UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

**Avaliação do ciclo celular de células hematopoiéticas da
medula óssea de camundongos submetidos à
desnutrição protéica**

Francisco Erivaldo Vidal Barros

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profª Dra. Primavera Borelli

São Paulo
2007

Francisco Erivaldo Vidal Barros

**Avaliação do ciclo celular de células hematopoiéticas da
medula óssea de camundongos submetidos à
desnutrição protéica**

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a Dra. Primavera Borelli
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

Ao meu pai, José Erivaldo de Paiva Barros.

Pelo exemplo de comportamento com respeito às pessoas e à família, com dedicação e perseverança aos seus ideais e, principalmente, com tranquilidade e confiança em momentos difíceis.

À Maria do Socorro Vidal Barros, minha mãe, meu exemplo de luta, meu primeiro contato com o amor.

Pela entrega amorosa à família, proporcionando um bem estar que nos faz acreditar em sonhos e resistir aos percalços do caminho.

À Maria da Glória Teixeira de Sousa, minha cúmplice, minha família, perpetuação do amor em minha vida.

Sentimento cívico à flor da pele, muito humana. Em nossa recente vida, sempre com atuação decisiva em momentos cruciais. Estímulo às boas ações.

À Erival de Paiva Barros (*in memorian*), minha avó. Consistente parcela em
minha educação social e cultural. Saudades...

Às minhas irmãs, Ester Vidal Barros e Erival Vidal Barros.

Com carinho, amizade e companheirismo constante contribuíram para a minha
formação pessoal.

Ao meu irmão João José Vidal Barros, por enfrentarmos os momentos difíceis
juntos, sem nunca abdicarmos do respeito fraterno e da amizade que nos une.

Agradecimentos

A Deus, pela saúde, pela família, pelos amigos, por tudo. Agradeço sempre ao Senhor.

À Prof^a Dra Primavera Borelli, pela orientação, pela confiança, pelos ensinamentos profissionais e em pesquisa, mas principalmente por me confidenciar, e até de me fazer participar na demonstração de seu amor incondicional à Hematologia, ao seu ensino e a formação de profissionais. Meu eterno respeito.

Ao Giovani Fávero, o mais oportuno amigo que já tive. Apareceu em um momento em que este trabalho parecia não ser viável. Hoje exponho o digníssimo. Com raciocínio sagaz proporcionou tranquilidade neste caminho. Acima de tudo Rubro-Negro. Grande amigo. Proporcionou-me conhecer Prof^o Roger Chammas.

Ao Prof^o Dr Roger Chammas, pela disponibilização de seu laboratório, pelos ensinamentos sobre pesquisa e sua acessibilidade, e pela atenção e valiosa colaboração na realização deste trabalho.

Às Dras Beatriz Beutler, Gracia Martinez e Juliana Pereira, pela disponibilização de seu laboratório, pelo valioso ensinamento em Hematologia e de dedicação à Hematologia, assim como pelo aprendizado ao uso da Citometria de Fluxo. Admiro-as.

À minhas amigas Karina e Amanda, que tiveram participação efetiva na realização de experimentos deste trabalho, demonstrando muita consideração por mim, assim como elogiável senso de ajudar ao próximo. Muito grato.

Ao amigo Ricardo Ambrósio Fock. Alegre. Participativo em discussões de problemas comuns à profissão, ao ensino e a vida. Hematologista que tem meu respeito. Agradeço aos auxílios na elaboração deste trabalho.

Ao meu amigo Marcelo pela sua simples presença, que faz acreditar na amizade, na pesquisa, na sinceridade das ações. Feliz por ter conquistado esta amizade.

À Andréia e Luciana, amigas que sempre se prontificaram a ajudar. Boas amizades conquistadas.

Ao Marco Aurélio Ramirez Vinolo, pela amizade, pela grande colaboração na realização de experimentos e do processo de desnutrição dos animais, e por ter compartilhado conhecimentos na pesquisa.

À dona Lucila, Carla, Graciela, Satiko e Dra Cinthia, agradeço a amizade e aos diversos momentos agradabilíssimo no laboratório de Imunopatologia. Assim como pela experiência e apredizado em citometria de fluxo.

Aos demais amigos do Laboratório de Hematologia Experimental: Profº Altair, Fernanda Bento, Maria Emília, Mariana e Mariana Akemi, pela colaboração e pelos momentos agradáveis de convívio.

Aos amigos do Bloco 17, Andréia, Bianca, Bruno, Carol, Carol, Eliver, Fabiana, Gisele, Isabela, Julie, Karen, Laila, Lídio, Lucas, Luciana, Maria Alice, Martina, Rafaella Picciotti, Renata, Renata Albuquerque, Renata Melo, Rosana, Zé Antônio.

À Dorley, Cláudia, Carmem e Rose, pela amizade e momentos de descontração.

Aos meus eternos amigos, desde a época de colégio, que só a lembrança ou a certeza de revê-los, já conforta e trás tranquilidade. Armando, Bruno, Graziella, Gustavo Beliche, Gustavo Frota e Robert. E é claro, em especial, a minha recém chegada sobrinha, Ludmilla.

*“Não chores, meu filho;
Não chores, que a vida
É luta renhida:
Viver é lutar.
A vida é combate,
Que os fracos abate,
Que os fortes, os bravos
Só pode exaltar...”*

Canção do Tamoio, Gonçalves Dias

SÚMARIO

1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	5
2. 1. Desnutrição protéica e protéica-energética	5
2. 2. Desnutrição e Hemopoese	6
2. 3. Ciclo Celular e Hemopoese	17
2. 4. Ciclo Celular e Desnutrição	26
3. Justificativa e Objetivos	29
3. 1. Objetivo Geral	29
3. 2. Objetivos Específicos	29
4. Materiais e Métodos	30
4. 1. Animais e desnutrição	30
4. 1. 1. Indução da Desnutrição	31
4. 1. 2. Composição da Ração	25
4. 2. Metodologia	32
4. 2. 1. Avaliação da concentração protéica das rações	32
4. 2. 2. Obtenção das amostras sanguíneas	33
4. 2. 3. Avaliação hematológica	33
4. 2. 3. 1. Determinação do hemograma e da contagem de reticulócitos	33
4. 2. 3. 2. Obtenção de células da medula óssea (MO)	37
4. 2. 3. 3. Viabilidade celular	38
4. 2. 3. 4. Mielograma	38
4. 2. 3. 5. Obtenção de células do baço e esplenograma	38
4. 2. 4. Separação de células CD34 ⁺ (Depleção positiva)	39
4. 2. 5. Separação de células Lin ⁻ (Depleção Negativa)	40

4. 2. 6. Caracterização Imunofenotípica de Células Hematopoiética de Medula Óssea	41
4. 2. 6. 1. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo em células da Medula Óssea	43
4. 2. 6. 1. 1. Quantificação de DNA por Iodeto de Propídeo com RNase em Células Totais, Células CD34 ⁺ , CD5 ⁺ , CD117 ⁺ , Gr-1 ⁺ , B220 ⁺ , Ter-119 ⁺ , Sca-1 ⁺ e Células da Depleção Negativa de Medula Óssea	43
4. 2. 6. 1. 2. Quantificação de DNA e RNA por Laranja de Acridina em Células Totais, Células CD34 ⁺ , Células CD5 ⁺ , Células Gr-1 ⁺ e Células Lin ⁻ de Medula Óssea	44
4. 2. 7. Avaliação da capacidade de células totais da medula óssea de retornar ao ciclo celular após administração de 5-Fluoracil (150mg/Kg, i.v.)	45
5. Análise Estatística	46
6. Resultados	47
6. 1. Avaliação da concentração protéica das rações	47
6. 2. Avaliação do estado nutricional	47
6. 2. 1. Consumo diário de ração e de proteínas	47
6. 2. 2. Variação de peso corporal e concentração de albumina plasmática	47
6. 3. Avaliação hematológica	49
6. 3. 1. Série eritrocitária	49
6. 3. 2. Série leucocitária	49
6. 3. 3. Mielograma e esplenograma	52
6. 4. Avaliação do Ciclo Celular de Células Totais, Células CD34 ⁺ , Células CD5 ⁺ , Células Gr-1 ⁺ e Células Lin ⁻ de Medula Óssea Utilizando-se Acridina Laranja	56
6. 5. Avaliação da DNAploidia de Células Totais, Células CD34 ⁺ , CD117 ⁺ , Gr-1 ⁺ , B220 ⁺ , Ter-119 ⁺ , Sca-1 ⁺ e Células Lin ⁻ de Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido, Utilizando-se Iodeto de Propídeo (PI) em Citometria de Fluxo	56
6. 6. Avaliação hematológica do sangue periférico e celularidade da medula óssea e do baço dos animais dos grupos desnutrido e controle após 10 dias da administração de 5-fluoracil (150mg/kg, i.v.)	69
6. 6. 1. Série eritrocítica	69
6. 6. 2. Série leucocitária	73
6. 6. 3. Mielograma e esplenograma	75
6. 7. Avaliação do ciclo celular de células totais de medula óssea (MO) dos animais dos grupos controle e desnutrido 10 dias da administração de 5-fluoracil (150mg/kg, i.v.), utilizando-se laranja de acridina (AO)	80
6. 8. Avaliação da DNAploidia de células totais de medula óssea dos animais dos grupos controle e desnutrido após 10 dias da administração	84

de 5-fluoracil (150mg/kg, i.v.) utilizando-se iodeto de propídeo (PI)	
7. Discussão	87
8. Conclusão	99
9. Referências	102

RESUMO

As diferentes formas da desnutrição acometem milhões de pessoas em todo mundo, afetando geralmente crianças, recém-nascidos abaixo do peso para sua idade gestacional, idosos e pacientes sob nutrição parenteral. A desnutrição protéica (DP) induz atrofia em órgãos hemopoéticos, induzindo pancitopenia de sangue periférico, modifica a resposta imune específica e inespecífica, e desta forma, a associação entre doença e DP é freqüente. Alguns estudos indicam que a desnutrição produz vários efeitos celulares como redução da capacidade de proliferação, em vários órgãos. Como consequência

da constante e elevada demanda de proteína pelo tecido hemopoético, este pode apresentar alterações qualitativas e quantitativas em condições de desnutrição protéica. Neste trabalho avaliamos os efeitos da DP sobre o ciclo celular de células de medula óssea (MO) de camundongos. Camundongos *Swiss* machos, adultos, foram alimentados ou com ração contendo 2% de proteína (grupo desnutrido, D) ou com ração com 20% de proteína (grupo controle, C). A fonte protéica utilizada foi caseína. Após perda de 25% de peso corpóreo do grupo D, colheu-se sangue e células da MO e do baço. As células do sangue foram quantificadas bem como as do baço e da MO. As células da medula óssea foram posteriormente coradas com laranja de acridina (AO) e iodeto de propídeo (PI), avaliando-se, por citometria de fluxo, respectivamente DNA/RNA e DNA. Estes mesmos procedimentos foram executados após 10 e 15 dias da administração, em ambos os grupos, do quimioterápico 5-Fluoracil (que leva as células a estado de repouso -G0). Os animais do grupo desnutrido, assim como aqueles após 10 e 15 dias da administração do 5-Fluoracil, apresentaram anemia, além de redução significativa de número de hemácias, hematócrito e reticulócitos, e alterações quantitativas nas linhagens medulares e do baço. Os dados da citometria de fluxo (expressos em % de células da população analisada) mostram que em DP, uma maior quantidade de células da MO encontra-se fora do ciclo celular (G0), e uma menor população de células nas fases proliferativas do ciclo celular, S/G2/M, em populações de todas linhagens medulares, exceto eritróide e linfóide B, e todos os estágios maturativos, assim como células Sca-1, células tronco murina. Esta maior população celular em G0 também é observada após o efeito do 5-Fluoracil, o que corrobora a suposição de incapacidade de retorno ao ciclo celular por parte das células de medula dos animais desnutridos. Estes resultados podem explicar, em parte, a hipoplasia medular e pancitopenia sanguínea.

ABSTRACT

The different forms of the malnutrition attacks millions of people in everybody generally, affecting children, just-born below of the weight for its gestacional age, aged and patient under parenteral nutrition. The protein malnutrition induces atrophy in haematopoietic organs, inducing pancitopenia of peripheral blood, modifies the specific and inespecífica immune reply, and of this form, the association between illness and DPE are frequent. Some studies indicate that the malnutrition produces some effect cellular as reduction of the proliferation

capacity, in some organs. As consequence of the constant and raised protein demand for the bone marrow, that can present qualitative and quantitative alterations in conditions of protein malnutrition. In this work we evaluate the effect of the DP on the cellular cycle of cells of bone marrow of mice. Mice Swiss males, adults, had been fed or with ration I contend 2% of protein (unfed group, D) or with ration with 20% of protein (group has controlled, C). The used protein source was casein. After loss of 25% of corporeal weight of group D, harvested blood and cells of bone marrow and spleen. The cells of the blood had been quantified as well as the ones of spleen and bone marrow. The cells of the bone marrow later had been coradas with orange of acridine (AO) and propidium iodide of (PI), evaluating, for citometria of flow, respectively DNA/RNA and DNA. These same procedures had been executed after 10 and 15 days of the administration, in both the groups, of the 5-Fluoracil (that it takes the cells the state of rest - G0). The animals of the malnutrition group, as well as those after 10 and 15 days of the administration of the 5-Fluoracil, had presented anemia, beyond significant reduction of number of erythrocytis, hematocrit and reticulocytes, and quantitative alterations in the progenitors by bone marrow and of spleen. The data of the flow cytometric (express in % of cells of the analyzed population) show that in DP, a bigger amount of cells of outside meets bone marrow of the cellular cycle (G0), and a lesser population of cells in the proliferative phases of the cellular cycle, S/G2/M, in populations of all progenitors by bone marrow, except erythroids and lymphoids B, and all the maturative periods of training, as well as cells Sca-1, stem cells murina. This bigger cellular population in G0 also is observed after the effect of the 5-Fluoracil, what it corroborates the assumption of incapacity of return to the cellular cycle on the part of the cells of marrow of the malnutrition animals. These results can explain, in part, the hipoplasia to medular and sanguineous pancitopenia.

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição protéica e protéico-energética compromete cerca de 800 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2004), afetando geralmente crianças, recém-nascidos abaixo do peso para sua idade gestacional, idosos, pacientes sob nutrição parenteral, indivíduos com distúrbios alimentares como na

anorexia nervosa e bulimia, pacientes sob quimioterapia ou ainda indivíduos que fazem dietas radicais (WAITZBERG *et al.*, 1999; MARCOS, 2000; BRUNDTLAND *et al.*, 2000; GADDUCCI *et al.*, 2001; AKNER; CEDERHOLM, 2001; NOVA *et al.*, 2002; KEUSCH, 2003).

O binômio desnutrição-infecção pode ser visto sob dois aspectos: alteração dos mecanismos de defesa do indivíduo causada pela desnutrição e agravamento, em decorrência da infecção, do estado carencial previamente instalado ou ainda, a doença desencadeando-o. Nessas condições, a desnutrição pode facilitar a invasão do agente, favorecer sua proliferação no organismo, facilitar infecções secundárias e modificar o curso e a evolução da enfermidade (BORELLI *et al.*, 1995).

A restrição protéica modifica as respostas fisiológicas podendo induzir lesão celular. Contudo, existem diferenças na extensão e no tempo da lesão: tecidos que exibem elevado “turnover” de proteínas são primeiramente afetados em relação aos que apresentam baixo “turnover” protéico (WATERLOW, 1996).

Mecanismos envolvidos com a proliferação, diferenciação e morte celular podem, portanto, alterar-se na desnutrição, afetando diferentemente os distintos tecidos do organismo. A elevada e constante necessidade de proteínas por parte do tecido hemopoético faz com que seja comum o encontro de alterações qualitativas e quantitativas em desnutrição protéica (WATERLOW, 1996).

A hemopoese compreende processos que envolvem a origem, proliferação, maturação e destruição das células sangüíneas a partir de uma célula tronco (stem cell) pluripotente geradora de células progenitoras comprometidas para quaisquer das linhagens hematológicas dependendo, em parte, de fatores específicos, as citocinas (WILLIAMS; LICHTMAN, 2004).

Dados da literatura e do nosso grupo evidenciam que a desnutrição compromete órgãos linfóides - hemopoéticos e modifica a resposta imune. Nossos trabalhos demonstram alterações estruturais e ultra-estruturais da medula óssea, do baço e do timo evidenciando que em DPE há hipoplasia de medula óssea de camundongos com evidências histológicas de alteração da matriz extracelular, com caracterização imuno-histoquímica e ultra-estrutural de aumento na deposição de fibronectina na medula óssea esternal, especialmente em sítios endosteais/paratrabeculares (regiões de fixação de células tronco hematopoética) e aumento na deposição de laminina, particularmente em regiões perisinusais (XAVIER *et al.*, 1999)

Considerando que as moléculas da MEC estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação, diferenciação e migração das células hematopoéticas (KLEIN, 1995; MAYANI, 1992), tais alterações podem modificar a co-localização de uma série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de crescimento e diferenciação de células hematopoéticas (BORELLI *et al.*, 1995; KLEIN, 1995; VITURI *et al.*, 2000).

Também temos demonstrado alterações funcionais como redução da migração celular, do espreadimento, da fagocitose, da atividade bactericida e fungicida bem como alterações na produção de espécies reativas do oxigênio. Os mecanismos que levam a este quadro ainda não estão totalmente esclarecidos (FOCK *et al.*, 2004).

