterized by severe weight loss, muscular atrophy, absence of subcutaneous fat and edema, and low weight-to-height ratio (6). Protein-calorie malnutrition is a combination of clinical features of both forms described previously, including the presence of edema, loss of subcutaneous fat, and muscle loss (3).

Poor nutrition permeates broader social issues and affects vulnerable communities around the world. This social problem goes beyond the physical implications, encompassing economic, educational, and structural factors that contribute to the persistence of this global health problem. It is known that, although malnutrition has shown a reduction in its prevalence rate from 23.3% to 12.9% over a period of twenty-five years, the number of individuals affected by this syndrome still remains high, showing values equivalent to 821 million people worldwide (4,5).

In 2020, of the total number of undernourished individuals worldwide, approximately half, 418 million, lived in Asia. The situation is also alarming in Africa, with more than a third (282 million) of people malnourished. Additionally, in Latin America and the Caribbean, malnutrition rates have been increasing in recent years, corresponding to around 8% of the population, 60 million people (6).

Understanding the molecular aspects and body modifications are important tool to reduce malnutrition mortality and test food strategies. In this context, murine models emerge as essential options to study the complex aspects of this metabolic condition, allowing researchers to simulate and investigate the effects of malnutrition in a controlled environment (7).

Experimental models that induce malnutrition have helped to understand the effects of protein, energy, and specific micronutrient deficiencies on healthy development. A model that is widely used consists of calorie-protein restriction. These models can lead to malnutrition, impacting total body homeostasis, and consist of restricted feed consumption in relation to the control group (8). However, there is difficulty in finding an ideal murine model of restriction malnutrition, as some models have serious limitations considering that dietary restrictions may be beneficial from a physiological point of view until a percent of calorie restriction (9).

In this context, the present study aims to evaluate murine models of malnutrition, based on different percentages (20%, 40%, and 60%) of dietary restriction and compare two types of diets, which will characterize the effects of malnutrition, in order to seek a better model for inducing alterations.

2 Materials and methods

2.1 Study design

The study was conducted with fifty-six Swiss mice (eight-week-old males) divided into eight groups (n=7 each) and fed different experimental diets for 10 weeks. The animals were acclimatized in cages (41x34x18 cm), under a light-dark cycle of 12/12 hours (lights on from 7:00 to 19:00) at 25±2°C, relative air humidity of 60±5 %, and low sound level <40 dB, in addition to free access to water. The groups were divided into: Standard Diet (ST) ad libitum; ST 20% dietary restriction; ST 40% dietary restriction; ST 60% dietary restriction; AIN93-M diet ad libitum; AIN93-M 20% dietary restriction; AIN93-M 40% dietary restriction; AIN93-M 60% dietary restriction. The choice to use Swiss mice was due to their outbreed characteristic, also known as heterogeneous, they tend to maintain greater genetic variability than humans (10). The study was approved by the Ethics Committee on Experimentation and Animal Welfare (CEEBEA) of the State University of Montes Claros, Minas Gerais, Brazil (n° 235/2021).

2.2 Food restriction and diet protocol

The groups of mice fed a standard diet (ST) and AIN93-M (Table 1) were fed ad libitum and had their food intake measured daily. From the dietary intake of these groups, dietary restrictions of 20%, 40%, and 60% were then calculated. The standard diet (Purina - Labina®) used for regular maintenance of mice is composed of 54% carbohydrates, 26% protein, and 8% fat, representing a total of 3.2 kcal per 1g of diet. In addition, the constitution of the AIN93 maintenance diet has 75.9% carbohydrates, 13.7% proteins, and 10.3% lipids (Table 1).

Table 1.

INGREDIENTS	ST	AIN93-M
BHT		0,001
Choline bitartrate		0,250
Methionine		0,180
Mix of vitamins		1,000
Mix of minerais		3,500
Cellulose		5,000
Soy Oil		4,000
Casein		14,000
Sucrose		10,000
Maltodextrin		15,500
Maise Starch		46,569

Total	100,00	100,00
Composition		
(%)	54,0	75,9
Carbohydrate	26,0	13,7
Protein	8,0	10,3
Lipids	3,2	3,6
Kcal (g)		

2.3 Body weight measurement and Lee Index

The body weight of the animals was measured every day, at fixed and previously defined times (at 8:00), using a semi-analytical scale. For body weight, the values per animal were recorded, in grams, throughout the entire experiment, as well as the averages per group on each measurement day. In the last treatment, weight and naso-anal length were measured (11). Subsequently, these data were used to calculate the Lee index for each animal, which is the ratio of the cubic root of body mass (g) to the naso-anal length (cm) and multiplied by 10, which is equivalent to the index of body mass (BMI) obtained for humans (12). The body adiposity index (%) was calculated using the formula: \sum weight of epididymal, mesenteric, and retroperitoneal tissues (g)/animal weight (g) x 100. Before euthanasia, other physical parameters were also evaluated, such as the appearance of the coat and skin, as well as the behavior of the mice.

2.4 Determination of biochemical parameters

Serum was obtained after centrifugation of whole blood at 3,500 rpm for 10 minutes and stored at -20°C until biochemical analyzes were performed. Albumin, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), VLDL, triglycerides, glucose and insulin were evaluated using specific kits (Diagnostica®, Brazil) and analyzed on the Humastar 200 device (Diagnostica®, Brazil). High-density low-density lipoprotein (LDL) levels were calculated using the formula proposed by Friedewald (13).

2.5 Intraperitoneal glucose tolerance test and insulin sensitivity test

The intraperitoneal glucose tolerance test (ipTTG) was performed after an 8-hour overnight fast, using an intraperitoneal injection of hypertonic glucose at 50% weight/volume (Samtec®, Brazil) at a dose of 2g/kg of body weight. Peripheral blood samples were obtained through a caudal capillary (14), at times 0 (baseline), 15, 30, 60 and 120 minutes after injection to measure glucose levels, using an Accu-Chek glucometer (Roche Diagnostics®, USA).

The intraperitoneal insulin sensitivity test (ipTSI) was performed in the morning in a fed state. The animals received insulin (Insulin N®, Novo Nordisk) at a dose of 0.75 IU/kg of body weight, with glucose values measured at times 0 (baseline), 15, 30, 60 and 120 minutes after injection. The procedure ended in the same way as ipTTG.

2.6 Euthanasia and body composition analysis

After overnight fasting, the animals were euthanized using the guillotine decapitation technique. Immediately after sacrifice, whole blood samples were obtained and tissue samples were collected: epididymal, mesenteric, retroperitoneal and subcutaneous. The epididymal adipose tissue was weighed and frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C in a freezer for later analysis.

2.7 Ultrasound of epididymal adipose tissue

Ultrasound images of the thickness of the epididymal adipose tissue of the mice were obtained in the last week of the malnutrition induction phase to confirm changes in body adiposity. To acquire the images, the animals underwent trichotomization of the abdominal region, positioned in dorsal decubitus, and manually immobilized; the GE LOGIQ ultrasound device and L8-18i high-frequency transducer (GE Healthcare, USA) were used. All images were taken in fundamental brightness mode (B-mode), with gain optimization, and time again compensation settings were kept constant throughout the experiment.

2.8 Histological analyzes

Epididymal adipose tissue samples were fixed in a 10% buffered formaldehyde solution, dehydrated in ethyl alcohol, cleared in xylene, and embedded in paraffin. Tissue sections (5 µm) were stained with hematoxylin and eosin (H&E). The stained tissue slides were scanned using a digital slide scanner (Motic Easy Scan Pro Digital Slide Scanner, Motic Asia Corp., Kowloon, Hong Kong). The Motic “DSassistant” software was used to observe and photograph the biological and structural changes in the treated tissue.

2.9 RNA extraction, retrotranscription and qRT-PCR

Total RNA was obtained from epididymal tissue, following the protocol described by TRIzol™ Reagent (ThermoFisher Scientific®, United States). RNA concentrations were determined using a spectrophotometer (Nano Drop® ND-1000, USA) at 260 and 280 nm; and samples stored at -80°C until the next analysis. For cDNA synthesis, the samples were initially treated with DNase (Promega®, USA), and then retrotranscription was performed using random hexamer primers (Thermofisher) and MLV (Invitrogen®, USA) Transcriptase following the manufacturer's instructions. 2000 ng of RNA were used for cDNA synthesis, which was stored at -20°C. Next, the mRNA expression level of markers associated with oxidative stress, such as glutathione peroxidase 1 and 4, was measured. In epididymal adipose tissue, GAPDH was used as a normalizing pattern gene. For qRT-PCR reactions, SYBR® Green qPCR SuperMix (Invitrogen®, USA) was used, being carried out on the QuantStudio 6 Flex system platform (Applied Biosystems®, USA). The gene expression relationship between the sample (target gene) and the normalizing gene was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (15). Only gene expression analyses were directed to the AIN93-M diet group, as it was the model that presented the best results statistically

2.10 Statistical analyzes

Data were expressed as means±standard error of the mean (SEM) and analyzed using the statistical program GraphPad Prism version 8.0. software (version 8.0V ($p < .05$). Normality was checked by the Shapiro Wilk test. The trapezoidal rule was used to determine the area under the curve (AUC). The statistical significance of the values for the different groups was estimated by One-way ANOVA and two-way ANOVA (body weight and insulin/glucose tests), followed by post-Bonferroni multiple comparisons test.

3 Results

3.1 Body Composition

Dietary restrictions induced body weight loss during the 10-week malnutrition induction period, both in the animal model that used the standard diet and the model that used the AIN93-M diet. In Figure 1(A), body weight loss was observed in FR 20%, FR 40% and FR 60%, compared to ST. In relation to the animal model that used the AIN93-M diet (D), FR 20%, FR 40% (AIN93-M) and FR 60% (AIN93-M) also showed weight loss. In Figure 1(B), body weight was observed in FR 40% and FR 60% ($p < .0001$), and FR 20% ($p < .01$) compared to ST. Between RR20% and RR60% there was a statistical difference ($p < .01$). In Figure 1(D), body weight loss was observed in FR 40% and FR 60% ($p < .0001$), and FR 20% ($p < .01$) compared to the AIN93-M control group. Between FR 20% (AIN93-M) and FR 60% (AIN93-M) there was a statistical difference ($p < .0001$) and ($p < .05$) between FR 20% (AIN93-M) and FR40% (AIN93-M). Finally, it was observed ($p < .05$) in the comparison between FR 40% (AIN93-M) and RR 60% (AIN93-M).

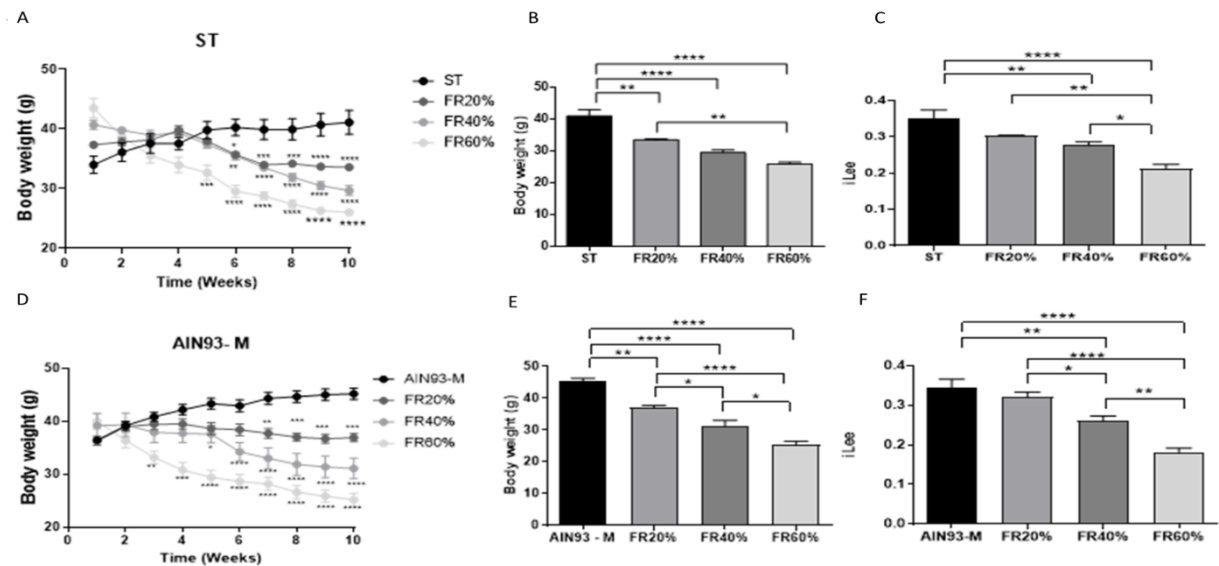


Figure 1. Body Weight. Body weight of mice subjected to food restriction with ST and AIN93-M diet. Weight during the weeks of treatment: ST (A) and AIN93-M (D). Final weight: ST (B) and AIN93-M (E). Lee index: ST (C) and AIN93-M (F). Data are presented as mean ±SEM of 4-7 animals per group; *P<.05, **P<.01, ***P<.001 and ****P<.0001.

The Lee Index agreed with the weight loss of the treated groups in relation to the control, especially those fed with the AIN93-M diet.

Considering the weight of epididymal adipose tissue, it was reduced by FR 40% ($p < .05$) and FR 60% ($p < .01$) in relation to the ST group (standard diet) (Figure 2). Among the groups fed the standard diet, FR 20% and FR 40% presented $p < .05$, as did FR 20% and FR 60%. Restrictions based on AIN93-M were significant at FR 40% ($p < .05$) and FR 60% ($p < .0001$) in relation to the control. Dietary restriction of 20% in relation to FR 40% ($p < 0.1$) and FR 60% ($p < 0.001$) was also relevant when considering the weight of this fabric. Finally, between FR 40% and FR 60% the value expressed was $p < .01$. When considering the weight of subcutaneous, mesenteric and retroperitoneal tissues, only restrictions based on the AIN93-M diet showed a reduction in relation to the control. Body adiposity (ratio of epididymal, mesenteric and retroperitoneal adipose tissues) was decreased in ST ($p < .001$) FR 40% and $p < .01$ for FR 60% compared to ST. The adiposity of the groups fed with the AIN93-M diet was reduced with FR 40% ($p < .01$) and FR 60% ($p < .0001$) compared to the control. Between the FR20% and FR40% groups the statistical difference was $p < 0.01$, whereas when we compare the 20% restriction in relation to the 60% restriction the value is $p < 0.001$.

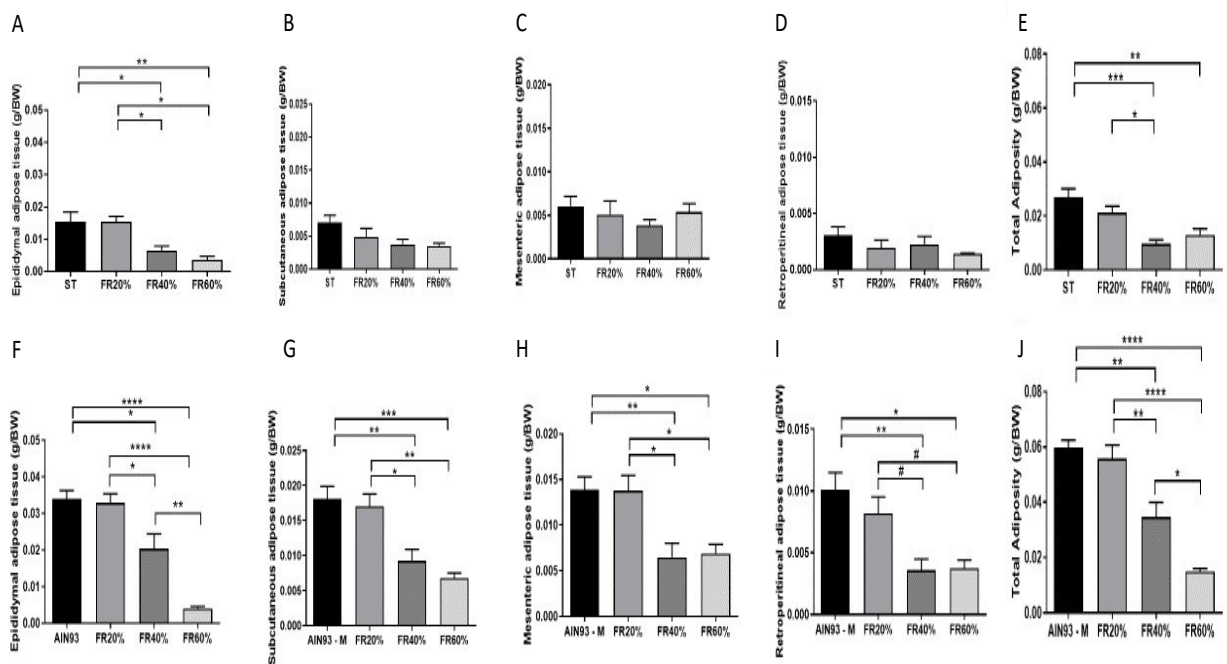


Figure 2. Body composition. Body composition of mice subjected to food restriction with ST and AIN93-M diet. Epididymal adipose tissue weight: ST (A) and AIN93-M (F). Subcutaneous adipose: ST (B) and AIN93-M (G). Mesenteric Adipose: ST (C) and AIN93-M (H). Retroperitoneal Adipose: ST (D) and AIN93-M (I). Total adiposity: ST (E) and AIN93-M (J). Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; * $P < .05$, ** $P < .01$, *** $P < .001$ and **** $P < .0001$.