Em situações de desnutrição protéico-energética progenitores mielóides apresentam menor capacidade proliferativa. Alterações hematológicas quantitativas como anemia (MARTINS *et al.*, 1971; DE ANGELIS, 1986; AUGUSTO, 1995; LEE; HERBERT, 1999; COTRAN *et al.*, 2000), não ferropriva e nem proveniente de hemólise ou hemorragia, leucopenia (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995,; AUGUSTO, 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI *et al.*, 1995; BARON, 1997) são reflexos do comprometimento dos órgãos linfo - hematopoéticos em condições de desnutrição e estão associados com modificação da resposta imune e maior suscetibilidade a infecção (SCRIWSHAW, 1969; GROSS; NEWBERNE, 1980; TOMKINS, 1986; VICTORIA; HERNANDEZ, 1990).

A proliferação celular é normalmente determinada por sinais extracelulares que ativam um programa de expressão gênica e que regulam proteínas requeridas para divisão celular (SHERR, 1996). No início da fase G1 ciclinas-D (D1, D2 e D3) reúnem-se em um complexo de holoenzimas com uma ou duas sub-unidades catalíticas, de quinases dependentes de ciclinas (Cdk), Cdk4 e Cdk6 (SHERR, 2002).

Persistindo a estimulação mitogênica ocorre progressiva acumulação de quinases dependentes de ciclinas-D no núcleo celular. Aqui o complexo ciclina E-Cdk2 também colabora para fosforilar a proteína Rb (retinoblastoma) inibindo os membros da família Rb, p107 e p130, assim facilitando a entrada na fase S do ciclo celular (SHERR, 2002).

A pancitopenia com reticulocitopenia no sangue periférico e a atrofia medular encontrada nos camundongos submetidos à desnutrição protéico-energética sugerem queda na capacidade proliferativa de progenitores, uma vez que a redução do compartimento medular não foi decorrente do aumento do influxo de células para o sangue periférico e nem devida processos apoptóticos. Assim, nosso objetivo no presente projeto foi o de avaliar a capacidade proliferativa de populações de células da medula óssea de camundongos sob desnutrição.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E PROTÉICO-ENERGÉTICA

A desnutrição protéico-calórica ou protéico-energética (DPE) é definida pela Organização Mundial de Saúde como “condição (ões) patológica (s) que provém da menor ingestão, em várias proporções, de proteínas e calorias”,

ocorrendo mais freqüentemente em crianças com idade inferior a cinco anos e comumente associada a infecções (WHO, 1973).

A cada ano, aproximadamente 24 milhões de recém-nascidos apresentam baixa expectativa de vida saudável por terem sido gerados de mães mal - ou desnutridas (DE ONIS *et al.*, 1998). Entre 1999 e 2005 cerca de 850 milhões de pessoas em todo mundo apresentaram-se em estado de desnutrição e malnutridas, e este quadro mantém-se em crescimento nos últimos. No Brasil o número de pessoas acometidas por este estado de desnutrição se aproximou de 14 milhões entre 2001 e 2005 (FAO, 2006).

A desnutrição protéico-energética é geralmente encontrada em crianças, recém - nascidas abaixo do peso para sua idade gestacional, idosos, pacientes sob nutrição parenteral, indivíduos com distúrbios alimentares como na anorexia nervosa e bulimia, pacientes sob quimioterapia ou ainda indivíduos que fazem dietas radicais (WAITZBERG *et al.*, 1999; MARCOS, 2000; BRUNDTLAND *et al.*, 2000; GADDUCCI *et al.*, 2001; AKNER; CEDERHOLM, 2001; NOVA *et al.*, 2002; KEUSCH, 2003).

As manifestações clínicas da DPE dependem do grau e da severidade da deficiência, da causa e da duração da mesma, bem como da idade do indivíduo e da associação ou não com outras doenças. Quadros clínicos variados podem surgir pela associação de vários graus de privação protéica com diversos graus de deficiência energética. Estas síndromes podem cursar com retardo no crescimento, alterações psico-motoras, alterações histológicas e funcionais em diversos órgãos como coração, pulmão, rins, trato

gastrointestinal, sistemas endócrino e imunológico, principalmente aquele que apresentam alta taxa de renovação como medula óssea e epitélios (DE ANGELIS, 1986; AUGUSTO *et al.*, 1995; COTRAN *et al.*, 2000).

2.2 DESNUTRIÇÃO E HEMOPOESE

A hemopoese compreende os processos que envolvem a proliferação, diferenciação, amadurecimento e destruição das células sangüíneas a partir de uma célula mãe (*stem cell*) pluripotente que gera células progenitoras comprometidas para quaisquer das linhagens hematológicas dependendo de fatores específicos, segundo necessidade orgânica. (WILLIAMS; LICHTMAN, 2004). A hemopoese ocorre em localizações anatômicas específicas onde existem regiões histo-anatômicas denominados de microambiente e que permitem a formação das diferentes linhagens sanguíneas.(NILSSON, 2001).

A medula óssea apresenta uma população de células multipotentes capazes de satisfazer a demanda diária de auto-renovação bem como a necessidade de lançar no sangue periférico um alto número de células maduras a cada dia. A auto-renovação e a diferenciação das células tronco hematopoiéticas tem levado à compreensão da existência de diferentes classes de células tronco que incluem células em estado quiescente, e assim mantém o “pool” de progenitores por um longo tempo e um número de células dentro ciclo celular, com baixa taxa de renovação, gerando células comissionadas com as

linhagens sanguíneas. Estas células comissionadas apresentam-se em sua maioria ciclando e raras em estado quiescente com poder de auto-renovação (MORRISON; WEISSAM, 1997)

O microambiente hemopoético é constituído por células sanguíneas em diferentes estágios de maturação, células estromais (células reticulares, macrófagos, fibroblastos, adipócitos), por uma matriz extramedular (MEC) e por substâncias solúveis (EVANS *et al.*, 1991; BRACH; HERMANN, 1991; MAYANI *et al.*, 1992; ABBOUD; LICHTMAN, 2001), apresentando-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica que, além de fornecer o parênquima de sustentação para as células hemopoiéticas, permite um “ambiente bioquímico” fundamental para a proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (MAYANI *et al.*, 1992; OPAS, 1994; ABBOUD; LICHTMAN, 2001). Dessa maneira, supõe-se a existência de fatores regulatórios que formariam microambientes indutivos (TRENTIN, 1978; TESTA; DEXTER, 1990) que controlam a hemopoiese pela produção e secreção local de citocinas e, ou hormônios pelas quais células do estroma, co-localização de citocinas para a célula tronco nos locais de contato célula - célula e, ou célula-MEC ou ainda, por estímulo direto pelo contato celular (RIOS; WILLIAMS, 1990; METCALF, 1992; OPAS, 1994; ABBOUD; LICHTMAN, 2001).

Determinadas citocinas têm sua ação facilitada pela interação entre células tronco hemopoiéticas e elementos do microambiente incluindo componentes da MEC (EVANS *et al.*, 1991; SPIVAK *et al.*, 1992; SPIVAK *et al.*, 1994; NICOLA, 1994; METCALF, 1995; SKINASHI; SPRINGER, 2000). Algumas citocinas foram denominadas de fatores de crescimento de colônia

(CSF) pela capacidade de estimularem a proliferação e formação de colônias *in vitro* (DEXTER *et al.*, 1990).

A necessidade de um estroma medular para a manutenção da hemopoese demonstra que o microambiente pode conter as citocinas necessárias para a auto-renovação e sobrevivência das células tronco pluripotente, além do fato de sua atuação ser capaz de proporcionar diferenciação destas células para as linhagens hematológicas, principalmente diante de que as citocinas produzidas pelo estroma agem em pontos específicos neste sistema de diferenciação, e até maturativo, das células hematopoiéticas nas diversas linhagens sanguíneas (ARAI *et al.*, 1990; BENDER *et al.*, 1992; BURGESS; METCALF, 1980; SMITH, 2003).

Certos fatores de crescimento hematopoiéticos estimulam a proliferação e diferenciação de células progenitoras comprometidas com mais de uma linhagem, ou células mais primitivas como GM-CSF (fator estimulador de colônias grânulo-monocíticas) e IL-3 (interleucina-3). A IL-3 tem ação em células de uma ampla faixa de linhagens hematológicas, sempre com atividade estimulante de colônia sobre as CFU-GM (unidade formadora de colônia grânulo-monocítica), BFU-E (unidade super formadora eritróide), CFU-Meg (unidade formadora de colônia megacariocítica) e CFU-GEMM (unidade formadora de colônia de granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos). Já o GM-CSF estimula os progenitores de macrófagos (M-CSF), progenitores de granulócitos (G-CSF), progenitores eosinófilos (Eo-CSF) e progenitores basófilos (Bas-CSF) (MAZUR; COHEN, 1989).

As linhagens hematológicas murinas em nível medular podem ser reconhecidas por anticorpos, utilizados em citometria de fluxo, que reagem com antígenos específicos expressos na membrana da célula. Estes antígenos podem ser expressos em células de uma linhagem em todo seu estágio maturativo, como é o caso do Gr-1 (*granulocyte-differentiation antigen-1*) para linhagem granulocítica (Fleming, 1993), CD5 para linhagem linfóide T (KNOWLES, 1986), B220 em série linfóide B (COOFMAN, 1982) e Ter-119 para linhagem eritróide (KINA, *et. al.*, 2000). Do mesmo modo, células tronco hematopoiéticas murinas também são reconhecidas pela expressão de determinadas proteínas de superfície de membrana, Sca-1 (stem-cell antigen-1) (ITO, 1996).

Células Sca-1⁺ Lin⁻ (não expressam antígenos das linhagens mielóide e linfóide) frente a fatores de crescimento como IL-7, IL-3, SCF, G-CSF, GM-CSF e EPO em cultura prolifera e diferencia para linhagens mielóide e linfóides B e T (Ito, 1996). População de células Sca-1⁺, Lin⁻, Thy1.1^{low}, (antígeno de células em microambiente tímico) CD117⁺ (c-Kit) representam 0,007% da medula óssea e apresentam-se com apenas 4% nas fases S/G2/M do ciclo celular (UCHIDA; WEISSMAN, 1992; MORRISON; WEISSMAN, 1997; RANDALL; WEISSMAN, 1998) assim como células Thy-1^{lo} Sca-1⁺ Mac-1^{lo} CD4⁻ representam 0,01% da população medular e apresentam-se em 7% nas fases S/G2/M. Thy-1^{lo} Sca-1⁺ Mac-1^{lo} CD4^{lo} representam 0,03% da medula óssea e estão em 18% em fases proliferativas do ciclo celular (UCHIDA; WEISSMAN, 1992).

Pacientes entre 73 e 95 anos apresentaram no estado de desnutrição protéico-energética perda de peso, confusão, diminuição da capacidade total de ligação do ferro (CTLF), linfocitopenia, hipoalbuminemia, anemia e diminuição das unidades formadoras de colônias grânulo-macrofágicas (CFU-GM). Sendo que frente à reposição alimentar em até 21 dias, este quadro foi alterado, apresentando então ganho de peso, apetite e mobilidade, aumento da albumina e ferro sérico. Aumento considerável da CTLF, da hemoglobina e da contagem de linfócitos. Assim a medula apresentou aumento das CFU-GM (LIPSCHITZ; MITCHELL, 1982)

A desnutrição protéico-energética promove alterações em atividades medulares, como comprometimento do setor grânulo-macrofágico proporcional à intensidade da desnutrição, proporcionando vulnerabilidade à infecções nestes pacientes (JARRIGE *et al.*, 1984). Estudos recentes de nosso laboratório têm evidenciado que a produção *in vivo* e *in vitro* de $\text{TNF}\alpha$, IL1 e IL 6 em animais que receberam LPS encontra-se sensivelmente reduzida, e que IL 4 e IL 10 estão aumentadas e IFN γ permanece normal, assim como

macrófagos desses animais apresentam menor expressão de CD14/TLR4, receptor de LPS (FOCK *et al.*, 2006, manuscrito submetido).

A elevada e constante necessidade de proteínas por parte do tecido hematopoético faz com que seja comum o encontro de alterações como anemia e leucopenia em desnutrição protéico-energética (WATERLOW, 1996), embora a natureza das mesmas ainda não esteja esclarecida. Alterações hematológicas quantitativas como anemia normocítica-normocrômica (MARTINS *et al.*, 1971; DE ANGELIS, 1986; AUGUSTO, 1995; LEE; HERBERT, 1999; COTRAN *et al.*, 2000, BORELLI *et al.* 2007), leucopenia (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995) com linfocitopenia (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995; AUGUSTO, 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI *et al.*, 1995; BARON, 1997) são reflexos periféricos do comprometimento dos órgãos linfo-hematopoéticos em condições de desnutrição (XAVIER *et al.*, 1999) e estão associadas à modificação da resposta imune que se traduz por maior susceptibilidade à infecção (SCRIWSHAW, 1969; GROSS; NEWBERNE, 1980; TOMKINS, 1986; VICTORIA; HERNANDEZ, 1990).

A falta de ferro tem sido considerada como a principal causa da anemia na desnutrição protéica (FINCH, 1972). Dados de nosso laboratório evidenciam que a anemia encontrada não é ferropriva. A concentração plasmática de ferro e a saturação da transferrina encontram-se elevadas, não diferindo dos animais do grupo controle. Adicionalmente as análises histológicas de cortes da medula óssea, fígado e baço revelam depósitos elevados de ferro. A análise da

população medular por imunofenotipagem empregando os anticorpos anti-Ter-119 (glicoforina) e anti-CD71 (receptor de transferrina) confirma os dados citados, demonstrando comprometimento e/ou depleção da população eritróide primitiva.

Frente à desnutrição protéico-energética experimental também encontramos que progenitores grânulo-monocíticos apresentam menor capacidade proliferativa (JARRIGE *et al.*, 1984; BLATT, 2004; BORELLI *et al.*, 1995; BORSATTO, 1999), assim como redução da população de células CD34⁺ e de progenitores das linhagens mielóide e linfóide (BLATT, 2004;; BORELLI *et al.*, 1995; BORSATTO, 1999).

Um dos pré-requisitos para a hemopoese é a fixação da célula tronco em microambientes particulares, possibilitando interações célula - célula e célula - MEC (TAVASSOLI; MINGUELL, 1991). Demonstrou-se que a implantação da célula tronco é dependente de migração intramedular seguida de retenção seletiva em nichos endosteais específicos (NILSSON, 2001), sendo que a interação das células primitivas com o estroma depende da presença de proteoglicanos na matriz extracelular secretada pelas células estromais (MAYANI, 1992). Proteoglicanos associados à membrana celular podem interagir com outros componentes da MEC como fibronectina, constituindo um sistema de regulação da proliferação celular (TAVASSOLI; MINGUELL, 1991).

No sistema hemopoético humano, as células CD34⁺ expressam as integrinas $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_6\beta_2$ e as β_2 integrinas. As integrinas $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_5\beta_1$ são

expressas diferencialmente durante a maturação mielóide (KERST *et al.*, 1993) e participam da adesão dessas células à fibronectina presente na MEC e ativação de células B e T (SUGAHARA *et al.*, 1994). Trabalhos têm demonstrado que célula progenitora hemopoética multipotente adere à fibronectina na medula óssea (VERFAILLIE *et al.*, 1991). Camundongos deficientes de células CD34⁺ indicaram importante comprometimento na diferenciação granulocítica e eritróide, tanto *in vivo* como *in vitro* frente à citocinas hemopoéticas (CHENG *et al.*, 1996). Segundo os autores, a depleção foi revertida pela transfecção de célula tronco de animais normais.

Temos encontrado em desnutrição protéica, hipoplasia de medula óssea de camundongos (BORELLI *et al.*, 1995) com evidências histológicas de alteração da matriz extracelular; VITURI *et al.*, (2000) encontrou alterações na proporção de proteínas, especialmente de fibronectina, trombospondina e laminina, na matriz extracelular de camundongos desnutridos, situação que, a nosso ver poderia estar contribuindo para a hipoplasia observada.

Mais recentemente caracterizamos imuno-histoquímica e ultra-estruturalmente tais alterações, evidenciando aumento na deposição de fibronectina na medula óssea esternal de animais desnutridos especialmente em sítios endosteais/paratrabeculares (regiões de fixação de células tronco hemopoética) e aumento na deposição de laminina, particularmente em regiões perisinusais. Identificamos ativação endosteal, cujo significado ainda nos é desconhecido no contexto da desnutrição, não havendo, até o momento, relatos na literatura a esse respeito. Modificações nesses elementos podem repercutir em ambos os territórios (BORELLI *et al.*, 2007; FAVERO, 2003).

Considerando que as moléculas da MEC estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação, diferenciação e migração das células hemopoéticas (KLEIN, 1995; MAYANI, 1992), tais alterações podem modificar a co-localização de uma série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de crescimento e diferenciação de células hemopoéticas (BORELLI *et al.*, 1995; KLEIN, 1995; VITURI *et al.*, 2000).

Células que estão em divisão apresentam maior adesão estática à fibronectina e redução da capacidade de migração, sendo que algumas citocinas como SCF (*Stem cell factor*), IL-3 e trombopoietina (TPO) podem modular a expressão dos receptores de fibronectina, como VLA-4 e VLA-5, modulando e regulando a interação de fibronectina e célula tronco hematopoética (GIET *et al.*, 2002).

Deficiência de Zinco compromete a mielopoese e a linfopoese, proporcionando redução na celularidade destas linhagens (KING *et al.*, 2005), 40% no setor mielóide e 70% no linfóide ou até 91% em deficiência graves (KING *et al.*, 1998), assim como reduzindo a porcentagem de células nas fases proliferativas, S/G2/M, do ciclo celular (OSATI-ASHIANI *et al.*, 1998, KING; FRAKER, 2000; 2002

Animais submetidos à alimentação com 4% de proteína após um período de 3 semanas apresentam alterações como restrições no crescimento e proliferação celular tanto na medula óssea (BELL *et al.*, 1976; FRIED *et al.*, 1978) quanto no baço, onde é observado redução das unidades formadoras de

colônias (CFU). Sendo que após renutrição, com alimentação a 18% de proteína, a hemopoese é restabelecida, principalmente no baço que em torno de 5 dias apresenta 50 vezes mais CFU que a medula óssea (BELL *et al.*, 1976).

Crianças acometidas com desnutrição protéico-energética moderada a severa apresentam, em análises cromossomais de células de medula óssea, uma maior frequência de anormalidades cromossomais que crianças saudáveis (KHOURI; MacLAREN, 1973; GUPTA *et al.*, 1977) que podem comprometer a replicação de DNA (CHEEK *et al.*, 1970). Estudos em animais indicam que desnutrição protéico-energética severa compromete a proliferação celular e a síntese protéica (WINICK; NOBLE, 1966).

A anemia, leucopenia e a atrofia medular encontrada nos camundongos submetidos à desnutrição protéico-energética sugerem queda na capacidade proliferativa de progenitores das linhagens hematológicas, uma vez que a redução do compartimento medular não foi decorrente do aumento do influxo de células para o sangue periférico e nem devida processos apoptóticos (BLATT, 2004; BORELLI *et al.* 2007; BORSATTO, 1999;).

Diante destes eventos, nossa hipótese é de que, ao menos em nosso modelo experimental, as alterações na proliferação, diferenciação e maturação, ora observadas, podem ser decorrentes do comprometimento de precursores hematopoiéticos, do microambiente medular indutor da hemopoese e, ou de processos de sinalização celular.

2. 3. CICLO CELULAR

O ciclo celular é coordenado por meio de eventos que possibilitam que as células dupliquem (replicam) seu material genético (DNA) e, posteriormente, entrem em divisão (mitose). Concluída a mitose as células neo-formadas podem continuar a se dividir, passando por todas as fases do ciclo ou então, sair do ciclo celular, tornando-se células em estado de repouso (G0). Estas células podem reentrar no ciclo por meio de fatores de crescimento (SCHAFER, 1998).

A replicação do DNA nuclear ocorre somente na fase S (período de síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de fase G1, e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é a fase G2. G1 e G2 propiciam um tempo adicional para o crescimento celular (SHERR, 2002).

Uma variedade de marcadores tem sido utilizados para a análise do ciclo celular, incluindo incorporação de bromodesoxiuridina (BrdU), expressão de Ki-67, expressão de antígeno nuclear de proliferação (PCNA), marcação de regiões organizadoras de nucléolos (AgNOR), expressão de ciclinas, padrão de fosforilação de Cdk e poliploidia de DNA (SCHAFER, 1998); técnicas estas que permitem desde a simples medida da relação entre a proporção de células de uma determinada população em ciclo até determinação da cinética do ciclo celular. É possível realizar esta avaliação por meio técnica de citometria de fluxo, identificando-se os vários estágios do ciclo celular: G1, S, G2/M (WATSON *et al.*, 1987), assim como quantificação de DNA e RNA por corantes como laranja de acridina para diferenciar G0 e G1 pela maior síntese de RNA (HSIEH *et al.*, 2002).

O ciclo celular é controlado pela ação de quinases dependentes de ciclinas (Cdk) e da ativação de suas subunidades, as ciclinas. A família das Cdk induz processos pela fosforilação de serinas e treoninas em proteínas selecionadas. Outra família é a de proteínas ativadoras, ciclinas, que se ligam às moléculas de Cdk e controlam sua habilidade de fosforilar proteínas-alvo apropriadas. A formação, ativação e separação dos complexos de ciclina-Cdk são os eventos fundamentais que coordenam o ciclo celular (BLAIN *et al.*, 1997).

A proliferação celular é normalmente determinada por sinais extracelulares que ativam um programa de expressão gênica e que regulam proteínas requeridas para divisão celular (SHERR, 1996).

No início da fase G1 ciclinas-D (D1, D2 e D3) reúnem-se em um complexo de holoenzimas com uma ou duas subunidades catalíticas, quinases dependentes de ciclinas (Cdk), Cdk4 e Cdk6. Persistindo a estimulação mitogênica ocorre uma progressiva acumulação de quinases dependentes de ciclinas-D no núcleo celular. Aqui, o complexo ciclina E-Cdk2 também colabora para fosforilar membros da família Rb, p107 e p130 e, assim, facilitando a entrada na fase S (SHERR, 2002).

A expressão de ciclina D é largamente dependente de sinalização extracelular, como pelas interações célula-célula e célula-MEC ou por citocinas, e de cascata de sinalização intracelular, enquanto que ciclinas A, B e E são expressas independentemente da sinalização extracelular (COQUERET, 2002).

A atividade das quinases dependentes de ciclina (Cdk) D e E é controlada por agentes da família “Cip/Kip” de inibidores de Cdk, que incluem p27, p21 e p57 (ROBERTS, 1999). Quinases dependentes de ciclinas D também são inibidas por outra família, a Ink4: quatro proteínas Ink4 que inclui p15, p16, p18 e p19 (ALBERTS *et al.*, 1997; BLAIN *et al.*, 1997; RUAS; PETERS, 1998; SHERR; ROBERTS, 1999; ROUSSEL, 1999; ORTEGA *et al.*, 2002). As proteínas inibidoras de complexo ciclina E-Cdk2 p27 e p21 *in vivo* são pouco efetivas no bloqueio da atividade enzimática de ciclina D1-Cdk4 (SOOS *et al.*, 1996; BLAIN *et al.*, 1997). Em vez de estabilidade, a retenção nuclear de complexo ciclina D1-Cdk4 é facilitada pela associação física com Cip/Kip (LABAER *et al.*, 1997; CHENG *et al.*, 1999; ALT *et al.*, 2002; MURAOKA *et al.*, 2002).

Em células em estágio quiescente (G0) o nível de ciclina D1 está baixo e assim não se forma o complexo ciclina D1-Cdk4, e altos níveis de p27 suprimem a atividade do complexo ciclina E-Cdk2. A estimulação mitogênica induz ciclina D1 e regula a associação com Cdk4, degradando p27 e ativando ciclina E-Cdk2. Este “pool” de p27 remanescente é ligado a ciclina D1-Cdk4 onde o restante de ciclina E-Cdk2 é fosforilado, dando início a fosforilação e degradação (SHEAFF *et al.*, 1997; VLACH *et al.*, 1997).

Ambas quinases dependentes de ciclinas da fase G1 podem colaborar fosforilando e inativando Rb aproximando as células da transição G1-fase S (SHERR, 2002).

Interação entre células e componentes da MEC tem efeito sobre a proliferação celular, diferenciação e sobrevivência (HANKS; POLTE, 1997; DANEN; YAMADA, 2001; ALAHARI *et al.*, 2002; REENSTRA *et al.*, 2002; JULIANO, 2003).

A MEC é composta por uma rede de proteínas e proteoglicanos que permitem a estrutura e informação para as células. A interação entre células e MEC é realizada por proteínas como fibronectina, laminina e vitronectina e por diferentes tipos de colágenos (AUMAILLEY; GAYRAUD, 1998). Estas proteínas ligam-se, principalmente, a proteínas transmembranas específicas da membrana plasmática, as integrinas, as quais interagem com o citoesqueleto e estão envolvidas com a morfologia e migração celular. As integrinas têm importância para adesão assim como para induzir transdução de sinais para expressão gênica (HANKS; POLTE, 1997; DANEN; YAMADA, 2001).

Segundo Zhu *et al.*, 1996, a expressão de ciclina-D1 em G0/S é altamente dependente de adesão celular à MEC diferentemente da regulação da expressão de ciclina-D em M/G1 (HULLEMAN *et al.*, 1999).

Após a expressão de ciclinas-D há a formação do complexo com Cdk4 e 6, caracterizando o início da fase G1. A atividade das Cdk4 e 6 só é efetivada com a formação deste complexo que precisará ter o resíduo treonina 160 da molécula de Cdk fosforilado pela ciclina ativadora de quinase (CAK) ou ciclina H (MATSUSHIME *et al.*, 1992; MORGAN, 1997).

Em particular, E2F controla a ativação de genes de ciclina E (OHTANI *et al.*, 1995; GENG *et al.*, 1996; LE CAM *et al.*, 1999). Rb é capaz de ligar-se a fatores de transcrição E2F (DYSON, 1998; HARBOUR; DEAN, 2000) para inibir suas atividade em G1, fazendo com que a ativação dos genes da fase S só possa ocorrer quando E2F for liberado de Rb (FLEMINGTON *et al.*, 1993; HELIN *et al.*, 1993). Por meio da fosforilação de Rb, uma importante função de ciclina-D/Cdk4 é regular o acesso de ciclina-E para o sítio ativo. Esta inicial fosforilação de Rb por ciclina-D/Cdk4 também permite o rompimento da ligação com HDAC, assim acabando com a repressão do gene de ciclina-E e permitindo a progressão para fase S (ZHANG *et al.*, 2000). Após a inicial fosforilação de Rb por ciclina-D/Cdk4,6, o complexo ciclina-E/Cdk2 intensifica esta fosforilação de Rb proporcionando a transição de G1 para S (DE GREGORI *et al.*, 1995).

Em células em estágio quiescente (G0) co ciclo celular, a concentração do inibidor de Cdk, p27 é alta, ao contrário do que ocorre com as ciclinas-D, principalmente ciclina D-3 no caso de células tronco. Na ausência de mitógenos, a acumulação de p27 é requerida para retirada do ciclo celular e entrada em estado quiescente, estado de repouso. Diferentemente ocorre com p21, que se apresenta em baixas concentrações. Quando as células voltam

para o ciclo, ou seja, passam de G0 para G1, as concentrações de p27 caem, enquanto que as de p21 aumentam (AGAMI; BERNARDS, 2002).

Altas concentrações de p27 suprimem a atividade do complexo ciclina E-Cdk2. A estimulação mitogênica induz ciclina D1 e regula a associação com Cdk4, degradando p27 e ativando ciclina E-Cdk2. Este “pool” de p27 remanescente é ligado a ciclinaD1-Cdk4, onde o restante de ciclinaE-Cdk2 é fosforilado, dando início a fosforilação e degradação (SHEAFF *et al.*, 1997; VLACH *et al.*, 1997).

p21 é capaz de inibir ciclina-D, CDK e antígeno de proliferação celular (PCNA), formando assim, um complexo quaternário de inibição (ZANG *et al.*, 1993). PCNA é um fator processador para polimerase δ e ϵ (KURIYAN; O'DONNELL, 1993). Ao inibir PCNA, p21 mostra-se importante para regulação de processos biológicos como progressão do ciclo celular, replicação e reparo do DNA (COOPER *et al.*, 1999). O PCNA é expresso no final de G1 do ciclo celular, atingindo na fase S sua concentração máxima (BRAVO *et al.*, 1987), sendo que sua expressão tem sido relacionada ao processo de divisão celular e/ou processo de reparo do DNA (HATTONI *et al.*, 1995).

A regulação da transcrição de PCNA em plantas é mediada pela interação entre diferentes complexos de E2F bem como por outros fatores transcripcionais (KOSUGI *et al.*, 1995; KOSUGI; OHASHI, 1997; EGEIKROUT *et al.*, 2001). E2F age na expressão e repressão de PCNA em *Drosophila* (THACKER *et al.*, 2003).

Dois sítios de E2F regulam a expressão de PCNA em plantas. E2F 1 promove a expressão de PCNA em tecidos jovens; E2F 2 lesado reprime a expressão de PCNA, assim como íntegro também reprime, porém a atividade de E2F 1 mascara a repressão de E2F 2 por meio de anti-repressores; E2F 1 e 2 juntos reprimem esta expressão; em células maduras ambos também reprimem a expressão de PCNA (EGEIKROUT *et al.*, 2002).

Segundo Della Ragione *et al.*, 1997, as células CD 34+ no início de G1 não expressam ciclina-D1 e Cdk4 E expressam, em baixas concentrações ciclina-D2, p18, p19, p27 e Cdk6, e expressam, em altas concentrações p15; e em maior concentração, ciclina-D3.

Células CD34⁺, presentes na circulação após mobilização com fator estimulante de granulócitos (G-CSF), apresentam-se, em maior quantidade, em estágio G0/G1 do ciclo celular, ao contrário das CD34⁺ que permanecem na medula óssea, sugerindo que o contato com o estroma da medula óssea é necessário para proliferação de progenitores hemopoéticos (ROBERTS; METCALF, 1995).

O uso do agente citotóxico ciclo-específico 5-Fluoracil induz as células hematopoéticas entrar no estágio G0, e após o seu efeito, estas retornam ao ciclo celular com maior intensidade (Pospíšil *et al.*, 2004; Larsson *et al.*, 2005).

Utilizado como agente de início do ciclo celular específico, atua citotoxicamente em células durante a fase S na incorporação de nucleotídeo uracila levando-as à morte (Harrison; Lemer, 1991) reduzindo drasticamente às

populações linfóide e mielóide de medula óssea (Yeager, 1983; Van Zant, 1984; Vetvicka, 1986). População de células Sca-1⁺, Lin⁻, Thy1.1^{low}, CD117⁺ apresentam-se com apenas 4% nas fases S/G2/M do ciclo celular e não ou sofrem pouco com o efeito do agente citotóxico 5-Fluoracil (Hodgson; Bradley, 1979; Lemer; Harrison, 1990; Morrison; Weissman, 1994; Berardi, 1995; Randall; Weissman, 1998).

Após administração de 5-Fluoracil em camundongos, medula óssea e baço apresentaram redução significativa de células formadoras de colônias megacariocítica (CFC-Meg) e de células formadoras de colônias grânulo-macrofágicas (CFC-GM), sendo que após 5 dias da administração a contagem destas células já apresentou aumento estatisticamente significativo o que sugere similaridade na regulação da síntese de DNA nestes dois tipos de células (YEAGER *et al.*, 1983; CEN; LEVIN, 1992).

Animais submetidos à desnutrição protéico-energética tratados com 5-Fluoracil apresentaram redução da celularidade medular, principalmente do setor grânulo-macrofágico, entretanto com mesma intensidade que animais não desnutridos. Após renutrição os efeitos no setor grânulo-macrofágico do quimioterápico foram mais acentuados ao primeiro do que ao quarto dia, em virtude da atividade de síntese de DNA ao primeiro dia (GAMELLI; FOSTER, 1983).

2. 4. Ciclo Celular e Desnutrição

Segundo Bitencourt *et al.*, 1995 e Gonzalez *et al.*, 2002, a desnutrição gera menor capacidade de reparo do DNA. Jacob *et al.*, 1989, evidenciou que após cinco ou quatorze dias de desnutrição experimental, ocorreu um aumento da percentagem de células em G0/G1 do ciclo celular. Sendo que a reconstituição nutricional após cinco e quatorze dias de restrição protéica induziu rápida recuperação na percentagem de células na fase S e um decréscimo na de fase G0/G1 do ciclo celular.

Privações de aminoácidos e de glicose promovem a parada no ciclo e morte celular por ação, principalmente, de p21 (ISHII *et al.*, 2004). Muitos nutrientes e vitaminas são essenciais para síntese/reparo e manutenção do padrão de metilação do DNA. Uma maior interação entre estado nutricional e polimorfismo genético pode modular expressão gênica através da metilação do DNA (Friso; Choi, 2002).

Em pacientes com câncer e desnutridos a ineficiência da medula óssea e resposta ineficiente desta à terapia comprometendo a proliferação celular da medula pode ser revertida com restabelecimento do estado nutricional do paciente (DUNKI *et al.*, 1989).

Ratos em período de lactação e em estado de desnutrição apresentam células de medula óssea em cultura que levam maior tempo para passar pelas fases G0/G1, enquanto que para as fases S/G2/M o tempo é igual ao controle (GÓMEZ *et al.*, 1996; ORTIZ; BETANCOURT, 1990). Assim como estas células apresentaram alta porcentagem, 82,6% contra 44,6% do controle, no 1º ciclo da metáfase; diminuição no 2º ciclo, 13,7% contra 54,7% do controle; e

ausência de células no 3º ciclo da metáfase (ORTIZ; BETANCOURT, 1984; 1990).

Células do baço, medula óssea e linfócitos e granulócitos de sangue periférico de animais em período de lactação sob desnutrição apresentaram danos de DNA que proporcionaram comprometimento dos mecanismos de reparo de DNA e ou inviabilidade de moléculas necessárias para proteção de danos oxidativos no DNA (CORTES, 2001).

Células de medula óssea de animais desnutridos durante a lactação apresentaram menor proporção de células, 20,4%, em fase proliferativa do ciclo em relação ao controle, 35,1%, assim como apresentaram maior tempo para cumprir todo ciclo celular (BETANCOURT; ORTIZ, 1990).

Em análise de medula óssea de ratos desmamados submetidos à desnutrição protéica foi observada diminuição de células viáveis e do percentual de mitoses, e severa alteração no percentual de pares de cromossomos 3, 11 e 12 marcados na região organizadora de nucléolo (AgNO_r), que indica pobre atividade ribossomal. Estas alterações foram revertidas com uma dieta de 20% de caseína durante 5 a 9 dias (OLMOS *et al.*, 2001).

Em nosso laboratório encontramos que células hemopoéticas da medula óssea de animais desnutridos apresentaram expressão de PCNA e de AgNO_r significativamente menores em relação aos controles (BLATT *et al.*, 2004,).