3.2 Glycemic and biochemical parameters

Glycemic and biochemical parameters are summarized in figure 2. A reduction in glucose intolerance was observed in mice with food restriction by 40% and by 60% compared to the standard diet control. In agreement with this result, the 40% and 60% restrictions based on the AIN93-M diet also reduced glucose intolerance when compared to the control group (Figure 3).

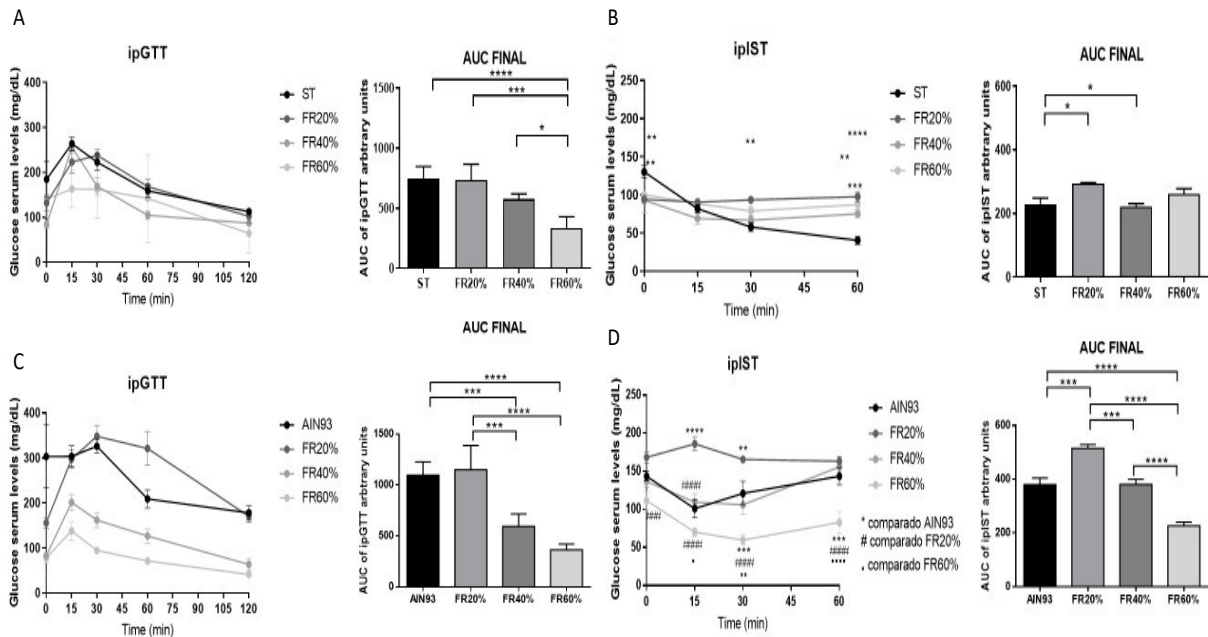


Figure 3. Glycemic. Glucose tolerance test: ST (A) and AIN93-M (C). Insulin sensitivity test: ST (B) and AIN93-M (D). Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; * P <.05, ** P <.01, *** P <.001 and **** P <.0001.

Triglyceride levels were reduced in all restrictions relative to their controls.

HDL parameters were reduced at dietary restrictions of 40% and 60% compared to the ST standard diet. In the restrictions based on the AIN93-M diet, the 60% restriction showed a decrease in HDL in relation to the control group and significance between the groups with a 20% and 40% reduction and also between the 20% restriction when compared to 60%. At 20% restriction (AIN93-M) there was an increase in HDL cholesterol compared to the control (Figure 4).

LDL cholesterol did not change in any restriction group, as well as in relation to the two types of diets used in the experiment.

Albumin from 60% calorie restriction was reduced compared to the control group when it comes to the AIN93-M diet. Regarding the commercial diet, there was a reduction between the 60% restriction and the 40% group.

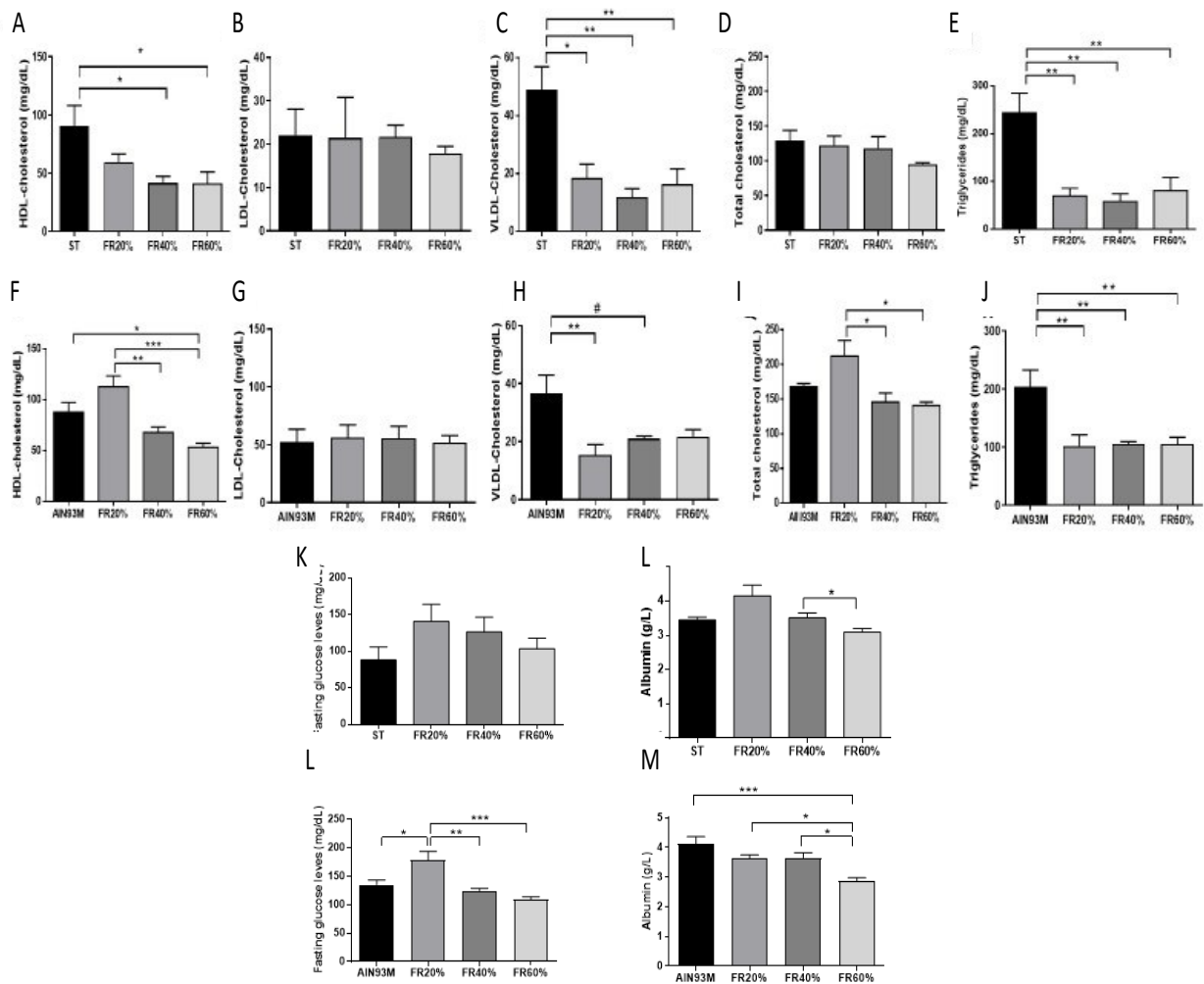


Figure 4. Biochemical parameters. HDL: ST (A) and AIN93-M (F). LDL: ST (B) and AIN93-M (G). VLDL: ST (C) and AIN93-M (H). Total cholesterol: ST (D) and AIN93-M (I) and Triglycerides: ST (E) and AIN93-M (J). Glucose: ST (K) and AIN93-M (L). Albumin: ST (L) and AIN93-M (M). Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; * P <.05, ** P <.01, *** P <.001 and **** P <.0001.

VLDL was reduced in all dietary restrictions when compared to the standard diet control group. There was also a difference between the AIN93-M restriction groups of 20% and 40% compared to the control group.

In relation to glucose, no significant change was observed in relation to the food restriction groups that used the standard diet. In the restrictions that used the AIN93-M diet, it was observed that the 20% restriction group had high glucose in relation to its control.

3.3 Ultrasound, macroscopic and histological analyses

The macroscopic, ultrasonographic, and histological analyses of the epididymal tissue are summarized in Figure 3.