Animais submetidos à desnutrição protéico-energética apresentaram hipoplasia, aumento de células blásticas e atrofia medular, assim como leucopenia e anemia (BORELLI, 1995). Este fato pode estar relacionado a alterações do microambiente desses órgãos (XAVIER, 1999, XAVIER *et al.*, 1999; VITURI *et al.*, 2000), alteração da capacidade proliferativa dos progenitores das linhagens sanguíneas de medula óssea e/ou a produção deficiente de citocinas e sinalização celular (KLASING, 1998; FOCK *et al.*, 2002; 2004)

3. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Tendo em vista as alterações encontradas no microambiente medular e a pancitopenia sanguínea em situação de DPE, pretendemos avaliar os efeitos da DPE sobre o ciclo celular de células totais de medula óssea de camundongos, assim como células Linhagens Específicas: CD5⁺, B220⁺, Gr-1⁺, Ter-119⁺ e CD117⁺, células CD34⁺, e de células Lin⁻ e células Sca-1⁺.

3. 1. Objetivos Específicos

- Caracterizar o quadro hematológico camundongos submetidos à DPE; avaliando hemograma, mielograma e esplenograma;
- Avaliar os efeitos da DPE sobre as diferentes fases do ciclo celular de células totais, células de linhagens hematológicas medular como CD5⁺, B220⁺, Gr-1⁺, Ter-119⁺ e CD117⁺, e da população de células CD34⁺, células Lin⁻, e células tronco murino (Sca-1⁺) de medula óssea;
- Avaliar a capacidade de retornar ao ciclo celular de células totais e da população CD34⁺ de medula óssea de camundongos submetidos à DPE após o efeito do agente citotóxico ciclo-específico 5-Fluoracil (FLUOROURACIL, AMERICAN PHARMACEUTICAL PARTNERS, lote 200463; 150mg/Kg, i.v.) *in vivo*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. 1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos, de dois a três meses de idade, oriundos de colônias do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Estes animais foram submetidos à desnutrição protéico-energética segundo metodologia

preconizada por Borelli *et al.*, 1995. Este projeto foi submetido, e aprovado, pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

4. 1. 1. Indução da Desnutrição

Os animais, previamente pesados, foram separados em gaioleiros metabólicos (ZUCAS *et al.*, 1969), sendo mantidos sob temperatura ambiente de 22 a 25 °C, ciclo de luz claro-escuro de 12 horas, umidade de 45-55% e pesados a cada 48 horas. Durante período de adaptação às condições do gaioleiro metabólico, todos os animais receberam ração controle contendo 20% de proteínas, para em seguida serem separados em dois grupos: **nutrido ou controle (C)**, que permaneceram recebendo ração controle; e **desnutrido (D)**, que passaram a receber ração contendo 2% de proteínas (Du *al.*, 1999).

Ambos os grupos permaneceram sob as mesmas condições ambientais, sendo avaliado o estado nutricional dos animais pela determinação do peso corporal e do consumo de ração a cada 48 horas e pela determinação das concentrações de proteínas totais e albumina plasmática. Após perda de aproximadamente 20% do peso corporal por parte dos camundongos do grupo desnutrido, amostras biológicas dos animais de ambos os grupos foram obtidas.

4. 1. 2. Composição das rações

As rações foram produzidas por nós na forma de granulado (Tabela 1). A caseína comercial foi utilizada como fonte protéica das rações, sendo as mesmas complementadas com 0,15 % de metionina e 0,25 % de colina (GARCIA, 1992). Foram preparados dois tipos de rações:

- **Ração I** (FRIED *et al.*, 1978; BORELLI *et al.*, 1995), contendo 20% de proteína;
- **Ração II** (Du, *et al.*, 1999) contendo 2 % de proteína e destinada ao grupo desnutrido (Tabela 1).

As misturas salínica e vitamínica utilizadas foram recomendadas pela AIN-93 (REEVES *et al.*, 1993).

Tabela 1 Composição das dietas experimentais¹

Ingredientes	Controle	Desnutrido
	(g/kg dieta)	
Casein (>85% proteína)	20	0,2
Sacarose	100	100
Fibras	10	10
Óleo	80	80
Mistura salínica ²	40	40
Mistura vitamínica ²	10	10
L-Metionina	1.5	1.5
Bitartrato de Colina	2.5	2.5
Amido q.s.p.	556.5	716.5

¹ Dietas isocalóricas de 1716.3 kJ/100g (410.6kcal/100g).

² Misturas salínica e vitamínica foram preparadas de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para ratos adultos de 1993 (Reeves, 1993).

4. 2 Metodologia

4. 2. 1. Avaliação da Concentração Protéica das Rações

A concentração protéica das rações foi determinada pelo método de micro-Kjedahl, segundo normas do Instituto Adolfo Lutz, 1967 e realizadas no laboratório de Nutrição Clínica (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), sob responsabilidade do Prof. Dr. Júlio Tirapegui.

4. 2. 2. Obtenção das Amostras Sanguíneas

As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção cardíaca, em camundongos previamente anestesiados com 10mg/Kg de peso, de cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer) e 100mg/Kg de peso de cloridrato de cetamina (Ketamina ®, Cristália), utilizando-se EDTA 10% como anticoagulante.

- **Solução anticoagulante de EDTA a 10%**

EDTA.Na ₂ dihidratado...(Merck - Ref.21562).....	10g
Água destila...qsp.....	100mL

4. 2. 3. Avaliação Hematológica

4. 2. 3. 1. Determinação do Hemograma e da Contagem de Reticulócitos

A partir de sangue total foram realizados o hemograma e contagem de reticulócitos de acordo com as técnicas utilizadas no Laboratório de Hematologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (DACIE, 1995).

- **Dosagem de Hemoglobina pelo Método de Cianometahemoglobina**

Adicionou-se 20µL do sangue total em 5,0mL do reagente de Drabkin, agitando-se em seguida para após 5 minutos determinar a absorbância da amostra em 540nm ou filtro verde (500-540nm), acertando-se o zero com água. Utilizando-se padrão de 10g/dL calcula-se o fator de calibração:

$$\text{Fator de calibração} = \frac{10 \text{ (padrão de Hb)}}{\text{média das absorbâncias (triplicata) do padrão}}$$

Reagente de Drabkin

KH ₂ PO ₄	140 mg
K ₃ (CN) ₆	200 mg
KCN.....	50 mg
Sterox.....	0,5 mL
H ₂ O dest.....qsp.....	1.000

mL

• **Determinação do Hematócrito (Método de Strumia)**

Encheu-se um tubo capilar com sangue total, fechando-se em seguida a extremidade que não continha sangue diretamente na chama. Centrifugou-se por 5 minutos em centrífuga de microhematócrito em 11000 rpm e fazer leitura em escala milimétrica ajustando-se a base e o limite superior ao nível da amostra no tubo capilar.

• **Contagem de eritrócitos em câmara de contagem (Hematimetria)**

Diluiu-se 20µL da amostra em 5mL líquido de Gower (ácido acético , citrato de sódio , cloreto de sódio) e manteve-se em agitação e preencheu-se por capilaridade a câmara de Neubauer. Aguardou-se 1 a 2 minutos e contou as hemácias nos 5 quadrados terciários do quadrado secundário central do retículo, determinando assim, em mm³ o número de eritrócitos na amostra:

$N^{\circ} \text{ eritrócitos} / \text{mm}^3 = \text{contagem} \times \text{diluição utilizada} \times \text{volume do quadrado} \times n^{\circ}$
de quadrados contados

Obs: volume do quadrado em $\text{mm}^3 = 1\text{mm}^2$ (área) $\times 1/10\text{mm}$ (altura até a lamínula)

• Cálculo dos índices hematimétrico

Volume corpuscular médio: $\text{VCM (fL)} = (\text{Ht} / n^{\circ} \text{ hemácias}) \times 10$

Hemoglobina corpuscular média: $\text{HCM (pg)} = (\text{Hb} / n^{\circ} \text{ hemácias}) \times 10$

Concentração de hemoglobina corpuscular média: $\text{CHCM (\%)} = \text{Hb} / \text{Ht} \times 100$

• Contagem de Reticulócitos

Em proporção de 1 para 1, misturou-se alíquotas da amostra e de azul de cresil brilhante (azul de cresil 1g; citrato de sódio 0,4g; solução de cloreto de sódio q.s.p. 100mL), deixando-se 10 minutos em temperatura de 37°C para então preparar extensão da mistura em lâmina, podendo-se corá-la ou não com corante panóticos. Efetuou-se a contagem percentual em relação aos eritrócitos em cada campo ao microscópio. Utilizando-se a contagem de eritrócitos calculou-se a porcentagem de reticulócitos e o valor absoluto.

Reagentes

Azul de Cresil Brilhante a 1% em citrato salino

Citrato trissódico.....	0,4 g
Azul de cresil brilhante.....	1,0 g
Solução fisiológica (0,85%)..... qsp.....	100 mL

- **Contagem Global de Leucócitos**

Adicionou-se 20µL da amostra em 400µL do líquido de Turk (ácido acético 1% em solução de cloreto de sódio 0,9%), homogenizou-se a mistura e preencheu-se a câmara de Neubauer. Esperou-se 1 a 2 minutos para ser efetuada a contagem nos quadrados grandes laterais, quadrados secundários do retículo.

- **Contagem Diferencial de Leucócitos**

Em extensões sanguíneas, coradas com corantes panóticos, ao microscópio efetuou-se a contagem percentual de cada tipo de leucócito em 100 leucócitos contados. Utilizando-se a contagem global de leucócitos, determinou-se os valores absolutos de tipo celular.

- **Coloração de May-Grunwald-Giemsa (MGG) modificado (ROSENFELD, 1947)**

Procedimento: Cobrir a lâmina com cerca de 2 mL de corante de Rosenfeld e deixar durante 3 minutos. Adicionar cerca de 2 mL de água destilada previamente fervida e com pH 7,0. Assoprar com pipeta para homogeneizar a solução e deixar corar por 10 minutos. Lavar a lâmina em água corrente, limpar a parte inferior da lâmina com algodão ou gaze e deixar secar ao ar. Examinar com objetiva de imersão.

Reagente:

Corante de Rosenfeld

May-Grunwald, eosina azul de metileno.(Merck - Ref.101352).....0,53g

Giemsa, azur-eosina-azul de metileno.(Merck - Ref.109203).....0,97g

Metanol.(Merck - Ref.106009).....1000mL

4. 2. 3. 2. Obtenção de Células da Medula Óssea (MO)

Após a perda de cerca de 20% do peso corpóreo inicial os animais do grupo desnutrido e respectivos controles foram anestesiados conforme descrito em 4. 2. 2. exsanguinados e sacrificados por superdosagem de anestésico e por deslocamento cervical. As células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade femoral com meio McCoy'S 5A[®] modificado (SIGMA[®], CHEMICAL COMPANY, USA). A suspensão celular foi colocada em tubos plásticos, cuidadosamente homogeneizada com pipeta tipo Pasteur e mantidas em banho de gelo.

4. 2. 3. 3. Viabilidade Celular

Foi utilizado o teste de exclusão do azul de Tripiano 1 %, sendo que apenas as amostras que apresentarem viabilidade maior que 95% foram utilizadas.

4. 2. 3. 4. Mielograma

A partir das amostras da suspensão total de células da medula óssea obtidas conforme o item 4.2.3.2, foram preparadas lâminas de citocentrifugado (Incibrás, Brasil) e coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). A contagem absoluta de células foi realizada após diluição das amostras da suspensão celular com líquido de Turk, e contagem em hemocítômetro de Neubauer.

4. 2. 3. 5. Obtenção de Células do Baço e Esplenograma

O baço mantido em meio de cultura McCoy's 5A[®] modificado (Sigma[®], Chemical Company, USA) gelado, contendo EDTA 10 %, teve sua cápsula rompida em uma de suas extremidades com o auxílio de duas agulhas dobradas em "L" e fixas em seringas. As células foram retiradas pelo método de dissociação mecânica. Para determinação do número total de células e avaliação morfológica foram realizados os mesmos procedimentos do item 4.2.3.4.

4. 2. 4. Separação de células CD34⁺ (Depleção positiva)

Após coletar as células de MO em meio McCoy's 5A, as suspensões foram centrifugadas por 10 minutos a 300xg, a 20-25°C. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 500 µL de PBS (Solução tampão fosfato com 2 mM de EDTA; 0,5 % de BSA; 0,01 % de azida sódica e pH 7,0) acrescentado-se 50 µL do anti-CD34 (para cada 1 x 10⁸ células/mL). A suspensão foi mantida sob agitação (10 rpm) por 40 minutos e a 4°C, ao abrigo

da luz. A seguir, foi centrifugada a 300g por 10 minutos a 20-25°C, desprezado o sobrenadante e ressuspenso em 5 mL de PBS, adicionando-se a seguir, 50 µL de anticorpo anti-Imunoglobulina fixados em partículas de ferro (“beads”) (MICROBEADS, MID MAC´S) e incubando-SE por 40 minutos sob agitação (10 rpm), ao abrigo da luz e a 4 °C. Em seguida, centrifugou-se por 10 minutos a 300g, a 20-25°C, e a seguir desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 500 µL de PBS. A seguir, passou-se a suspensão celular pelas colunas (LS SEPARATION COLUMNS, MID MACS), previamente tratadas com PBS, mantidas em campo magnético. Após escoamento total da suspensão pela coluna (espontâneo, apenas sob a ação da gravidade) repetiu-se novamente a passagem por mais duas vezes. A seguir, retirou-se o magneto e lavou-se a coluna com 3 mL de PBS. Essa suspensão foi então centrifugada a 300g por 10 minutos, a 20-25°C, desprezando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se o sedimento celular em 500 µL de paraformaldeído 1%, para aquisições em citômetro de fluxo. A fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo FACScan (BD, San Jose, CA) usando excitação de 488nm com íon laser.

4. 2. 5. Separação de células Lin⁻ (Depleção Negativa)

Após coletar as células de MO em meio McCoy's 5A, as suspensões foram centrifugadas por 10 minutos a 300xg a 20-25°C. Retirou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 40 µL de PBS (Solução tampão fosfato com 2 mM de EDTA; 0,5 % de BSA; 0,01 % de azida sódica e pH 7,0) para cada 1×10^6 células, seguiu-se acrescentado-se 10 µL do “mix” de anticorpos (anti-Gr-1, anti-B220, anti-CD5, anti-CD11b e anti-Ter-119; para cada 1×10^8

células/mL). A suspensão foi mantida sob agitação (10 rpm) por 10 minutos e a 4°C. A seguir, adicionou-se 10 µL de anticorpo anti-Imunoglobulina fixados em partículas de ferro (“beads”) (MICROBEADS, MID MAC’S) e incubando-se por 15 minutos sob agitação (10 rpm), ao abrigo da luz e a 4 °C. Em seguida, centrifugou-se por 10 minutos a 300g, a 20-25°C, e a seguir desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se em 500 µL de PBS. A seguir, passou-se a suspensão celular pelas colunas (LS SEPARATION COLUMNS, MID MACS), previamente tratadas com PBS, mantidas em campo magnético. Após escoamento total da suspensão pela coluna (espontâneo, apenas sob a ação da gravidade) repetiu-se novamente a passagem por mais duas vezes. A suspensão de células que passou pela coluna foi então centrifugada a 300g por 10 minutos, a 20-25°C, desprezando-se o sobrenadante e ressuspendendo-se em um dado volume para se quantificar as células lin⁺, para então avaliá-las morfológicamente e quanto ao seu ciclo celular com os métodos descritos a seguir.

4. 2. 6. Caracterização Imunofenotípica de Células Hematopoiética de Medula Óssea

As suspensões de células obtidas conforme descrito nos itens 4. 2. 3. 5 e 4. 2. 4 foram centrifugadas por 5 minutos a 300g, em temperatura de 20-25°C. Repetida a lavagem, desta vez utilizando-se PBS/BSA 1% como tampão de lavagem. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspensão em 10µL do anticorpo (Tabela 2) e incubado por 20 minutos, em temperatura de 20-25°C. Centrifugou-se por 5 minutos a 300g, em temperatura de 20-25°C.

O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 500µL de PBS/BSA 1% e centrifugado por 5 minutos a 300g, em temperatura de 20-25°C. Repetiu-se a lavagem. Adicionou-se 200µL de paraformoldeído 1% ressuspendendo-se o sedimento celular em 500 µL de paraformoldeído 1% para após 30 minutos realizar as aquisições em citômetro de fluxo. A fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo FACScan (BD, San Jose, CA) usando excitação de 488nm com íon laser de argônio.

Tabela 2. Painel de anticorpos utilizados na caracterização imunofenotípica de células hematopoiéticas de medula óssea murina

População Celular de Medula Óssea Murina	Anticorpos¹	Clone	Isotipo¹ (<i>K</i> de rato)	Fluorocromo
Célula Tronco	Anti-Sca-1	D7	IgG 2 ^a	FITC ou PE
Células Progenitoras de Medula Óssea	Anti-CD34	8G12	IgG 1 ^a	FITC ou PE
		2B8		
Progenitor Mielóide	Anti-CD117		IgG 2b	FITC
		RB6 –		

Linhagem Granulocítica	Anti-Gr-1	8C5	IgG 2b	APC
		RA3 - 6B2		
Linhagem Linfóide B	Anti-B220		IgG 2 ^a	FITC
Linhagem Linfóide T	Anti-CD5	53 - 7.3	IgG 2 ^a	APC
Linhagem Eritróide	Anti-Ter-119	Ter-119	IgG 2b	FITC

¹ BD (Becton & Dickson)

4. 2. 6. 1. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo em células da Medula Óssea

Os dados obtidos na citometria de fluxo foram analisados sobre as populações escolhidas utilizando o programa *Cell Quest* do aparelho FASCalibur

4. 2. 6. 1. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo em células da Medula Óssea

4. 2. 6. 1. 1. Quantificação de DNA por Iodeto de Propídeo com RNase em Células Totais, Células CD34⁺, CD5⁺, CD117⁺, Gr-1⁺, B220⁺, Ter-119⁺, Sca-1⁺ e Células da Depleção Negativa de Medula Óssea

As suspensões de células obtidas conforme descrito nos itens 4. 2. 3. 5 e 4. 2. 4 foram centrifugadas por 5 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspensão em 1mL da

solução tampão do KIT: CycleTEST PLUS DNA Kit, BD, agitando-se gentilmente no vórtex. Este procedimento foi repetido por mais duas vezes. A seguir, ajustou-se a concentração celular para 5×10^5 células/mL com a solução tampão e a suspensão foi centrifugada a 400xg por 5 minutos em temperatura de 20-25°C, após centrifugação desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se, 50µL da solução A (tripsina). Homogeneizou-se levemente, sem vórtex, deixando reagir por 10 minutos à temperatura ambiente. Sem remover a solução A, adicionou-se 200µL da solução B (inibidor da tripsina e RNase). Homogeneizou-se levemente, sem vórtex, e deixou-se em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente. Sem remover as soluções A e B, adicionou-se 200µL da solução C de iodeto de propídio (previamente mantida em geladeira), homogeneizou-se levemente, sem vórtex, e incubou-se por 10 minutos em câmara escura e no refrigerador (2 – 8°C). Até a análise no citômetro, as amostras permaneceram sob temperatura de 2 – 8°C e ao abrigo da luz. As leituras foram realizadas no prazo máximo de 3 horas. A fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo FACScan (BD, San Jose, CA) usando excitação de 488nm com íon laser

4. 2. 6. 1. 2. Quantificação de DNA e RNA por Laranja de Acridina em Células Totais, Células CD34⁺, Células CD5⁺, Células Gr-1⁺ e Células Lin⁻ de Medula Óssea

Para 500µL de suspensões de células da medula óssea dos animais dos grupos nutrido e desnutrido contendo 2×10^6 células/mL, foi adicionada 0,4mL de solução ácida detergente (0,1% Triton X-100; 0,08N HCl; 1,5M NaCl). Após

15 segundos foi adicionado 1,2mL da solução de Laranja de Acridina 20 μ M, pH 6,0. A avaliação do DNA e do RNA foi realizada dentro de duas horas. A fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo FACScan (BD, San Jose, CA) usando excitação de 488nm com íon laser e detecção em fluorescente verde (530 $\pm$ 20nm) e vermelha (>620nm). A intensidade da fluorescência verde é proporcional ao conteúdo de DNA, enquanto que a intensidade da fluorescência vermelha corresponde ao conteúdo de RNA (HSIEH *et al.*, 2002).

4. 2. 7. Avaliação da Capacidade de Células Totais de Medula Óssea de Retornar ao Ciclo Celular após Administração de 5-Fluoracil (150mg/Kg, i.v.)

Após perda de aproximadamente 15% do peso corporal dos animais do grupo desnutrido administrou-se o quimioterápico 5-Fluoracil (FLUOROURACIL, AMERICAN PHARMACEUTICAL PARTNERS, lote 200463; 150mg/Kg, i.v.) nos animais dos grupos controle e desnutrido, com o intuito de fazer com que as células da medula óssea destes animais estivessem, em sua maioria, na fase G0 do ciclo celular, ou seja, fora do ciclo celular, para então avaliar a capacidade destas células de retornar ao ciclo celular. Após 10 e 15 dias da administração do quimioterápico, os animais de ambos os grupos foram submetidos aos protocolos para avaliação hematológica e avaliação do ciclo celular utilizando-se laranja de acridina e iodeto de propídeo.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos das determinações hematológicas e de citometria de fluxo foram submetidos ao Teste “t” sendo considerado estatisticamente significativo quando $p \leq 0,05$.

Os dados obtidos após os efeitos do quimioterápico 5-Fluoracil foram analisados pela ANOVA juntamente com os dados sem a administração desta droga.

6. RESULTADOS

6. 1. Avaliação da concentração protéica das rações

As rações controle e hipoprotéica utilizadas neste trabalho foram avaliadas quanto à concentração de proteínas pelo método de micro-Kjedahl, apresentando resultados dentro do esperado: 20,8g% $\pm$ 1,02; n=3); 1,94g% $\pm$ 0,12; n=3) respectivamente.

6. 2. Avaliação do estado nutricional

6. 2. 1. Consumo diário de ração e de proteínas, variação de peso corporal

Os camundongos que receberam a dieta hipoprotéica (ração II) apresentaram consumo diário médio de ração igual ao grupo controle, alimentado com a ração I (basal). Entretanto, o grupo desnutrido, em relação ao grupo controle, apresentou redução consumo de proteína estatisticamente significativa (Tabela 3)

6. 2. 2. Concentração de Proteínas e de Albumina plasmática

Os camundongos que receberam ração hipoprotéica apresentaram significativa perda de peso corporal em relação ao peso inicial bem como

redução das concentrações de proteínas totais e albumina plasmática quando comparados aos animais do grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentração de proteínas totais plasmática, albumina plasmática, variação de peso, consumo de ração e consumo de proteína de camundongos pertencentes aos grupos controle e desnutrido.

	GRUPOS	
	CONTROLE	DESNUTRIDO
	(n=18)	(n=16)
PROTEÍNAS TOTAIS (g/dL)	7,2 ± 0,98	4,8 ± 0,8*
ALBUMINA (g/dL)	4,2 ± 0,6	3,1 ± 0,4*
VARIAÇÃO DE PESO (g)	24,3 ± 2,78%	-22,4 ± 3,11%*
CONSUMO DE RAÇÃO (g)	4,9 ± 0,8g	4,7 ± 0,9g
CONSUMO DE PROTEÍNA (g)	0,098g	0,0091g*

Resultados expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão médio. Os animais do grupo **controle** e **desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student), n: número de animais utilizados no experimento.

6. 3. Avaliação Hematológica do Sangue Periférico

6. 3. 1. Série Eritrocitária

Os animais do grupo controle apresentaram parâmetros hematológicos considerados normais para a idade e sexo (GREER, 2004), inclusive morfologia, como anisocitose e policromasia moderadas, e a presença de corpúsculos de Howell-Jolly. Já os animais do grupo desnutrido apresentaram anemia, ou seja, houve redução da concentração de hemoglobina, do volume hematócrito e do número total de hemácias/mm³, assim como redução significativa do número de reticulócitos, entretanto mantiveram índices hematimétricos normais (Tabela 4). As características morfológicas observadas neste grupo foram anisocitose e microcitose moderadas, presença de corpúsculos de Howell-Jolly e discreta policromasia. Mesmo com redução de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, os animais do grupo desnutrido apresentaram valor do número absoluto de reticulócitos abaixo do esperado, diante da necessidade periférica, (com diferença estatística) que os dos animais do grupo controle (Tabela 4).

6. 3. 2. Série Leucocitária

No grupo controle a série leucocitária apresentou predomínio de linfócitos em relação aos neutrófilos e monócitos, tanto em valores relativos quanto absolutos, valores esses condizentes com a literatura (GREER, 2004). Eosinófilos e basófilos não foram observados no sangue periférico dos animais do grupo controle (Tabela 5).

Nos animais desnutridos observamos leucopenia com redução de todos os tipos celulares, exceto de monócitos, porém, foi mantido o predomínio de linfócitos sobre neutrófilos e monócitos, tanto em valores relativos quanto absolutos. Eosinófilos e basófilos, assim como no grupo controle, não foram encontrados no sangue periférico de animais do grupo desnutrido (Tabela 5).

Tabela 4 - Avaliação do eritrograma de camundongos pertencentes aos grupos controle e desnutrido

Parâmetros	Controle (n=18)	Desnutrido (n=16)
Eritrocitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$9,04 \pm 0,88$	$7,15 \pm 0,93^*$
Hemoglobina (g/dl)	$13,46 \pm 2,44$	$10,14 \pm 1,03^*$
Volume hematócrito(%)	$36,33 \pm 2,55$	$28,14 \pm 2,80^*$
VCM (fL)	$41,22 \pm 4,68$	$39,54 \pm 3,11$
HCM (pg)	$14,94 \pm 2,40$	$14,30 \pm 1,36$
CHCM (%)	$38,32 \pm 7,84$	$36,13 \pm 2,77$
Reticulócitos ($\times 10^5/\text{mm}^3$)	$4,53 \pm 0,79$	$2,49 \pm 0,65^*$

Resultados expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Tabela 5 - Avaliação da série leucocitária dos camundongos do grupo controle e desnutrido

Parâmetros	Controle	Desnutrido
	(/mm³, n=18)	(/mm³, n=16)
Leucócitos totais	2833 ± 730	1193 ± 625*
Neutrófilos	495 ± 181	339 ± 156
Segmentados		
Linfócitos	1468 ± 183	703 ± 245*
Monócitos	3,14 ± 0,83	7,80 ± 7,26*

Resultados em valores médios ± desvio padrão da média. Os camundongos Swiss, adultos, machos do grupo **controle (n=9)** e **desnutrido (n=7)** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *A diferença observada entre os grupos foi significativa ($p \leq 0,05$, teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

6. 3. 3. Mielograma e Esplenograma

A celularidade da medula óssea (MO) e do baço dos animais do grupo desnutrido apresentaram-se significativamente reduzidas em relação ao grupo controle (Tabela 6).

O mielograma demonstrou, nos animais do grupo desnutrido, redução, com diferença estatística, das células blásticas e de todos os tipos celulares, especialmente a linhagem granulocítica e da série eritróide, proporcionando assim predomínio da série linfocitária em vez da granulocítica, como observado em animais do grupo controle. No esplenograma, o grupo desnutrido apresentou redução estatisticamente diferente da série granulocítica em relação aos animais do grupo controle, acentuando-se à predominância da linhagem linfocítica neste grupo experimental (Tabela 7 e 8).

Tabela 6- Avaliação da Celularidade da Medula Óssea (MO) e Baço dos Camundongos do Grupo Controle e Desnutrido

Parâmetros	Controle (n=9)	Desnutrido (n=7)
Medula Óssea ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	15,17 $\pm$ 3,3	8,44 $\pm$ 2,53*
Baço ($\times 10^7/\text{mm}^3$)	8,81 $\pm$ 0,99	1,97 $\pm$ 0,45*

Número total médio $\pm$ desvio padrão da média de células nucleadas da medula óssea e do baço de camundongos Swiss, adultos, machos. Os animais do grupo **controle (n=9)** e **desnutrido (n=7)** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *A diferença observada entre os grupos foi significativa ($p \leq 0,05$, teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Tabela 7 - Mielograma dos Camundongos do Grupo Controle e Desnutrido

Parâmetros		Controle (n=9)	Desnutrido (n=7)
		(10 ⁵ /mm ³)	(10 ⁵ /mm ³)
Granulócitos	Blastos	1,69 ± 0,23	0,76 ± 0,59*
	Prómielócitos	11,16 ± 1,56	3,63 ± 2,13*
	Neutrófilos em Formas em Anel	19,81 ± 1,54	6,92 ± 1,58*
	Neutrófilos Segmentados	50,01 ± 3,26	17,69 ± 1,89*
	Eosinófilos	3,37 ± 1,61	1,01 ± ,067*
Linfócitos		38,21 ± 2,03	26,48 ± 1,26*
Monócitos		2,52 ± 1,60	0,70 ± 0,75*
Eritroblatos totais		43,64 ± 2,36	26,59 ± 2,80*
Plasmócitos		0,81 ± 0,90	0,34 ± 0,59*
Linhagem Megacariocítica		0,96 ± 0,29	0,28 ± 0,90*
Relação Granulo/Eritróide		1,97	1,13*
Relação Linfo/Eritróide		0,88	1,00

Número total médio ± desvio padrão da média de células nucleadas da medula óssea e do baço de camundongos Swiss, adultos, machos. Os animais do grupo **controle (n=9)** e **desnutrido (n=7)** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *A diferença observada entre os grupos foi significativa ($p \leq 0,05$, teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Tabela 8 – Esplenograma dos Camundongos do Grupo Controle e Desnutrido

Parâmetros	Controle (n=9)	Desnutrido (n=7)
	(10 ⁶ /mm ³)	(10 ⁶ /mm ³)

Granulócitos	Blastos	0,09 ± 0,65	0,01 ± 0,42
	Prómielócitos	0,67 ± 0,26	0,13 ± 0,38
	Neutrófilos em Formas em Anel	0,98 ± 0,62	0,52 ± 0,27
	Nentrófilos Segmentados	6,21 ± 1,26	1,89 ± 0,42*
	Eosinófilos	0,13 ± 0,28	0,07 ± 0,190
	Linfócitos	75,45 ± 2,34	14,48 ± 2,24*
	Monócitos	0,16 ± 0,55	0,10 ± 0,20
	Eritroblatos totais	4,21 ± 1,33	1,89 ± 0,37*
	Plasmócitos	0,19 ± 0,28	0,09 ± 0,15*
	Linhagem Megacariocítica	0,01 ± 0,14	0,01 ± 0,50
	Relação Granulo/Eritróide	1,92	1,39
	Relação Linfo/Eritróide	17,92	7,66*

Número total médio ± desvio padrão da média de células nucleadas da medula óssea e do baço de camundongos Swiss, adultos, machos. Os animais do grupo **controle (n=9)** e **desnutrido (n=7)** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *A diferença observada entre os grupos foi significativa ($p \leq 0,05$, teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

6. 4. Avaliação do Ciclo Celular de Células Totais, Células CD34⁺, Células CD5⁺, Células Gr-1⁺ e Células Lin⁻ de Medula Óssea (MO) Utilizando-se Acridina Laranja (AO)

Utilizando-se AO para marcação de RNA e DNA, e assim quantificá-los, evidenciou-se uma maior população, estatisticamente diferente, de células na fase G0 do ciclo celular (diplóide e baixa síntese de RNA) nos animais do grupo

desnutrido em relação aos do grupo controle. Também observou-se uma menor população, também com diferença significativa, de células na fase G1 no grupo desnutrido em relação que o grupo controle. Estes dados valem para todas as populações de células de medula óssea avaliadas: células totais, CD34⁺, CD5⁺, Gr-1⁺ e células Lin⁻ medula óssea (Figuras 5 e 6; Tabelas 7, 8, 10, 14 e 16).

6. 5. Avaliação da DNAploídia de Células Totais, Células CD34⁺, CD117⁺, Gr-1⁺, B220⁺, Ter-119⁺, Sca-1⁺ e Células Lin⁻ de Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido, Utilizando-se Iodeto de Propídeo (PI) em Citometria de Fluxo

Avaliando-se DNAploídia de células totais, células CD34⁺, células CD117⁺, células Gr-1⁺, células Sca-1⁺ e Células Lin⁻ de Medula Óssea com PI, evidenciou-se uma menor população, com diferença estatística, de células em fase proliferativa, S/G2/M, do ciclo celular e, conseqüentemente, uma maior população em G0/G1, nos animais do grupo desnutrido em relação aos do grupo controle. Em células B200⁺ e Ter-119⁺, não houve diferença entre os grupos experimentais com relações às diferentes fases do ciclo (Figura 7; Tabela 9, 11, 12, 13, 15, e 17).

Figura 3. Quantificação de células CD34⁺ em diferentes populações por citometria de fluxo após depleção positiva.

Após depleção positiva a quantificação das células CD34⁺ foi determinada em citometria de fluxo, utilizando antiCD34 marcado com PE ($\pm 620\text{nm}$), analisando três populações diferentes. a) a população analisada apresentou 92,62% de células CD34⁺; b) 94,56% células CD34⁺; c) 68,23% de células CD34⁺. Gráfico representativo, de experimentos com resultados similares, que demonstra as populações de células que expressam CD34 após depleção positiva com anti-CD34.

a)

b)

Figura 4. Quantificação de células de medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéico-energética Sca-1⁺/CD34⁺, Sca-1⁺/CD34⁻ e Sca-1⁻/CD34⁺ em população que não expressa antígenos de linhagens sanguíneas por citometria de fluxo após depleção negativa. Após depleção negativa a quantificação das células Sca-1⁺/CD34⁺, Sca-1⁺/CD34⁻ e Sca-1⁻/CD34⁺ foi determinada em citometria de fluxo, utilizando anti-Sca-1 marcado com FITC ($\pm 540\text{nm}$) e anti-CD34 marcado com PE ($\pm 620\text{nm}$). **a) Grupo Controle** A população analisada apresentou 68,0% de células Sca-1⁺/CD34⁺; 1,5% células Sca-1⁺/CD34⁻ e c) 30,5% de células Sca-1⁻/CD34⁺; **b) Grupo Desnutrido** A população analisada apresentou 60,0% de células Sca-1⁺/CD34⁺; 3,0% células Sca-1⁺/CD34⁻ e c) 37,0% de células Sca-1⁻/CD34⁺. Gráfico representativo de experimentos com resultados similares para 3 animais controles e de experimentos independentes com resultados similares para 4 animais desnutridos.