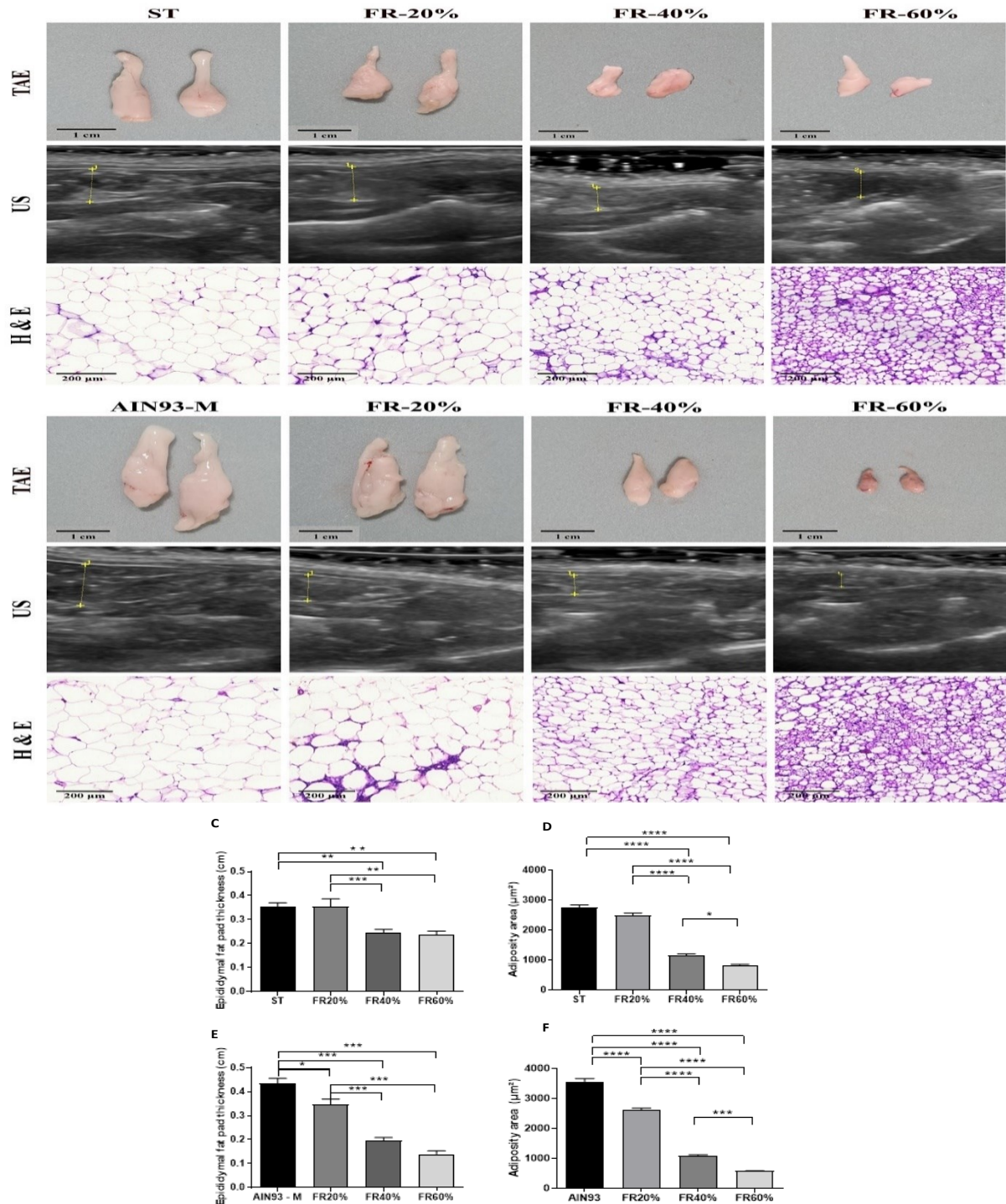


Figure 5. Ultrasound of epididymal adipose tissue, H&E staining and macroscopic images. Macroscopic images of the epididymal adipose tissue, images of the thickness of the epididymal adipose tissue layer and microscopic images of the TAE. Standard Diet -ST: (A). AIN93-M: (B). TAE thickness on ultrasound: ST (C) E AIN93-M (E) and TAE adipocyte area: ST (D) E AIN93-M (F). Data are presented as mean±SEM of 4-7 animals per group; *P<.05, **P<.01, ***P<.001 and ****P<.0001.

The epididymal adipose tissue of mice in both control groups showed normal mesh-like morphology and cells with a peripheral nucleus and a prominent central fat droplet. However, a certain number of multilocular cells can be found present in the 40% and mainly in the 60% restrictions. It was possible to observe a significant decrease in the size of adipocytes depending on the restrictions. The decrease in the size of white fat cells shown in the present study in malnourished rats reinforces the idea that certain circumstances require the use of stored fat in the form of droplets to obtain energy.

3.4 qRT-PCR analysis

To evaluate the effects of restrictions with the AIN93-M diet on genes related to oxidative stress such as GPX1 and GPX4 in epididymal tissue, qRT-PCR analyzes were performed.

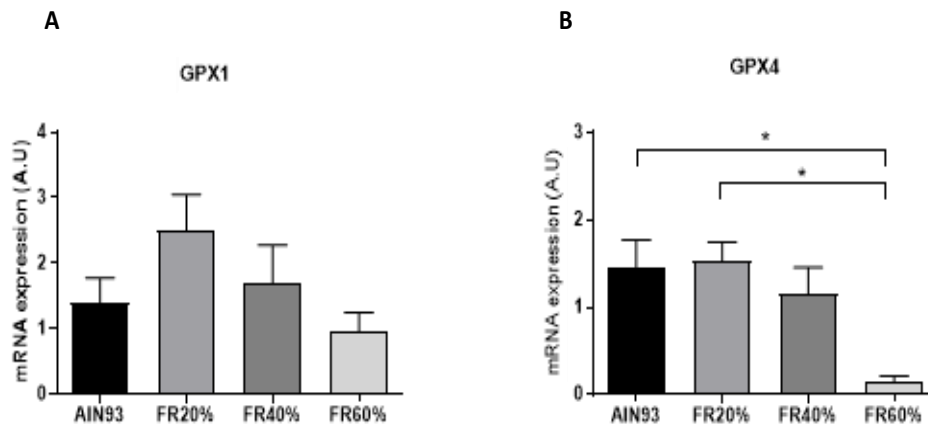


Figure 6. Expression of glutathione peroxidase 1 and glutathione peroxidase (GPX) 4 mRNA from epididymal adipose tissue. GPX1 and GPX4 of the groups subjected to food restriction with the AIN93-M diet. Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; *P<.05, **P<.01, ***P<.001 and ****P<0001.

A decrease in the expression of the GPX4 gene (Figure 4B) was observed in the 60% restriction group in relation to the control ($p < .05$), as well as in relation to the 20% restriction. No statistically significant difference was observed for GPX1 expression (Figure 4A).

4. Discussion

Malnutrition leads to a series of adverse consequences that affect health, body development, and quality of life. These consequences range from the cellular level to the social level, covering different areas of individual and community aspects (16). Undernourishment compromises vital body functions, resulting in weight loss, muscle weakness, fatigue, a weakened immune system, and greater susceptibility to infections. This scenario can lead to the development of chronic diseases, growth retardation, and inadequate physical development (especially in children) (17).

To understand the mechanisms related to malnutrition, it is often necessary to use animal models and feeding methodologies that mimic malnourishment. These models are widely used to assess the effects of undernourishment and other malnutrition-related pathologies. These factors make it possible to analyze the nutritional parameters of model animals in a controlled manner (18).

Few studies report the physiological aspects of malnutrition in animals during the consumption of an experimental diet; the most common being the monitoring of weight loss. The present study compares for the first time the use of a standard industrialized palletized diet with the AIN93-M diet in different percentages of dietary restrictions.

Regarding body parameters, the decrease in weight in different groups of mice subjected to different levels of food restriction under standard or AIN93-M diets may be associated with the reduction in food intake imposed on these animals (19). The reduction in weight of epididymal, retroperitoneal, and mesenteric adipose tissues with increasing dietary restriction may be related to the progressive reduction in food intake offered to animals. Physical changes were also observed in mice fed a restricted diet. In the case of the group with 60% restriction, both with a standard diet and with AIN93-M, such as whitish skin and dull coat, voracious eating, and hunched posture. Hair and skin changes are more common during kwashiorkor malnutrition, in which people experience hair and skin depigmentation and skin lesions (20). There is evidence in the literature demonstrating that dietary restriction reduces fat accumulation (21). The reduction in the weight of adipose tissue was observed gradually in the groups and must be related to the level of dietary restriction, with a significant reduction in the area of adipocytes in the animals' epididymal adipose tissue being observed, indicating more significant results in the restrictions they used. the AIN93-M diet, agreeing with the findings of Pinheiro (2017) and Kirchner (2012). It is known that malnutrition due to dietary restriction and intense hunger produces a series of metabolic changes, which lead to a reduction in body mass, depression of immunocompetence, and changes in the function of the digestive system (23).