Tabela 7 - Avaliação do Ciclo Celular de Células Totais da Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando Laranja de Acridina (AO) em Citometria de Fluxo

Fases Ciclo Celular	Controle (% de células, n=5)	Desnutrido (% de células, n=6)
G0	28,13 $\pm$ 4,18	54,17 $\pm$ 15,76*
G1	53,96 $\pm$ 3,83	31,32 $\pm$ 14,90*
S	9,51 $\pm$ 3,09	6,20 $\pm$ 2,91
G2/M	8,72 $\pm$ 4,50	5,91 $\pm$ 0,94

Resultados em valores médios $\pm$ desvio padrão. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. * Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Figura 5. Avaliação do Ciclo Celular de Células Totais de Medula Óssea de Camundongos do Grupo Controle (C01) e de Camundongos Submetidos à

Desnutrição Protéico-Energética (D01). Definição, por citometria de fluxo, das fases do ciclo celular de células totais de medula óssea por DNAploidia (DNA) e quantidade de RNA/proteínas (RNA), utilizando-se Laranja de Acridina como marcador. DNA marcado por Laranja de Acridina emite fluorescência laranja ($\pm 620\text{nm}$), enquanto que RNA/proteína emite fluorescência verde ($530 \pm 20\text{nm}$). Gráfico representativo de experimentos com resultados similares para 5 animais controles e de experimentos independentes com resultados similares para 6 animais desnutridos.

Tabela 8- Avaliação do Ciclo Celular de Células CD34⁺ da Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando Laranja de Acridina (AO) em Citometria de Fluxo

Fases	Controle	Desnutrido
Ciclo Celular	(% de células, n=5)	(% de células, n=6)
G0	27,31 $\pm$ 7,09	45,51 $\pm$ 4,34*
G1	50,98 $\pm$ 4,17	34,89 $\pm$ 11,52*
S	11,80 $\pm$ 1,84	8,43 $\pm$ 4,98
G2/M	10,18 $\pm$ 4,46	7,07 $\pm$ 4,82

Resultados em valores médios $\pm$ desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Figura 6. Avaliação do Ciclo Celular de Células CD34⁺ de Medula Óssea de Camundongos do Grupo Controle (C05) e de Camundongos Submetidos à Desnutrição Protéico-Energética (D02). Definição por citometria de fluxo das fases do ciclo celular de células totais de medula óssea por DNAplóidia (DNA) e quantidade de RNA/proteínas (RNA), utilizando-se Laranja de Acridina como marcador. DNA marcado por Laranja de Acridina emiti fluorescência laranja ($\pm 620\text{nm}$), enquanto que RNA/proteína fluorescência verde ($530 \pm 20\text{nm}$). Gráfico representativo de experimentos com resultados similares para 5 animais controles e de experimentos independentes com resultados similares para 6 animais desnutridos.

Tabela 9- Avaliação da DNAploidia por Iodeto de Propídeo (PI) de Células Totais de Medula Óssea Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando-se Iodeto de propídeo (PI) em Citometria de Fluxo

Fases Ciclo Celular	Controle (% de células, n=5)	Desnutrido (% de células, n=7)
G0/G1	80,17 $\pm$ 2,68	87,12 $\pm$ 2,73*
S/G2/M	19,78 $\pm$ 2,64	13,32 $\pm$ 2,32*

Resultados em valores médios $\pm$ desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle (n=5)** e **desnutrido (n=7)** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). **n**: número de animais utilizados no experimento.

Figura 7. Avaliação da DNAploidia de Células Totais de Medula Óssea (MO) Camundongos do Grupo Controle (7C) e de Camundongos Submetidos à Desnutrição Protéico-Energética (10D). Definição por citometria de fluxo da DNAploidia ($\pm 620\text{nm}$) de células totais de medula óssea, utilizando-se Iodeto de Propídeo (PI). Gráfico representativo de um experimento de experimentos independentes com resultados similares para 5 animais controles e experimentos independentes com resultados similares para 7 animais desnutridos.

Tabela 10- Avaliação do Ciclo Celular de Células Lin⁻ da Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando Laranja de Acridina (AO) em Citometria de Fluxo

Fases	Controle	Desnutrido
Ciclo Celular	(% de células, n=4)	(% de células, n=4)
G0	33,3 ± 0,71	46,6 ± 4,24*
G1	47,6 ± 0,28	33,7 ± 3,82*
S/G2/M	18,1 ± 2,4	19,7 ± 0,42

Resultados em valores médios ± desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Tabela 11- Avaliação da DNAploidia por Iodeto de Propídeo (PI) de Células Sca-1⁺ de Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando-se Iodeto de propídeo (PI) em Citometria de Fluxo

Fases	Controle	Desnutrido
Ciclo Celular	(% de células, n=4)	(% de células, n=4)
G0/G1	66,30 ± 2,63	85,75 ± 7,69*
S/G2/M	33,7 ± 2,89	14,25 ± 7,69*

Resultados em valores médios ± desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Figura 8. Análise da DNAploídia de células de medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéico-energética Sca-1⁺ em população de células Lin⁻ com iodeto de propídeo por citometria de fluxo após depleção negativa. Após depleção negativa utilizando PI por citometria de fluxo determinou-se a DNAploídia de células Sca-1⁺ de camundongos dos grupos controle (gráficos **a**, **c**, **e**) e desnutrido (gráficos **b**, **d**, **f**). A fluorescência foi determinada em citometria de fluxo, utilizando anti-Sca-1 marcado com FITC ($\pm 540\text{nm}$) e PI ($\pm 620\text{nm}$). **a**, **b**) analisou-se população de baixa granulosidade e tamanho; **c**, **d**) expressão de Sca-1⁺ versus DNAploídia; **e**, **f**) Histograma de DNAploídia onde evidencia-se as populações G0/G1 e S/G2/M. Gráficos

representativos de experimentos independentes com resultados similares para 4 animais controles e experimentos independentes com resultados similares para 4 animais desnutridos.

Tabela 12- Avaliação da DNAploídia por Iodeto de Propídeo (PI) de Células CD117⁺ de Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando-se Iodeto de propídeo (PI) em Citometria de Fluxo

Fases	Controle	Desnutrido
Ciclo Celular	(% de células, n=4)	(% de células, n=4)
G0/G1	62,85 ± 2,21	71,50 ± 3,71*
S/G2/M	37,15 ± 1,31	28,50 ± 2,69*

Resultados em valores médios ± desvio padrão da média. Os animais do grupo controle e desnutrido receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Tabela 13- Avaliação da DNAploídia por Iodeto de Propídeo (PI) de Células B200⁺ de Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando-se Iodeto de propídeo (PI) em Citometria de Fluxo

Fases	Controle	Desnutrido
Ciclo Celular	(% de células, n=4)	(% de células, n=4)
G0/G1	87,15 ± 2,63	87,25 ± 0,47
S/G2/M	12,85 ± 2,63	12,75 ± 0,47

Resultados em valores médios ± desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística

significante ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Tabela 14 - Avaliação do Ciclo Celular de Células Gr-1⁺ da Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando Laranja de Acridina (AO) em Citometria de Fluxo

Fases	Controle	Desnutrido
Ciclo Celular	(% de células, n=4)	(% de células, n=4)
G0	37,70 $\pm$ 8,46	55,37 $\pm$ 6,34*
G1	51,45 $\pm$ 7,99	33,07 $\pm$ 8,48*
S/G2/M	11,35 $\pm$ 1,76	15,23 $\pm$ 2,81*

Resultados em valores médios $\pm$ desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística significante ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Tabela 15- Avaliação da DNAploidia por Iodeto de Propídeo (PI) de Células Gr-1⁺ de Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando-se Iodeto de propídeo (PI) em Citometria de Fluxo

Fases	Controle	Desnutrido
Ciclo Celular	(% de células, n=3)	(% de células, n=3)
G0/G1	87,65 $\pm$ 0,61	90,45 $\pm$ 0,37*
S/G2/M	12,35 $\pm$ 0,61	9,55 $\pm$,0,37*

Resultados em valores médios $\pm$ desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística

significante ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Tabela 16 - Avaliação do Ciclo Celular de Células CD5⁺ da Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando Laranja de Acridina (AO) em Citometria de Fluxo

Fases Ciclo Celular	Controle (% de células, n=5)	Desnutrido (% de células, n=5)
G0	46,73 $\pm$ 1,33	57,67 $\pm$ 2,39*
G1	37,00 $\pm$ 2,95	26,77 $\pm$ 7,16
S/G2/M	16,27 $\pm$ 1,75	15,57 $\pm$ 4,78

Resultados em valores médios $\pm$ desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Tabela 17- Avaliação da DNAploidia por Iodeto de Propídeo (PI) de Células Ter-119⁺ de Medula Óssea de Camundongos dos Grupos Controle e Desnutrido Utilizando-se Iodeto de propídeo (PI) em Citometria de Fluxo

Fases Ciclo Celular	Controle (% de células, n=3)	Desnutrido (% de células, n=3)
G0/G1	81,65 $\pm$ 1,92	85,40 $\pm$ 3,27
S/G2/M	18,35 $\pm$ 1,62	14,60 $\pm$ 1,27

Resultados em valores médios $\pm$ desvio padrão da média. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. *Diferença estatística

significante ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

6. 6. Avaliação Hematológica do Sangue Periférico e Celularidade da Medula Óssea e do Baço dos Animais dos Grupos Desnutrido e Controle Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-Fluoracil (150mg/Kg, i.v.)

6. 6. 1. Sangue Periférico

Após 10 e 15 dias da administração de 5-Fluoracil (Fluorouracil, American Pharmaceutical Partners, lote 200463; 150mg/Kg, i.v.) nos animais de ambos os grupos experimentais, evidenciou-se concentração de proteínas totais plasmática, albumina plasmática, variação de peso, consumo de ração e consumo de proteína igual estatisticamente aos grupos antes da administração da droga, assim como, com relação ao eritrograma, no grupo controle não houve alteração significativa nos valores do eritrograma, exceto no número absoluto de reticulócitos, onde se observou um aumento ($4,53 \times 10^5/\text{mm}^3 \pm 0,79$ para $11,3 \times 10^5/\text{mm}^3 \pm 3,88$ no 10º dia e $7,97 \times 10^5/\text{mm}^3 \pm 2,77$ no 15º dia). Entretanto, no grupo desnutrido no 10º dia não apresentou diferença significativa no número absoluto de reticulócitos em relação à antes da administração (de $2,49 \times 10^5/\text{mm}^3 \pm 0,65$ para $1,35 \times 10^5/\text{mm}^3 \pm 1,08$), e com alteração com significância estatística no 15º dia ($7,71 \times 10^5/\text{mm}^3 \pm 2,38$).

Com relação aos demais parâmetros eritrocitários em vários parâmetros, houve variação significativa dos animais do grupo desnutrido que receberam 5-Fluoracil em relação aos animais do mesmo grupo que não receberam. Assim, houve aumento no número de hemácias grupo desnutrido após o 10º dia de

administração, e no 15º dia, que apresentou redução acentuada da concentração de hemoglobina e do hematócrito. Com relação ao grupo controle, em ambos os períodos analisados o grupo desnutrido apresentou diferença estatística em vários parâmetros do eritrograma (Tabela 18).

Tabela 18 - Concentração de proteínas totais plasmática, albumina plasmática, variação de peso, consumo de ração e consumo de proteína de camundongos pertencentes aos grupos controle e desnutrido.

	GRUPOS	
	CONTROLE (n=18)	DESNUTRIDO (n=16)
PROTEÍNAS TOTAIS (g/dL)	6,8 ± 0,79	4,3 ± 0,8*
ALBUMINA (g/dL)	4,1 ± 0,6	2,9 ± 0,4*
VARIAÇÃO DE PESO (g)	26,8 ± 3,08%	-23,7 ± -3,14%*
CONSUMO DE RAÇÃO (g)	4,7 ± 0,7g	4,5 ± 1,1g
CONSUMO DE PROTEÍNA (g)	0,099g	,0090g*

Resultados expressos em valores médios ± desvio padrão de animais do grupo controle (n=9) e desnutrido (n=9) sem tratamento com 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) e animais controles (10 dias n=7; 15 dias n=6) e desnutridos (10 dias n=7; 15 dias n=6) tratados com 5-fluoracil receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Assim que os animais do grupo desnutrido perderam 15% de peso foi administrado 5-fluoracil em ambos os grupos, e após 10 dias desta administração estes animais foram sacrificados para avaliação do eritrograma. Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. a, b, c, d, e Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, com 5-Fluoracil em 15 dias, com o grupo desnutrido sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, respectivamente (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

Quanto à morfologia, observou-se no grupo controle apresentou anisocitose e policromasia acentuada e com presença intensa de corpúsculos de Howell-Jolly após o 10º dia da administração do quimioterápico, sugerindo uma eritropoese ativa. Entretanto, após o 15º dia, a anisocitose, a policromasia e a presença de corpúsculos de Howell-Jolly foram menos intensas. Já os animais do grupo desnutrido apresentaram anisocitose discreta, microcitose moderada e presença discreta de corpúsculos de Howell-Jolly e ausência de policromasia, exceto após o 15º dia que foi observada maior presença de corpúsculos de Howell-Jolly e policromasia, assim como foi observada moderada poiquilocitose com esquizócitos.

Tabela 19- Avaliação do Eritrograma dos Animais dos Grupos Desnutrido e Controle Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-Fluoracil

Resultados expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão de animais do grupo **controle (n=9)** e

Parâmetros	Controle			Desnutrido		
	sem 5-Fluoracil	10 dias 5-Fluoracil	15 dias 5-Fluoracil	sem 5-Fluoracil	10 dias 5-Fluoracil	15 dias 5-Fluoracil
Hemácia ($10^6/\text{mm}^3$)	9,04 $\pm$ 0,88	9,53 $\pm$ 0,17	9,38 $\pm$ 0,36	5,00 $\pm$ 0,93 a b	7,16 $\pm$ 0,80 a b c d	5,14 $\pm$ 1,02 a b c e
Hemoglobina (g/dL)	13,46 $\pm$ 2,44	12,83 $\pm$ 0,32	13,32 $\pm$ 1,69	10,14 $\pm$ 1,03 a b c	9,75 $\pm$ 0,65 a b c	6,81 $\pm$ 1,36 a b c d e
Hematócrito (%)	36,33 $\pm$ 2,55	40,67 $\pm$ 2,52	42,13 $\pm$ 3,61	28,14 $\pm$ 2,80 a b c	27,00 $\pm$ 2,16 a b c	18,2 $\pm$ 2,43 a b c d e
VCM (fL)	41,22 $\pm$ 4,68	42,66 $\pm$ 2,58	45,16 $\pm$ 3,95	39,54 $\pm$ 3,11 c	37,98 $\pm$ 1,61 a b c	35,01 $\pm$ 2,75 a b c d
HCM (pg)	14,94 $\pm$ 2,40	13,47 $\pm$ 0,51	14,20 $\pm$ 1,89	14,30 $\pm$ 1,36	13,68 $\pm$ 0,97	13,25 $\pm$ 2,64
CHCM (%)	38,32 $\pm$ 7,84	31,61 $\pm$ 1,57	31,62 $\pm$ 3,96	36,13 $\pm$ 2,77	37,94 $\pm$ 2,25	37,40 $\pm$ 3,81
Reticulócitos ($\times 10^5/\text{mm}^3$)	4,53 $\pm$ 0,79	11,30 $\pm$ 3,88 a	7,97 $\pm$ 2,77 a	2,49 $\pm$ 0,65 a b c	1,35 $\pm$ 1,08 a b c d	7,71 $\pm$ 2,38 a b d e

desnutrido (n=9) sem tratamento com 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) e animais controles (10 dias n=7; 15 dias n=6) e desnutridos (10 dias n=7; 15 dias n=6) tratados com 5-fluoracil receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Assim que os animais do grupo desnutrido perderam 15% de peso foi administrado 5-fluoracil em ambos os grupos, e após 10 dias desta administração estes animais forma sacrificados para avaliação do eritrograma. Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. a, b, c, d, e Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, com 5-Fluoracil em 15 dias, com o grupo desnutrido sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, respectivamente (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

6. 6. 2. Série Leucocitária

Quanto ao leucograma o grupo desnutrido manteve uma contagem absoluta reduzida, com diferença estatística em relação ao grupo controle antes da administração do 5-Fluoracil. Entretanto, após o 10º dia da administração da droga, ambos os grupos apresentaram um aumento de segmentados com diminuição de linfócitos, sendo que no grupo controle esta alteração foi mais acentuada (Tabela 19). Já após o 15º dia o valor de segmentados foi reduzido e o de linfócito aumentado acentuadamente, principalmente no grupo desnutrido, assim como neste grupo evidenciou-se aumento de mais de 100% da contagem global de leucócitos. As variações acima citadas apresentaram-se com diferença significativa em relação ao grupo controle e ou aos grupos sem à ação do quimioterápico.