The restrictions of 20% and 40% with both diets, in general, agreed with the results of Pinheiro (2017), which highlighted improvements in body composition and some biochemical parameters, since mainly in the AIN93-M control group, they observed if a tendency to be overweight, due to the characteristics of the feed.

Hypoalbumemia was evident in the 60% food restriction group (AIN93-M). This condition is common and serves as an indicator of malnutrition (24). This condition is common and serves as an indicator of malnutrition (25). According to Keller (2019) (34), Albumin is synthesized mainly in the liver. Poor protein and energy intake, impaired synthetic function of the liver, as well as an inflammatory state result in low circulating levels of visceral proteins. During inflammatory states and increased production of acute phase proteins, the liver reprioritizes protein synthesis and decreases visceral protein synthesis like a mirror. In kwashiorkor, hypoalbuminemia has been considered a biochemical abnormality in children with protein deficiencies, presenting signs such as apathy and edema, because its value is very low. Such reduction is not as significant in marasmus, as the vital function of essential tissues is preserved. In some animals in the restriction group, it was possible to observe the presence of edema (33)

The ISTs results showed a smaller curve area in relation to the 60% restriction group (AIN93-M). In relation to IGTs, it was observed both in models with a standard diet and in relation to the AIN93-M diet, the 60% food restriction groups had a marked decrease in the area under the curve. The 40% AIN93-M group showed a drop in the curve in relation to the control, indicating an improvement in the parameter. In the 20% restriction groups in relation to both diet models, an increase in insulin concentration can be observed. However, food restriction models can be stressful for rodents, in which increased levels of corticosterone can cause metabolic changes,

as well as depression and anxiety. (25). Triglyceride levels were reduced in all restrictions relative to their controls. HDL parameters were reduced at dietary restrictions of 40% and 60% compared to the ST standard diet. In the restrictions based on the AIN93-M diet, the 60% restriction showed a decrease in HDL in relation to the control group and significance between the groups with a 20% and 40% reduction and also between the 20% restriction when compared to 60%. In the 20% restriction (AIN93-M) there was an increase in total cholesterol, a fact that can be explained by the increase in HDL cholesterol. Some findings report an improvement in the glucose and lipid profile with dietary restrictions of 20% (9). VLDL was reduced in all dietary restrictions when compared to the standard diet control group. There was also a difference between the AIN93-M restriction groups of 20% and 40% compared to the control group. In relation to the decrease in concentrations of very low-density lipoproteins (VLDL) and triglycerides (TGs), as suggested by Soares et al. (26), this is consistent with reduced food consumption by malnourished animals and lower hepatic synthesis of VLDL, which is an important carrier of TG, and also greater lipid oxidation for energy purposes. Similar data were obtained in previous studies. Madani et al. (27) observed that diets containing low concentrations of casein (10%) provided an evident reduction in the plasma concentration of TG, mainly VLDL. Nassir et al. (28) also found lower concentrations of TG and VLDL.

In the results of the study, it was observed effects of restrictions with the AIN93-M diet on genes related to oxidative stress such as GPX1 and GPX4 in epididymal tissue qRT-PCR analyses were carried out. Glutathione peroxidases are antioxidant enzymes that are essential for balancing the production of reactive oxygen species, such as superoxide anion, hydrogen peroxide, and lipid peroxide, and any change in their structure and function can lead to an increase in such compounds, and increase susceptibility. to some diseases (29).

A decrease in GPX4 gene expression was observed in the 60% restriction group in relation to the control. GPX activity is directly influenced by the individual's nutritional status. Several studies have shown that an inadequate intake of nutrients reduces the activity of some antioxidant enzymes, favoring the appearance of oxidative stress. Therefore, a poor diet causes a decrease in GPX activity, which in turn can affect the cellular response to the action of oxidizing agents and trigger oxidative stress (30).

A study carried out by Sumba and collaborators (2010) with children in Kenya identified that a higher frequency of chronic malnutrition is closely related to low levels of the selenoprotein GPX. Corroborating the study, the information obtained from dietary regulation and the nutritional status of tissue glutathione may be clinically relevant, especially in relation to those diseases where a decrease in tissue glutathione concentrations and the occurrence of oxidative stress are simultaneously involved. A common contributory factor to increased mortality and morbidity is malnutrition (32).

Malnutrition is a serious health condition. Consequently, a better understanding of its mechanisms is necessary, therefore, the standardization of animal models can help us with the prevention and treatment of serious health problems.

5. Conclusion

Malnutrition is a serious health condition. Consequently, a better understanding of its mechanisms is needed; therefore, the use of animal models and good dietary protocols are necessary

The present work reproduced malnutrition models with male Swiss mice based on different percentages of food restriction, using two types of diet: Purina and Ain93-M. For the first time, we characterized the impact of this comparison on body, biochemical, and morphometric parameters. The characterization observed several clinical parameters that are also found in human malnutrition, such as decreased weight and biochemical changes in serum.

Given the results obtained, it is concluded that all restrictions were capable of generating restriction-dependent metabolic changes, however, the protocol based on 60% restriction was capable of inducing a state of malnutrition within 10 weeks. The AIN93-M diet proved to be the best diet for carrying out this protocol. Through this model, it was possible to obtain a reduction in body weight, biochemical changes in the study animals, such as in the lipid profile (triglycerides and HDL) and hypoalbuminemia, as well as histopathological changes, such as a decrease in the area of adipocytes in the epididymal adipose tissue. The presence of increased oxidative stress was observed in this restriction group, through the evaluation of the GPX4 gene.

As limitations of the study, we must mention the need to deepen the biochemical evaluation, as well as other investigations into other tissues such as the liver and muscle in the face of pathology.

As a perspective, the Ain93-M 60% restriction model emerges as an interesting tool for studies on malnutrition.

Author contributions

ATM, VHG and SHSS designed the study. ATM wrote the manuscript. ATM, and SLR performed the experiments. VHG and ATM did the statistical analysis and graphic design and figures. ATM and VHG performed experimental analyses. LCF, ALSG, AMBP, and SHSS reviewed the manuscript for important intellectual content. All data was generated internally. All authors agree to be responsible for all aspects of the work ensuring integrity and accuracy. The authors gave final approval of the version to be submitted.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this article.

Ethics approval

All applicable institutional and/or national guidelines for the care and use of animals were followed.

Author's Declaration of Credit

All data was generated internally and no paper mills or AI were used. All authors agree to be responsible for all aspects of the work, ensuring integrity and accuracy.

Interest conflicts

The authors declare that there are no competing interests.

Acknowledgments

This work was partially supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Minas Gerais State Research Support Foundation (FAPEMIG).

References

1. Corish CA.; Bardon LA. Malnutrition in older adults: screening and determinants. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 78, p. 372–379, 2019.
2. Schapoo S. Fome e Insegurança Alimentar em tempos de Pandemia da Covid-19. *Alimentação, Abastecimento e Crise*, v. 23, 2021.
3. Paes TF, Costa PS, Amaral EE. Validation of a Feed Protocol in a Mouse Model That Mimics Marasmic Malnutrition. *Front Vet Sci*. 2021 Nov 29; 8:757136. doi: 10.3389/fvets.2021.757136. PMID: 34912875; PMCID: PMC8666711.
4. Fao. et al. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2018. Building climate resilience for food security and nutrition*. Rome. 2018.
5. Fao. et al. *The State of Food Insecurity in the World 2015. PROGRESS.*, M. T. I. H. T. T. S. O. U. Rome.FAO. 2015.
6. Fao et al. *The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all*. FAO. Rome, FAO.: <https://doi.org/10.4060/cb4474en> p. 2021.
7. Deboer MD. Lima AA. M.; Oria RB.; Scharf RJ.; Moore SR.; Luna M.A.; Guerranti R L. Deficiência de crescimento na primeira infância e as origens do desenvolvimento da doença adulta: infecções entéricas e desnutrição aumentam o risco de síndrome metabólica. *USA: Nutr Rev*, 2021.
8. Salameh E. et al. *Animal Models of Undernutrition and Enteropathy as Tools for*

Assessment of Nutritional Intervention. *Nutrients*, v.11, n. 9, p. 2233, 2019.

9. Pinheiro TA, Barcala-Jorge AS, Andrade JMO, Pinheiro TA, Ferreira ECN, Crespo TS, Batista-Jorge GC, Vieira CA, Lelis DF, Paraíso AF, Pinheiro UB, Bertagnolli M, Albuquerque CJB, Guimarães ALS, de Paula AMB, Caldeira AP, Santos SHS. Obesity and malnutrition similarly alter the renin-angiotensin system and inflammation in mice and human adipose. *J Nutr Biochem*. 2017 Oct; 48:74-82. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.06.008. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28779634.
10. Rice MC e O'brien SJ, 1980. Genetic variation of laboratory breeds Swiss rats. *Nature*, 283 (5743), 157–161.
11. Águila MB, Loureiro CC, Pinheiro AR. Lipid metabolism of rats fed different types of lipids. *Arq Bras Cardiol* 2002, 78(1): 25-31.
12. Araújo GG, Araújo MB, D'Angelo RA, Manchado FB, Mota CSA, Ribeiro C, Mello MAR. Maximum stable lactate phase in obese rats of both genders. *Rev Bras Med Esporte* 2009, 15(1): 46-49.
13. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;6 (18): 499–502. <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499>.
14. Santos SH et al. ,2012. Increased circulating angiotensin-(1-7) protects white adipose tissue against the development of a pro-inflammatory state stimulated by a high-fat diet. *Regulatory Peptides*,178 (1–3), 64–70. Sanyal, AJ, et al., 2001. Non-alcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology*, 120 (5), 1183–1192
15. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
16. Valente E. The use of antioxidants in disease prevention. 2022. 96 p. Dissertation (Masters in Pharmaceutical Sciences) - Faculty of Health Sciences, Fernando Pessoa University, Porto, 2022. Available at: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4410/4/PPG_ElisabeteValente.pdf Accessed at: 11 Aug 2023.
17. Ibrahim MK et al. Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 4, p. 919-971, 2 ago. 2017.
18. Katona P, Katona-Apte J. The interaction between nutrition e infecion. *Clin Infect Dis*. (2008) 46:1582–8. doi: 10.1086/587658.
19. Sharp S, Poglitsch M, Zilla P, Davies NH, Sturrock ED. Pharmacodynamic effects of C-domain specific ACE inhibitors on the renin-angiotensin system in rats with myocardial infarction. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2015; 16:1149–58.
20. Benjamin O, Lappin SL. Kwashiorkor. [Atualizado em 19 de julho de 2020]. *StatPearls*. Ilha do Tesouro, FL: StatPearls (2021).

21. Souza AP, Sobrinho DB, Almeida JF, Alves GM, Macedo LM, Porto JE, et al. The blocked a receptor type 1 da angiotensin II feed and vasolditation a induced for angiotens (1–7) emhearth mices hipertrofic. 125:449–59. 7].
22. Kirchner H, Hofmann SM, Fischer-Rosinsky A, Hembree J, Abplanalp W, Ottaway N, e outros. A restriction caloric influence cronic and programation and mices. Diabetes 2012; 61:2734–42.
23. Boza JJ, Moënoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsché R, Donnet A, Schiffrin EJ, Perruisseau G, Balleve O. A privation. Feeding and refeeding influence the growth, nutrient retention and functional recovery of rats. J Nutr. 1999 out/nov;129(7):1340-1346.
24. Onyeneke EC, Njoya HK, Ebot MN, Uchungo GA, Eriyamremu GE, Alumanah EO. Liver function status in some nigerian children with protein energy malnutrition. Orient Journal of Medicine 15: 58-63, 2003.
25. Mehus AA, Picklo MJ. Brain and Hepatic Mt mRNA Is Reduced in Response to Mild Energy Restriction and n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Deficiency in Juvenile Rats. Nutrients, v. 9, p. 1145, 2017.
26. Soares JKB, Bion FM, Nascimento E, Medeiros MC, Pessoa DCN, Queiroz PMA. Prática de swin mices, caloric restriction. Rev Bras Ciênc Mov. 2011 mar;19(3):58-68.
27. Madani S, Prost J, Belleville J. 1. The level and origin of dietary protein (casein and highly purified soy protein) affect hepatic storage, plasma lipid transport and antioxidant defense status in the rat. Nutrition. 2000 May/Jun;16(5):368-375.
28. Nassir F, Moundras C, Bayle D, Serougne C, Gueux E, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A. Effect of selenium deficiency on hepatic lipid and lipoprotein metabolism in rats. Brit J Nutr. 1997 mar;78(3):493-500. 46. Shaw HM, Huang CJ.
29. Al-Thae OH et. al. J. Expression Profiling and Genetic Alterations of theSelenoproteins GI-GPx and SePP in Colorectal Carcinogenesis. Nutr. Cancer, v. 48, n. 1, p. 6 – 14, 2004.
30. Vivanco RHC, et. al. Variations in erythrocyte osmotic fragility in cattle grazing on grasslands with low selenium content and supplemented or not with selenium. Scientific Magazine, vol. XVI, no. 3, pp. 227-231. 2010
31. Sumba PO et al. Microgeographic variations in Burkitt's lymphoma incidence correlate with differences in malnutrition, malaria and Epstein-Barr virus. Br J Cancer; 103(11): 1736–1741,2010.
32. Bray TM, Taylor, CG. Tissue glutathione, nutritionand oxidative stress. Can. J. Pharmacol. 71, 746-751, 1993.
33. Maicá A, Schweigert I. Avaliação nutricional em pacientes graves. Rev Bras Ter
34. Keller U. Nutritional Laboratory Markers in Malnutrition. J Clin Med. 2019 May 31;8(6):775. doi: 10.3390/jcm8060775. PMID: 31159248; PMCID: PMC6616535.

Figure Legends:

Figure 1. Body Weight. Body weight of mice subjected to food restriction with ST and AIN93-M diet. Weight during the weeks of treatment: ST (A) and AIN93-M (D). Final weight: ST (B) and AIN93-M (E). Lee index: ST (C) and AIN93-M (F). Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; *P<.05, **P<.01, ***P<.001 and ****P<0001.

Figure 2. Body Composition. Body composition of mice subjected to food restriction with ST and AIN93-M diet. Epididymal adipose tissue weight: ST (A) and AIN93-M (F). Subcutaneous adipose: ST (B) and AIN93-M (G). Mesenteric Adipose: ST (C) and AIN93-M (H). Retroperitoneal Adipose: ST (D) and AIN93-M (I). Total adiposity: ST (E) and AIN93-M (J). Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; *P<.05, **P<.01, ***P<.001 and ****P<0001.

Figure 3. Glycemic. Glucose tolerance test: ST (A) and AIN93-M (C). Insulin sensitivity test: ST (B) and AIN93-M (D). Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; *P<.05, **P<.01, ***P<.001 and ****P<0001.

Figure 4. Biochemical parameters. HDL: ST (A) and AIN93-M (F). LDL: ST (B) and AIN93-M (G). VLDL: ST (C) and AIN93-M (H). Total cholesterol: ST (D) and AIN93-M (I) and Triglycerides: ST (E) and AIN93-M (J). Glucose: ST (K) and AIN93-M (L). Albumin: ST (L) and AIN93-M (M). Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; *P<.05, **P<.01, ***P<.001 and ****P<0001.

Figure 5. Ultrasound of epididymal adipose tissue, H&E staining and macroscopic images. Macroscopic images of the epididymal adipose tissue, images of the thickness of the epididymal adipose tissue layer and microscopic images of the TAE. Standard Diet -ST: (A). AIN93-M: (B). TAE thickness on ultrasound: ST (C) E AIN93-M (E) and TAE adipocyte area: ST (D) E AIN93-M (F). Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; *P<.05, **P<.01, ***P<.001 and ****P<0001.

Figure 6. Expression of glutathione peroxidase 1 and glutathione peroxidase (GPX) 4 mRNA from epididymal adipose tissue. GPX1 and GPX4 of the groups subjected to food restriction with the AIN93-M diet. Data are presented as mean \pm SEM of 4-7 animals per group; *P<.05, **P<.01, ***P<.001 and ****P<0001.

5 CONCLUSÃO

A desnutrição é uma condição grave de saúde. Consequentemente, é necessária uma melhor compreensão dos seus mecanismos; portanto, o uso de modelos animais e bons protocolos alimentares podem nos ajudar diante do exposto.

O presente trabalho, reproduziu modelos de desnutrição com camundongos machos *Swiss* baseado em diferentes porcentagens de restrição alimentar, utilizando dois tipos de dieta: Purina e Ain93-M. Pela primeira vez, caracterizou o impacto desta comparação em parâmetros corporais, bioquímicos e morfométricos. A caracterização observou vários parâmetros clínicos que também são encontrados na desnutrição humana, como diminuição do peso e alterações bioquímicas no soro.

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que todas as restrições foram capazes de gerar alterações metabólicas grau-dependente de restrição, no entanto, o protocolo baseado na restrição de 60% foi capaz de induzir um estado de desnutrição, em 10 semanas. A dieta AIN93-M apresentou-se como a melhor dieta para a condução deste protocolo. Através deste modelo foi possível obter redução do peso corporal, alterações bioquímicas nos animais do estudo, como no perfil lipídico (triglicerídeos e HDL) e hipoalbumemia, assim como alterações histopatológicas, como a diminuição da área dos adipócitos do tecido adiposo epididimal. Foi observado a presença de aumento do estresse oxidativo neste grupo de restrição, através da avaliação do gene GPX4.

Como limitações do estudo devem-se citar a necessidade de aprofundar a avaliação bioquímica, assim como outras investigações diante de outros tecidos como o fígado e músculo diante da patologia.

Como perspectiva, o modelo de restrição de 60% Ain93-M emerge como uma ferramenta interessante para estudos acerca da desnutrição.