Tabela 20 - Avaliação Leucocitária de Sangue Periférico dos Animais dos Grupos Desnutrido e Controle Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-Fluoracil

Resultados expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão de animais do grupo **controle (n=9)** e **desnutrido (n=9)** sem tratamento com 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) e animais **controles (10 dias n=7; 15 dias n=6)** e **desnutridos (10 dias n=7; 15 dias n=6)** tratados com 5-fluoracil receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de

Parâmetros	Controle			Desnutrido		
	sem	10 dias	15 dias	sem	10 dias	15 dias
	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil
Leucócitos (/mm ³)	2833 $\pm$ 29,7	3050 $\pm$ 18,32	3250 $\pm$ 29,35	1193 $\pm$ 11,1	1026 $\pm$ 5,40	2150 $\pm$ 7,42
			a	a b c	a b c	a b c d e
Neutrófilos segmentados (/mm ³)	495 $\pm$ 1,81	1992 $\pm$ 9,79	1235 $\pm$ 13,74	339 $\pm$ 1,56	402 $\pm$ 2,25	258 $\pm$ 1,58
		a	a b	b c	b c	a b c d e
Linfócitos (/mm ³)	1468 $\pm$ 1,83	1058 $\pm$ 5,99	2015 $\pm$ 6,75	703 $\pm$ 2,45	624 $\pm$ 3,26	1892 $\pm$ 3,21
			a b	a b	a b c	a b c d e
Monócitos (/mm ³)	3,14 $\pm$ 0,83	0,00	0,00	7,80 $\pm$ 1,26	0,00	0,00
		a	a	a b c	a d	a d

proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Assim que os animais do grupo desnutrido perderam 15% de peso foi administrado 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) em ambos os grupos, e após 10 dias desta administração estes animais foram sacrificados para avaliação leucocitária. Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. a, b, c, d, e Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, com 5-Fluoracil em 15 dias, com o grupo desnutrido sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, respectivamente (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

6. 6. 3. Mielograma e Esplenograma

Após 10 dias da administração de 5-Fluoracil houve uma redução de aproximadamente 50% da celularidade da medula óssea em ambos os grupos. Sendo que após o 15º dia estas celularidades praticamente retornaram aos valores observados antes da administração da droga. Já no baço, a celularidade apresentou-se aproximadamente três vezes maior no grupo controle e cinco vezes maior no desnutrido, quando comparados com seus respectivos grupo antes da intervenção deste quimioterápico após o 10º dia. Após o 15º dia esse aumento foi menos intenso em ambos os grupos, sendo que no grupo desnutrido esta contagem manteve-se acentuada em relação ao grupo desnutrido antes da administração de 5-Fluoracil (Tabela 20).

Tabela 21 - Avaliação da Celularidade da Medula Óssea (MO) e Baço dos Animais dos Grupos Desnutrido e Controle Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-Fluoracil (150mg/Kg, i. v.)

Parâmetros	Controle			Desnutrido		
	sem	10 dias	15 dias	sem	10 dias	15 dias
	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil
MO (x10 ⁶ /mm ³)	15,17 ± 3,3	9,43 ± 3,7	13,5 ± 6,52	8,44 ± 2,53	3,69 ± 0,66	6,25 ± 3,51
		a	b	a c	a b c d	a b c e
Baço (x10⁷/mm³)	8,81 ± 0,99	28,73 ± 2,70	19,9 ± 4,12 a	1,97 ± 0,45	11,73 ± 1,36	7,6 ± 2,35
		a	b	a b c	a b c d	a b c d e

Resultados expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão de animais do grupo controle (n=9) e desnutrido (n=9) sem tratamento com 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) e animais controles (10 dias n=9; 15 dias n=8) e desnutridos (10 dias n=9; 15 dias n=8) tratados com 5-fluoracil receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Assim que os animais do grupo desnutrido perderam 15% de peso foi administrado 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) em ambos os grupos, e após 10 dias desta administração estes animais foram sacrificados para avaliação de celularidade estes órgãos. Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. a, b, c, d, e Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, com 5-Fluoracil em 15 dias, com o grupo desnutrido sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, respectivamente (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

O mielograma após 10 dias da administração de 5-Fluoracil mostrou que o grupo controle manteve as mesmas proporções numéricas para as linhagens celulares. Já o grupo desnutrido apresentou predomínio da série eritrocítica, série esta que não apresentou redução em relação à antes da administração do quimioterápico. Portanto, houve manteve-se a redução acentuada da linhagem granulocítica. Em ambos os grupos houve diferença significativa em todas as linhagens celulares, exceto série eritrocítica do grupo desnutrido com 5-Fluoracil, tanto quando se compara antes e depois da administração da droga quanto quando se compara os grupos desnutrido e controle tratados com o fármaco (Tabela 21).

Após o 15º dia da administração da droga os parâmetros do mielograma foram mantidos, exceto pela predominância das séries eritrocítica e linfocítica em ambos os grupos, assim como maior presença de células jovens da série granulocítica, principalmente no grupo controle, e por uma redução acentuada no número de neutrófilos segmentados no grupo desnutrido.

Em ambos os grupos o esplenograma mostrou que houve aumento acentuado das séries eritrocítica e, principalmente, linfocítica 10 e 15 dias após a administração de 5-Fluoracil, não havendo alteração numérica nas outras linhagens, sendo que no 10º dia estes aumentos nestas séries foram mais axarcebados. Somente estas duas séries apresentaram diferença estatística tanto em relação à antes da administração do quimioterápico quanto quando comparados os grupos desnutrido e controle tratados com 5-Fluoracil (Tabela 22).

Tabela 22 – Mielograma dos Animais dos Grupos Desnutrido e Controle Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-Fluoracil (150mg/Kg, i. v.)

Parâmetros		Controle (x10 ⁵ /mm ³)			Desnutrido (x10 ⁵ /mm ³)		
		Sem	10 dias	15 dias	sem	10 dias	15 dias
Granulócitos		5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil
	Blastos	1,69 ± 0,65	0,72 ± 0,43	1,89 ± 1,33	0,76 ± 0,32	0,41 ± 0,31	0,48 ± 1,01
			a	b	a c	a c	a b c
	Pró-mielócitos	11,16 ± 2,49	3,51 ± 0,98	8,86 ± 1,69	3,63 ± 2,78	1,81 ± 0,42	2,01 ± 1,89
			a	a b	a c	a b c	a b c
	Neutrófilos Forma	19,81 ±	8,21 ± 1,31	13,32 ± 2,56	6,92 ± 1,21	4,67 ± 1,56	5,23 ± 2,31
	Anel	2,42	a	a b	a c	a b c	a b c
	Neutrófilos-segmentados	50,01 ±	30,01 ± 2,36	28,23 ± 3,69	17,69 ± 2,18	11,99 ± 2,76	6,45 ± 3,03
		4,36	a	a	a b c	a b c d	a b c e
	Eosinófilos	3,37 ± 2,96	1,01 ± 0,89	0,45 ± 2,45	1,01 ± 1,90	0,54 ± 0,24	0,32 ± 1,03
		a	a b	a c	a	a b c	
Linfócitos	38,21 ± 2,04	18,06 ± 2,60	40,47 ± 3,93	26,48 ± 2,24	17,84 ± 2,15	21,36 ± 3,12	
		a	a	a b c	a c d	a b c d	
Monócitos	2,52 ± 1,96	0,58 ± 0,60	0,79 ± 1,23	0,70 ± 0,70	0,31 ± 0,48	0,35 ± 1,01	
		a	a	a	a	a b c	
Eritroblatos	43,64 ± 3,36	32,24 ± 2,43	40,56 ± 6,35	26,59 ± 2,81	29,41 ± 2,68	29,63 ± 3,21	
		a	b	a c	a c	a b c	
Plasmócitos	0,81 ± 0,82	0,09 ± 0,24	0,43 ± 1,23	0,34 ± 0,21	0,02 ± 0,61	0,16 ± 0,82	
		a	a b	a b	a	a b c	
Linhagem Megacariocítica	0,96 ± 0,62	1,23 ± 0,53	1,89 ± 1,11	0,28 ± 0,42	0,70 ± 0,48	0,59 ± 0,64	
			a b	a b c	b c	a b c	
Relação	1,97	1,35	1,24	1,13	0,66	0,46	
Granulo/Eritróide				a	a b	a b c	
Relação Linfo/Eritróide	0,88	0,56	1,02	1,00	0,61	0,72	
		a	b	b	a b	a b c	

Resultados expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão da média de animais do grupo **controle (n=9)** e **desnutrido (n=9)** sem tratamento com 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) e animais controles (10 dias n=9; 15 dias n=8) e desnutridos (10 dias n=9; 15 dias n=8) tratados com 5-fluoracil receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Assim que os animais do grupo desnutrido perderam 15% de peso foi administrado 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) em ambos os grupos, e após 10 dias desta administração estes animais foram sacrificados para avaliação de celularidade destes órgãos. Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. a b c d e Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, com 5-Fluoracil em 15 dias, com o grupo desnutrido sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, respectivamente (Teste t-Student).

Tabela 23– Esplenograma dos Animais dos Grupos Desnutrido e Controle Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-Fluoracil (150mg/Kg, i. v.)

Parâmetros	Controle ($\times 10^5/\text{mm}^3$)			Desnutrido ($\times 10^5/\text{mm}^3$)		
	Sem	10 dias	15 dias	sem	10 dias	15 dias
	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil

Granulócitos	Blastos	0,09 ± 0,65	0,03 ± 0,11	0,05 ± 0,36	0,01 ± 0,21	0,01 ± 0,15	0,01 ± 0,09
			a	a	a	a	a
	Pró-mielócitos	0,67 ± 0,29	0,25 ± 0,43	0,24 ± 0,45	0,13 ± 0,38	0,09 ± 0,20	0,10 ± 0,13
			a	a	a	a b c	a b c
	Neutrófilos Forma	0,98 ± 0,62	0,44 ± 0,25	0,38 ± 0,39	0,52 ± 0,27	0,48 ± 0,11	0,36 ± 0,16
	Anel		a	a b	a	a	a
	Neutrófilos-segmentados	6,21 ± 3,16	4,18 ± 2,98	3,89 ± 4,23	1,79 ± 0,12	1,97 ± 0,93	2,01 ± 0,71
				a	a b c	a b c	a b c
	Eosinófilos	0,13 ± 0,21	0,07 ± 0,31	0,06 ± 1,23	0,07 ± 0,24	0,02 ± 0,21	0,01 ± 0,18
						a	a
	Linfócitos	75,45 ± 8,94	215,29 ± 5,66	127,22 ± 10,12	19,08 ± 3,2	69,84 ± 5,31	38,35 ± 3,54
			a	a b	a b c	b c d	a b c d e
	Monócitos	0,16 ± 0,55	0,09 ± 0,32	0,08 ± 0,63	0,10 ± 0,24	0,07 ± 0,25	0,06 ± 0,31
	Eritroblatos	43,64 ± 3,60	64,24 ± 3,76	65,23 ± 3,78	22,59 ± 2,87	43,92 ± 2,68	34,26 ± 1,31
			a	a	a b c	b d	a b c d e
	Plasmócitos	0,81 ± 0,29	1,56 ± 1,31	0,89 ± 1,56	0,04 ± 0,12	0,5 ± 0,30	0,39 ± 0,08
						b c d	a b c d e
	Linhagem Megacariocítica	0,96 ± 0,62	0,79 ± 0,67	0,81 ± 0,42	0,08 ± 0,40	0,4 ± 0,48	0,49 ± 0,15
					a b c	a b c	a b c d
	Relação	1,92	0,08	0,07	1,97	0,06	1,12
			a	a	b c	a d	a b c d e
	Granulo/Eritróide						
	Relação Linfo/Eritróide	17,92	3,35	1,95	0,88	1,59	0,07
			a	a b	a b	a b d	a b c d e

Resultados expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão da média de imais do grupo **controle (n=9)** e **desnutrido (n=9)** sem tratamento com **5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.)** e **animais controles (10 dias n=9; 15 dias n=8 e desnutridos (10 dias n=9 15 dias n=8) tratados com 5-fluoracil** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Assim que os animais do grupo desnutrido perderam 15% de peso foi administrado 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) em ambos os grupos, e após 10 dias desta administração estes animais foram sacrificados para avaliação de celularidade estes órgãos. Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. a, b, c, d, e Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, com 5-Fluoracil em 15 dias, com o grupo desnutrido sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, respectivamente (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

6. 7. Avaliação do Ciclo Celular de Células Totais de Medula Óssea (MO) dos Animais dos Grupos Controle e Desnutrido 10 e 15 Dias Após a Administração de 5-Fluoracil (150mg/Kg, i.v.), Utilizando-se Laranja de Acridina (AO)

Utilizando-se laranja de acridina para avaliar as populações celulares em diferentes fases do ciclo celular de células totais de medula óssea dos animais dos grupos experimentais, observou-se que o grupo desnutrido com 5-Fluoracil (D5F, 150mg/Kg, i.v.) manteve uma maior população, com diferença estatística, de células na fase G0 do ciclo celular, estado de repouso, em relação aos grupos controle, tanto tratado como não tratado com 5-Fluoracil. Também se observa diferença estatística entre os grupos desnutrido tratado e não tratados, e os grupos controle tratado e não tratados com 5-Fluoracil (Figuras 8; Tabela 23).

Após o 15º dia o grupo controle com 5-Fluoracil apresentou uma menor população de células, com diferença estatística, na fase G0 em relação ao grupo controle com 10 dias da administração do quimioterápico, embora ainda maior, com diferença estatística, em relação ao grupo controle sem a droga. O grupo desnutrido tratado com a droga após 15 dias manteve uma população de células na fase de repouso igual ao grupo desnutrido de 10 dias, assim apresentando diferença em relação aos grupos controle tratado e não tratado, e ao desnutrido não tratado (Figuras 8; Tabela 23).

Os grupos controle com 5-Fluoracil (C5F, 150mg/Kg, i.v.) e desnutrido com 5-Fluoracil (D5F, 150mg/Kg, i.v.) apresentaram redução na população de células em G1 quando comparados com os grupos controle (C) e desnutrido (D) sem tratamento, respectivamente, em ambos os intervalos da administração da droga, 10 e, principalmente, 15 dias. Em S/G2/M, após o 10º dia o grupo controle com 5-Fluoracil manteve, numericamente, uma população

de células como observado no grupo sem o tratamento. Já os animais do grupo desnutrido tratados com 5-fluoracil apresentaram significativo aumento da população celular em S/G2/M em relação ao grupo sem tratamento. Entretanto após 15 dias da administração do quimioterápico, ambos os grupos apresentaram aumento da população celular em fase proliferativa, principalmente, no grupo controle (Figuras 9; Tabela 23).

Figura 9. Avaliação do Ciclo Celular de Células Totais de Medula Óssea de Camundongos Controles (2CF) e Submetidos à Desnutrição Protéico-Energética (2DF) Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.). Definição por citometria de fluxo das fases do ciclo celular de células totais de medula óssea por DNAplóidia (DNA) e quantidade de RNA/proteínas (RNA), utilizando-se Laranja de Acridina como marcador. DNA marcado por Laranja de Acridina emite fluorescência laranja ($\pm 620\text{nm}$), enquanto

que RNA/proteína fluorescência verde ($530 \pm 20\text{nm}$). Gráfico demonstrativo de experimentos independentes para 7 animais após 10 dias de 5-fluoracil; experimento representativo de experimentos os para 6 animais após 15 dias de 5 fluoracil.

Tabela 24- Avaliação do Ciclo Celular por Laranja de Acridina (AO) de Células Totais de Medula Óssea (MO) Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-Fluoracil em Citometria de Fluxo

Parâmetros	Controle			Desnutrido		
	sem	10 dias	15 dias	sem	10 dias	15 dias
	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil

G0	28,13 ± 4,18	54,91 ± 11,75 a	41,34 ± 8,36 a b	54,17 ± 15,76 a c	60,17 ± 3,85 a b c d	61,23 ± 7,89 a b c d
G1	53,96 ± 3,83	38,95 ± 12,28 a	29,75 ± 7,89 a b	31,32 ± 14,90 a b	20,76 ± 7,10 a b c d	16,76 ± 6,53 a b c d e
S	9,51 ± 3,09	8,79 ± 2,50	14,34 ± 3,26 a b	6,20 ± 2,91 a c	8,24 ± 2,79	9,89 ± 3,48 c d
G2/M	8,72 ± 4,50	10,97 ± 6,63	14,57 ± 3,98 a	5,91 ± 0,94 a b c	10,87 ± 2,11 c	12,12 ± 3,96 d

Resultados expressos em valores médios $\pm$ desvio padrão da média de animais do grupo controle (n=9) e desnutrido (n=9) sem tratamento com 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) e animais controles (10 dias n=8; 15 dias n=7) e desnutridos (10 dias n=8 15 dias n=7) tratados com 5-fluoracil receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Assim que os animais do grupo desnutrido perderam 15% de peso foi administrado 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) em ambos os grupos, e após 10 dias desta administração estes animais foram sacrificados para avaliação do ciclo celular. Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. a, b, c, d, e Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, com 5-Fluoracil em 15 dias, com o grupo desnutrido sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, respectivamente (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

6. 8. Avaliação da DNAploidia de Células Totais de Medula Óssea (MO) dos Animais dos Grupos Controle e Desnutrido Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-Fluoracil (150mg/Kg, i.v.) Utilizando-se Iodeto de Propídeo (PI)

Para avaliar-se o conteúdo de DNA nos animais dos grupos experimentais em questão utilizou-se iodeto de propídeo. Os grupos C, C5F e D5F não apresentaram diferença na proporção de células em G0/G1. Apenas os animais do grupo D apresentaram diferença significativa em relação aos demais grupos (Figura 10; Tabela 24).

Figura 10. Avaliação da DNAploídia de Células Totais de Medula Óssea (MO) de Camundongos Camundongos Controlos (1CF) e Submetidos à Desnutrição Protéico-Energética (3DF) Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.). Definição por citometria de fluxo da DNAploídia

($\pm 620\text{nm}$) de células totais de medula óssea, utilizando-se Iodeto de Propídeo (PI). Gráfico demonstrativo de experimentos independentes para 7 animais após 10 dias de 5-fluoracil; experimento representativo de experimentos os para 6 animais após 15 dias de 5 fluoracil.