REFERÊNCIAS

1. Abo-Shousha SA, Hussein MZ, Rashwan IA, Salama M (2005) Production of proinflammatory cytokines: granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-8 and interleukin-9 by peripheral blood mononuclear cells of protein energy malnourished children. *Egypt J Immunol* 12(1):125–131
2. Aires, MM. *Fisiologia básica*. Rio de Janeiro: Koogan, 2022.
3. Águila MB, Loureiro CC, Pinheiro AR. Metabolismo lipídico de ratos alimentados com diferentes tipos de lipídios. *Arq Bras Cardiol* 2002, 78(1): 25-31.
4. Araújo GG, Araújo MB, D'Angelo RA, Manchado FB, Mota CSA, Ribeiro C, Mello MAR. Máxima Fase estável de Lactato em ratos obesos de Ambos os gêneros. *Rev Bras Med Esporte* 2009, 15(1): 46-49.
5. Andrikopoulos S, 2008. Avaliação do teste de tolerância à glicose em ratos. *Revista Americana de Fisiologia, Endocrinologia e Metabolismo*, 295 (6), E1323–32. Corish CA.; Bardon LA. Malnutrition in older adults: screening and determinants. *Proceedings of the Nutrition Society*, v. 78, p. 372–379, 2019.
6. Barthey, M. *Desigualdade na saúde: teorias, conceitos e métodos*. Cambridge: Polity Press, 2020.
7. Belchior ACS.; Angeli JK.; Faria T.; Siman FDM.; Silveira EA.; Meira EF.; Costa CP.; Vassallo DV.; Padilha ASA desnutrição proteica pós-desmame aumenta a pressão arterial e induz disfunções endoteliais em ratos. *EUA: PLoS One*, 2022.
8. Benjamin O, Lappin SL. Kwashiorkor. [Atualizado em 19 de julho de 2020]. *StatPearls*. Ilha do Tesouro, FL: StatPearls (2021).
9. Boza JJ, Moënnoz D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D, Fritsché R, Donnet A, Schiffrin EJ, Perruisseau G, Balleve O. A privação alimentar e a realimentação influenciam o crescimento, a retenção de nutrientes e a recuperação funcional de ratos. *J Nutr*. 1999 out/nov;129(7):1340-1346.
10. Brasil.M.S.. Programa de Combate às Carências Nutricionais – PCCN/ Ministério da Saúde. Brasília: Editora MS, 2001.
11. Chagas DC, Silva AAM, Batista RFLB, Simões VMF, Lamy ZC, Coimbra LC, Alves MTSSB. Prevalência e fatores associados à desnutrição e ao excesso de peso em menores de cinco anos nos seis maiores municípios do Maranhão. *Rev Bras Epidemiologia*. 2013 Jan;16(1):146-156.
12. Costa, NMB., et al. *Nutrição experimental: Teoria e prática*. 1 ed, Rio de Janeiro: Rubio, 2014

13. Deboer MD, Lima AA. M.; Oria RB.; Scharf RJ.; Moore SR.; Luna M.; Guerranti R L. Deficiência de crescimento na primeira infância e as origens do desenvolvimento da doença adulta: infecções entéricas e desnutrição aumentam o risco de síndrome metabólica. USA: Nutr Rev, 2021.
14. Dipasquale V; Cuccinota U; Romano C.. Acute Malnutrition in Children: Pathophysiology, Clinical Effects and Treatment. *Nutrients*, v. 12, n. 8, p. 1- 9, 2020.
15. Fagundes DJ, Plapler, H. Estudo da absorção de glicose no intestino delgado e cólon em ratos pela adaptação do método de Sols e Ponz. São Paulo: Rev Esp Fisiol, 2021.
16. Fao. et al. The State of Food Security and Nutrition in the World 2018. Building climate resilience for food security and nutrition. Rome. 2018.
17. Fao. et al.. The State of Food Insecurity in the World 2015. . PROGRESS., M. T. I. H. T. T. S. O. U. Rome.FAO. 2015.
18. Fao et al. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition and affordable healthy diets for all. . FAO. Rome, FAO. : <https://doi.org/10.4060/cb4474en> p. 2021.
19. Ferreira-Paes T, Seixas-Costa P, Almeida-Amaral EE. Validation of a Feed Protocol in a Mouse Model That Mimics Marasmic Malnutrition. *Front Vet Sci*. 2021 Nov 29;8:757136. doi: 10.3389/fvets.2021.757136. PMID: 34912875; PMCID: PMC8666711.
20. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clinical Chemistry*. 1972;6 (18): 499–502. <https://doi.org/10.1093/clinchem/18.6.499>.
21. Gerude MF. et al. *Terapia Nutricional*. São Paulo: Atheneu, 2002.
22. Gioulbasanis I, Patrikidou A, Kitikidou K et al (2012) Baseline plasma levels of interleukin-8 in stage IV non-small-cell lung cancer patients: relationship with nutritional status and prognosis. *Nutr Cancer* 64(1):41–47
23. Grantham M, et al. Child development in developing countries 1 Developmental potential in the first 5 years for children in. *Lancet*, v. 369, p. 60–70, 2007.
24. Headey D. et al. Impacts of COVID-19 on childhood malnutrition and nutrition-related mortality. *The Lancet*, v. 396, n. 10250, p. 519–521, 2020.
25. Ibrahim MK et al. . Impact of Childhood Malnutrition on Host Defense and Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 4, p. 919-971, 2 ago. 2017.
26. Jaki T, e Wolfsegger, MJ, 2009. Uma estrutura teórica para estimação de AUCs em desenhos amostrais completos e incompletos. *Estatísticas em pesquisa*

biofarmacêutica, 1 (2), 176–184.

27. Jahng, JW. et al. Chronic food restriction in young rats results in depression- and anxiety-like behaviors with decreased expression of serotonin reuptake transporter. *Brain Res*, v. 1150, p. 100–107, 2007.
28. Katona P, Katona-Apte J. A interação entre nutrição e infecção. *Clin Infect Dis*. (2008) 46:1582–8. doi: 10.1086/587658.
29. Keller U. Nutritional Laboratory Markers in Malnutrition. *J Clin Med*. 2019 May 31;8(6):775. doi: 10.3390/jcm8060775. PMID: 31159248; PMCID: PMC6616535.
30. Khare M, Mohanty C, Das BK, Jyoti A, Mukhopadhyay B, Mishra SP. Radicais livres e status antioxidante na desnutrição protéico-energética. *Int J Pediatr*. 2014;2014:254396.
31. Kirchner H, Hofmann SM, Fischer-Rosinsky A, Hembree J, Abplanalp W, Ottaway N, e outros. A restrição calórica prejudica cronicamente a programação metabólica em camundongos. *Diabetes* 2012;61:2734–42
32. Kobylinska M, Antosik K, Decyk A, Kurowska K. Malnutrition in obesity: Is it Possible? [Internet]. *Obes Facts*. 2022 [Citado em 29 de set 2022];15:19-25. Disponível: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34749356>.
33. Krzanowski M, Krzanowska K, Dumnicka P et al (2018) Elevated circulating osteoprotegerin levels in the plasma of hemodialyzed patients with severe artery calcification. *Ther Apher Dial* 22(5):519–529.
34. Lacerda EMA , et al.. *Práticas de Nutrição Pediátrica*. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.
35. Lewis ES, et al. Nutrition. In: SUCKOW, M. A., WEISBROTH, S.H., FRANKLIN, C.L. *The laboratory rat*. American College of Laboratory Animal Medicine, Pages 53–70, 2006.
36. Lien EL. Comparison of AIN-76A and AIN-93G diets: a 13-week study in rats. *Food Chemical Toxicological*, n. 39, v. 4, p. 385-92, 2001.
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8.
38. Madani S, Prost J, Belleville J. O nível e a origem da proteína dietética (caseína e proteína de soja altamente purificada) afetam o armazenamento hepático, o transporte de lipídios plasmáticos e o estado de defesa antioxidante no rato. *Nutrição*. 2000 Maio/Jun;16(5):368-375.
39. Mahan LK.; Escott S. Krause: *Alimentos, Nutrição e Dietoterapia*. 12 ed. São Paulo: Elsevier, 2020.
40. Maicá A, Schweigert I. Avaliação nutricional em pacientes graves. *Rev Bras Ter*

41. Mărginean C, Man L, Pitea A et al (2013) The assessment between IL-6 and IL-8 and anthropometric status in malnourished children. *Rom J Morphol Embryol* 54(4):935–938.
42. Marques E, Torres H. *Segregação, pobreza e desigualdades sociais*. São Paulo: Senac, 2021.
43. Monteiro CA. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estud Av.* 2003 Maio/Ago;17(48):7-20. 8.
44. Moura AMA. Nutrição de roedores de laboratório: paradigmas e desafios. *Resbcal*, São Paulo, v.2, n.4, p. 288-296, 2014. MOURA, L.P. et al. Dietary restriction, caloric value and the accumulation of hepatic fat. *Lipids in health and disease*, v.11, n.2, 2012.
45. Myers GL, Núñez, IN. et al. Effect of a probiotic fermented milk on the thymus in Balb/c mice under non-severe protein – energy malnutrition. *British Journal of Nutrition*, v.110, p. 500–508, 2013.
46. Nassir F, Moundras C, Bayle D, Serougne C, Gueux E, Rock E, Rayssiguier Y, Mazur A. Efeito da deficiência de selênio no metabolismo lipídico e lipoproteico hepático no rato. *Brit J Nutr.* 1997 mar;78(3):493-500. 46. Shaw HM, Huang CJ.
47. Onyeneke EC, Njoya HK, Ebot MN, Uchungo GA, Eriyamremu GE, Alumanah EO. Liver function status in some nigerian children with protein energy malnutrition. *Orient Journal of Medicine* 15: 58-63, 2003.
48. Paes TF, Costa PS, Amaral EE. Validation of a Feed Protocol in a Mouse Model That Mimics Marasmic Malnutrition. *Front Vet Sci.* 2021 Nov 29;8:757136. doi: 10.3389/fvets.2021.757136. PMID: 34912875; PMCID: PMC8666711.
49. Pan F, et al. Predominant gut *Lactobacillus murinus* strain mediates anti inflammaging effects in calorie-restricted mice. *Microbiome*, v. 6, n. 54, p. 1–17, 2018.
50. Park C, et. al. Efeitos da restrição calórica leve no metabolismo lipídico e inflamação no fígado e tecido adiposo. USA: *Biochem Biophys Res Commun*, 2021.
51. Pedraza DF, Rocha ACD, Sales MC. Deficiência de micronutrientes e crescimento linear: revisão sistemática de estudos observacionais. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2013 nov;18(11):3333-3347.
52. Pham TP, Alou MT, Golden MH, Million M, Raoult D. Diferença entre kwashiorkor e marasmo: meta-análise comparativa de características patogênicas e implicações para o tratamento. *Micróbio Pathog.* (2021) 150:104702. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104702.
53. Phillips MB, Foley AL, Bernard R et al (2010) Nutritional screening in community-dwelling older adults: a systemic literature review. *Asia Pac J Clin Nutr* 19(3):440–449
54. Pinheiro TA, Barcala-Jorge AS, Andrade JMO, Pinheiro TA, Ferreira ECN, Crespo TS, Batista-Jorge GC, Vieira CA, Lelis DF, Paraíso AF, Pinheiro UB, Bertagnolli M,

- Albuquerque CJB, Guimarães ALS, de Paula AMB, Caldeira AP, Santos SHS. Obesity and malnutrition similarly alter the renin-angiotensin system and inflammation in mice and human adipose. *J Nutr Biochem*. 2017 Oct;48:74-82. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.06.008. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28779634.
55. Rice MC, O'Brien SJ, 1980. Variância genética de raças de laboratório Ratos suíços. *Natureza*, 283 (5743), 157–161.
 56. Salameh E et al. Animal Models of Undernutrition and Enteropathy as Tools for Assessment of Nutritional Intervention. *Nutrients*, v.11, n. 9, p. 2233, 2019.
 57. Sampaio IC, Medeiros PHQS, Rodrigues FAP, Cavalcante PA, Ribeiro SA, Oliveira JS, Prata MMG,; Costa DVS, Fonseca FGC, Guedes MM. Impacto da desnutrição aguda no crescimento, morfologia ileal e transporte de nutrientes em um modelo murino. USA: *Braz J Med Biol Res*, 2021.
 58. Santos SH et al. ,2012. O aumento da angiotensina-(1-7) circulante protege tecido adiposo branco contra o desenvolvimento de um estado pró-inflamatório estimulado por uma dieta rica em gordura. *Peptídeos reguladores*, 178 (1–3), 64–70. Sanyal, AJ, e outros, 2001. Esteatohepatite não alcoólica: associação de insulina resistência lin e anormalidades mitocondriais. *Gastroenterologia*, 120 (5), 1183–1192.
 59. Schapoo S. Fome e Insegurança Alimentar em tempos de Pandemia da Covid-19. *Alimentação, Abastecimento e Crise*, v. 23, 2021.
 60. Sharp S, Poglitsch M, Zilla P, Davies NH, Sturrock ED. Efeitos farmacodinâmicos dos inibidores da ECA específicos do domínio C no sistema renina-angiotensina em ratos com infarto do miocárdio. *J Renin Angiotensina Aldosterona Syst*. 2015;16:1149–58.
 61. Shakersain B, Santoni G, Faxén-Irving G et al (2016) Nutritional status and survival among old adults: an 11-year population-based longitudinal study. *Eur J Clin Nutr* 70:320–325
 62. Silva S et al. Efeito Hepatoprotetor do Consumo Crônico de Dieptanoína e Trieptanoína contra a Esteatose em Ratos. *Arquivo Brasileiro de endocrinologia*, pp 52 a 57, 2008.
 63. Soares JKB, Bion FM, Nascimento E, Medeiros MC, Pessoa DCN, Queiroz PMA. Prática de natação, consumo de aguardente e restrição alimentar em ratos adolescentes: alterações nutricionais e metabólicas. *Rev Bras Ciênc Mov*. 2011 mar;19(3):58-68.
 64. Sofia 2021. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2021. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. Transforming food systems for food security, improved nutrition, and affordable healthy diets. Rome, FAO.
 65. Souza AP, Sobrinho DB, Almeida JF, Alves GM, Macedo LM, Porto JE, et al. O bloqueio do receptor tipo 1 da angiotensina II restaura a vasodilatação coronária induzida pela angiotensina (1–7) em corações hipertróficos de ratos. 125:449–59. 7].

66. Takele Y, Adem E, Getahun M et al (2016) Malnutrition in healthy individuals results in increased mixed cytokine profiles, altered neutrophil subset and function. PLoS ONE 11(8):e0157919
67. Valente E. O uso de antioxidantes na prevenção da doença. 2022. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2022. Disponível em: https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4410/4/PPG_ElisabeteValente.pdf Acesso em: 11 Ago 2023.
68. Victoria CG, et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. *The Lancet*, v. 371, n. 9609, p. 340–357, 2008. VICTORA, C. G. et al. Worldwide timing of growth faltering: revisiting implications for interventions. *Pediatrics*, v. 125, p. e473–80, 2010.
69. Victoria CG et al. Worldwide timing of growth faltering: revisiting implications for interventions. *Pediatrics*, v. 125, p. e473–80, 2010.
70. World Health Organization (WHO). Complementary feeding of young children in developing countries: a Review of Current Scientific knowledge. Geneva, 1998.
71. World Health Organization. Children: improving survival and well-being. WHO: 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/children-reducing-mortality>. Acesso em: 01 março 2022.
72. World Health Organization. Underweight among children under 5 years of age (number in millions) (JME). WHO, 2022. Disponível em: [https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/gho-jmeunderweight-numbers-\(in-millions\)](https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/gho-jmeunderweight-numbers-(in-millions)). Acesso em: 31 de maio de 2022.
73. World Food Programme. HungerMap LIVE: Global insights and key trends. WFP, 2022. Disponível em: <https://hungermap.wfp.org/global-summary.pdf> (hungermapdata.org). Acesso em: 29 julho 2022.
74. Unicef, Who, World Bank Group. Levels and trends in child malnutrition. Joint Child Malnutrition Estimates, edition 2021.

ANEXOS

ANEXO - Parecer Comissão de Ética em Experimentação e Bem-estar animal



Universidade Estadual de Montes Claros
Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar
Animal da Unimontes
CEEBEA



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 235, relativo ao projeto intitulado "EFEITOS DOS EXTRATOS VEGETAIS E COMPOSTOS BIOATIVOS DO CAFEEIRO SOBRE OS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS, METABÓLICOS E SOMÁTICOS EM MODELO DE DESNUTRIÇÃO EM CAMUNDONGOS" - Coordenador: Prof. Dr. Sérgio Henrique Sousa Santos está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pela Comissão de Ética em Experimentação e Bem-Estar Animal da Unimontes, e encontra-se **APROVADO**.

A quantidade total de animais aprovado pelo CEEBEA para este projeto foi de 64 animais.

Este certificado é válido por cinco anos após sua aprovação.

Com data prevista para 30/09/2021 e termino em 30/08/2023.

Montes Claros, 03 de setembro de 2021.

Profª Drª Antonia de Maria Filha Ribeiro
Coordenadora do CEEBEA/UNIMONTES

Drª Antonia de Maria Filha Ribeiro
Zootecnista - CRP/02 - 0057

Ao retornarmos as atividades presenciais todos os documentos como CD, protocolo, projeto impresso, memorando ou Ata do departamento deverão ser entregue a CEEBEA/Pró-Reitoria de Pesquisa.