Tabela 25 - Avaliação da DNAploídia por Iodeto de Propídeo (PI) de Células Totais de Medula Óssea (MO) Após 10 e 15 Dias da Administração de 5-Fluoracil em Citometria de Fluxo

Parâmetros	Controle			Desnutrido		
	sem	10 dias	15 dias	sem	com	15 dias
	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil	5-Fluoracil

G0/G1	80,17 ± 2,68	78,84 ± 2,32	71,82 ± 2,71	87,12 ± 2,73	80,99 ± 4,44	82,36 ± 3,61
			a b	a b c	c d	c d
S/G2/M	19,78 ± 2,64	19,77 ± 8,36	29,51 ± 6,35	13,32 ± 2,32	19,61 ± 4,54	17,63 ± 4,75
			a b	a b c	c d	c d

Resultados em valores médios $\pm$ desvio padrão médio. Os animais do grupo **controle com 5-Fluoracil (10 dias n=7; 15 dias n=6)** e **desnutrido com 5-Fluoracil (10 dias n=7; 15 dias n=6)** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (contendo 2% de proteína). Assim que os animais do grupo desnutrido perderam 15% de peso foi administrado 5-fluoracil (150mg/Kg, i.v.) em ambos os grupos, e após 10 e 15 dias desta administração estes animais foram sacrificados para avaliação do ciclo celular. Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. a, b, c, d, e Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, com 5-Fluoracil em 15 dias, com o grupo desnutrido sem 5-Fluoracil, com 5-Fluoracil 10 dias, respectivamente (Teste t-Student). n: número de animais utilizados no experimento.

7. Discussão

Em países industrializados a desnutrição protéico-energética geralmente é secundária a outras doenças, acometendo tanto crianças como adultos e de alta prevalência em idosos e pacientes hospitalizados. Já em países subdesenvolvidos, a principal causa de DPE é primária, com sua endemicidade acometendo principalmente lactentes e crianças (BARON, 1997; VISVANATHAN, *et al.*, 2003; CERECEDA, *et al.*, 2003).

Como o tecido sanguíneo caracteriza-se por sua alta taxa de renovação, tendo em vista que as células maduras apresentam tempo de vida na circulação sangüínea relativamente curto (OGAWA, 1993), a avaliação das alterações decorrentes da desnutrição protéico-energético em um tecido tão exigente nos parece primordial para melhor compreensão e resolução desta condição patológica que compromete cerca de 800 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2004).

Em nosso laboratório o modelo murino de desnutrição protéica experimental empregado foi o desenvolvido por Garcia, 1992, em sua tese de doutorado. Modelo este que tem permitido a compreensão dos efeitos da desnutrição no processo da hematopoese e de aspectos da resposta inflamatória (BORELLI *et al.*, 1995 e 1998; BORELLI; NARDINELLI, 2001; BORSATO, 1999; SOUZA *et al.*, 2001; VITURI *et al.*, 2000; XAVIER, 1999. XAVIER *et al.*, 1999).

Neste modelo utiliza-se camundongos da espécie *Mus musculus*, machos com 2 a 3 meses de idade (adultos). O sexo foi escolhido para evitar a flutuação hormonal do ciclo estral e, portanto, sua influência na cinética de células sangüíneas (GRIFFITH, 1942) e a idade adulta devido à estabilização do sistema hematopoético (BANNERMAN, 1983).

As formulações das rações normoprotéica e hipoprotéica utilizadas no processo de desnutrição experimental foram elaboradas considerando os teores de vitaminas, ácidos graxos e sais minerais necessários para fornecer uma dieta adequada, restringindo-se apenas a quantidade de proteína da ração hipoprotéica. Neste modelo a desnutrição experimental é inicialmente causada pela deficiência de proteínas.

A elevada e constante necessidade de proteínas por parte do tecido hematopoético faz com que seja comum a observação de alterações como anemia (MARTINS *et al.*, 1971; DE ANGELIS, 1986; AUGUSTO, 1995; LEE; HERBERT, 1999; COTRAN *et al.*, 2000) e leucopenia (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995) com linfocitopenia (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995, 2007; AUGUSTO, 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI *et al.*, 1995; BARON, 1997) em desnutrição protéica energética experimental.

Frente à DPE, também encontramos que progenitores grânulo-monocíticos apresentam menor capacidade proliferativa e redução da população de células CD34⁺ e progenitores mielóides e linfóides (BORELLI *et al.*, 1995; BITENCOURT *et al.*, 1995; XAVIER, 1999; BORSATTO, 1999; KLASING, 1998; VITURI *et al.*, 2000; FOCK *et al.*, 2002; 2004; BLATT, 2004).

Neste trabalho os camundongos do grupo experimental desnutrido desenvolveram anemia com ausência importante de reticulocitose. Porém, o conteúdo de hemoglobina intracorpúscular foi preservado e sem alteração qualitativamente e, ou quantitativamente da estrutura da membrana celular, ou ainda, promover modificações metabólicas nos eritrócitos. Sugerimos que a anemia seja ocasionada pela alteração na capacidade de proliferação e maturação da célula progenitora, não sendo causada por deficiência de ferro (BORELLI *et al.*, 2007). Crianças com *kwashiorkor* e *marasmus* apresentaram alterações no eritrograma, no ferro sérico e na capacidade total de ligação ao ferro (ALEMNJI *et al.*, 1995), assim como em ratos submetidos a dieta com 5% de proteína apresentam diminuição da produção de eritropoetina, comprometimento da eritropoese, redução de hematócrito e de função granulocítica (FRIED *et al.*, 1978).

Em um estado anêmico, a resposta da medula óssea é traduzida em reticulocitose, a sua ausência significa alterações no nível do tecido medular (GREER *et al.*, 2004). A reticulocitopenia observada neste trabalho, mesmo na presença de anemia no grupo desnutrido, demonstra a existência de um comprometimento de progenitores hematopoéticos ou pelo menos de progenitores mielóides/eritróides.

A medula óssea é constituída por células do tecido hemopoético, células estromais e células acessórias em associação com as macromoléculas da matriz extracelular (MEC), formando uma estrutura altamente organizada e ricamente vascularizada. Os sinusóides estão separados das células hemopoéticas por uma única camada de células endoteliais e uma rede de células reticulares que atua como suporte para a formação dos cordões hemopoéticos. A medula óssea é um reservatório de células tronco hemopoéticas, e sua organização estrutural fornece um microambiente adequado para proliferação e diferenciação de células precursoras e também para a liberação de células sangüíneas diferenciadas para a circulação (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; HUTCHISON; DAVEY, 1996).

Hipocelularidade da medula óssea (BORELLI *et al.*, 1995), com evidências histológicas de alteração da matriz extracelular, tem sido observada freqüentemente em desnutrição protéica experimental (XAVIER, 1999; VITURI *et al.*, 2000; XAVIER *et al.*, 1999).

Camundongos submetidos à desnutrição protéica apresentaram hipotrofia crescente do tecido mielóide em função do grau de desnutrição, destacando-se depleção dos setores eritróides, grânulo-monocíticos e, nos graus mais intensos de desnutrição, depleção também do setor megacariocítico e bloqueio maturativo (XAVIER, 1999). Este fato pode estar relacionado a alterações do microambiente desses órgãos (XAVIER, 1999; VITURI *et al.*, 2000), e/ou a produção deficiente de citocinas (KLASING, 1998; FOCK *et al.*,

2004). O fator inibidor de migração leucocitária está aumentado em crianças com *kwashiorkor* e *marasmus* (HERESI *et al.*, 1981; FONGWO *et al.*, 1999).

Segundo Bitencourt *et al.*, 1995 e Gonzalez *et al.*, 2002, a desnutrição gera menor capacidade de reparo do DNA. Jacob *et al.*, 1989, evidenciou que após cinco ou quatorze dias de desnutrição experimental, ocorreu um aumento da percentagem de células nas fases G0/G1 do ciclo celular. Sendo que a reconstituição nutricional após cinco e quatorze dias de restrição protéica induziu rápida recuperação na percentagem de células na fase S e um decréscimo na proporção de células nas fases G0/G1 do ciclo celular.

Através da quantificação de DNA e RNA, e pela DNAploidia por citometria de fluxo utilizando-se laranja acridina e iodeto de propídeo, respectivamente (HSIEH *et al.*, 2002), observamos que a medula óssea dos animais submetidos à desnutrição protéico-energética continha uma maior população de células diplóide e com irrisória síntese de RNA, considerada então como em estado de repouso do ciclo celular, fase G0, assim como uma menor população em fases proliferativas, fases S/G2/M, em relação aos animais do grupo controle, o que é condizente com a hipoplasia e com o binômio anemia/reticulocitopenia e leucopenia, especialmente, granulocitopenia, observada nos trabalhos do nosso laboratório, o que corrobora com a prévia suposição de uma possível alteração na capacidade de proliferação e de maturação da célula progenitora.

Esses eventos foram observados tanto para células totais de medula óssea quanto para células tronco hematopoiéticas murina, Sca-1⁺, ou células comprometidas mais jovens como CD34⁺ e CD117⁺, ou progenitores de linhagens T, CD5⁺, e granulocítica, Gr-1⁺. Tais eventos não foram presenciados, não apresentaram diferença significativa ao grupo controle, quando analisadas as populações de células de medula óssea positivas para linhagem B, B220⁺, que condiz com os achados de Osati-Ashtiani *et al.*, 1998, de redução na população linfóide B em toda sua escala maturativa; e positivas para linhagem eritróide, Ter-119⁺, condizente com os resultados de Wickramasighe *et al.*, 1988, que não presenciou anormalidades estruturais nas células eritróides, assim como a distribuição no ciclo celular das células desta série, em seus vários estágios maturativos, apresentou-se normal. Estes resultados sugerem que o comprometimento da eritropoese é devido, primariamente, às anormalidades dos progenitores eritróides do que à diseritropoese e eritropoese ineficaz (WICKRAMASIGHE *et al.*, 1988) ou seja, com redução do número de unidades formadoras de colônias eritróides (CFU-E) e unidades formadoras intensas de colônias eritróide (BFU-E) (FRIED *et al.*, 1978; POLOLI-ANAGNOSTOU *et al.*, 1981).

O perfil do ciclo celular de cada população celular corresponde ao estágio funcional delas: as células tronco mais primitivas estão em estado quiescente (em G0 do ciclo), a maioria das células tronco que estão se auto-renovando estão em G1 e ciclam lentamente, já os progenitores comissionados estão ativamente no ciclo celular em efetiva expansão (FURUKAWA, 1998).

Alguns componentes críticos na regulação do ciclo celular durante a diferenciação celular hematopoiética tem sido relatados, como a inibição da fosforilação da proteína Rb e da atividade do fator de transcrição E2F, provavelmente através dos efeitos de fatores inibidores de crescimento como TGF- β (*transforming growth factor-beta*) e os interferons. A atuação de fatores estimuladores de colônias, que podem inibir a repressão de CdKs, está associada com a expansão de progenitores hematopoéticos. Supressão da fosforilação de Rb e da atividade de E2F é mais uma vez acompanhada de diferenciação terminal. Entre as células hematopoiéticas, os megacariócitos são conhecidos de apresentarem um distinto modelo de ciclo celular, normalmente chamado endomitose, e torna-se hiperdiploide. Indução de inibidor de CdKs, p21, e a presença de um fator específico megacariocítico são propostos para explicar este mecanismo de poliploidização (FURUKAWA, 1997).

Iwase *et al.*, 1997, sugeriu que a ação antiproliferativa de INF- α (interferon- α) é modulando a atividade do fator de transcrição E2F através de dois diferentes caminhos: suprimindo a atuação transcricional de E2F livre e induzindo o complexo repressor transcricional E2F-Rb.

O PCNA é expresso no final da fase G1 do ciclo celular, atingindo na fase S sua concentração máxima (BRAVO *et al.*, 1987), sendo que sua expressão tem sido relacionada ao processo de divisão celular e/ou processo de reparo do DNA (HATTONI *et al.*, 1995). Células hemopoéticas da medula óssea de animais desnutridos apresentam expressão de PCNA e de AgNor significativamente menores em relação aos controles (BLATT *et al.*, 2004).

A menor expressão de PCNA observada em trabalhos do nosso laboratório e a constatação de uma maior população de células de capacidade proliferativa em estado de repouso em animais submetidos à desnutrição protéico-energética, mostram a existência de uma incapacidade de entrar em fases proliferativas do ciclo celular mesmo diante de uma pancitopenia periférica.

Após 10 dias da administração do quimioterápico 5-Fluoracil, que leva as células ao estado de repouso (POSPÍSIL *et al.*, 2004; LARSSON *et al.*, 2005), os animais do grupo controle apresentaram parâmetros hematológicos iguais à antes do efeito do fármaco, exceto pela leucocitose com granulocitose e pela reticulocitose acentuada, apesar da ausência anemia, o que evidencia um acentuado retorno ao ciclo celular das células do setor mielóide da medula óssea após o efeito do quimioterápico, diferentemente do observado nos animais do grupo desnutrido que apresentaram somente granulocitose relativa, e não absoluta, assim como ausência de reticulocitose, mesmo na presença anemia, caracterizando-se demora ou até incapacidade dos progenitores de medula óssea de camundongos desnutridos de retornar ao ciclo celular.

O grupo controle, após o 15º dia da administração do quimioterápico, manteve a leucocitose com granulocitose, embora menos intensa que ao 10º, e apresentou linfocitose acentuada. A reticulocitose também foi mantida, entretanto de menor intensidade que no protocolo anterior, o que caracteriza que após o efeito do 5-Fluoracil a hemopoese se restabelece por volta do 15º dia da administração do fármaco no grupo controle.

Os animais do grupo desnutrido, com 15 dias, apresentaram leucocitose acentuada com linfocitose predominante e redução nos valores de número de hemácia, hemoglobina e hematócrito, assim como notável reticulocitose e alterações na morfologia eritrocitária, como presença moderada de corpúsculos de Howell-Jolly e poiquilocitose com esquizócitos, também predominaram neste grupo, o que evidencia dificuldade do setor eritróide medular de restabelecer a eritropoese, ainda mais frente a uma anemia já estabelecida antes da administração do 5-Fluoracil.

Ao final do 10º dia da administração do 5-Fluoracil constatou-se que a medula óssea tanto dos animais do grupo controle quanto do desnutrido apresentaram redução da celularidade, sendo restabelecidas, estatisticamente, após o 15º dia. Entretanto no grupo controle observou-se no mielograma predomínio da série granulocítica, apesar de sua redução acentuada, e aumento de linhagem eritróide, diferentemente do que ocorreu após 15 dias da administração da droga, que apresentou redução de granulócitos maduros e aumento de células jovens desta mesma linhagem, assim como aumento acentuado dos setores linfóide e eritróide.

Esses dados explicam a redução de granulócitos no sangue periférico e aumento de linfócitos após 15 dias nos animais do grupo controle, ao contrário do que se observava com 10 dias, que correspondia à leucocitose com granulocitose e linfopenia. Entretanto, a reticulocitose esteve presente em ambos os períodos de análise neste grupo, principalmente após 10 dias.

Já no grupo desnutrido o predomínio celular na medula óssea foi das séries eritróide e granulocítica com 10 dias, mesmo o setor granulóide tendo sofrido uma redução considerável. E após 15 dias, a redução da série granulocítica foi mais acentuada, com notável diminuição de células maduras desta linhagem, além de reconstituição numérica da celularidade linfocítica, proporcionando assim predomínio na medula óssea de animais do grupo desnutrido das linhagens linfóide e eritróide.

Assim como observado no grupo controle, o sangue periférico refletiu os eventos observados na medula óssea dos animais do grupo desnutrido, que no 10º dia apresentava granulocitose e linfopenia, entretanto sem leucocitose, e aumento de reticulócitos, embora sem reticulocitose. Reticulocitose esta que foi evidenciada com 15 dias da administração do fármaco, mesmo que não proporcional à resposta esperada frente à anemia presente, assim como leucocitose com linfocitose acentuada e granulopenia.

A redução linfocítica observada tanto no sangue periférico quanto na medula óssea em ambos os grupos pode ser explicada pelo aumento acentuado desta linhagem no baço, crescendo na ordem de três vezes no grupo controle e cinco vezes no desnutrido, ou pela mobilização desta linhagem de outros setores para o baço. Diferentemente do observado após 15 dias da administração do 5-Fluoracil, que praticamente restabeleceu a celularidade linfocítica na medula óssea e no baço, assim como uma linfocitose acentuada a nível periférico.

Após o efeito do 5-Fluoracil, que leva as células ao estado de repouso, as células de capacidade proliferativa retornam ao ciclo celular, diferentemente da proporção de células observada antes da ação do quimioterápico (POSPÍSIL *et al.*, 2004; LARSSON *et al.*, 2005). No grupo controle, após 10 dias da administração do 5-Fluoracil, houve um aumento, com significância estatística, de células na fase G0 do ciclo celular e manutenção da proporção de células na fase proliferativa do ciclo celular, S/G2/M. Já no grupo desnutrido evidenciou-se manutenção da proporção de células na fase G0, assim como aumento do número de células, sem diferença estatística, nas fases S/G2/M com diminuição destas na fase G1.

Estes dados revelam que após 10 dias da administração de 5-Fluoracil, o número de células na fase G0 do ciclo celular tanto no grupo controle quanto no grupo desnutrido continua aumentado, entretanto com diferenças nas demais fases, demonstrando assim que ainda há efeito do quimioterápico. Porém, a mesma proporção de células observada nos animais do grupo desnutrido antes e depois da administração do fármaco pode significar que independentemente deste efeito, estes animais mantêm um predomínio de células em estado de repouso do ciclo celular.

Ao final do 15º dia da administração do fármaco a medula óssea dos animais do grupo controle apresentou considerável redução significativa da população de células em G0 e G1, com aumento de células em S/G2/M, demonstrando que as populações de células que não entraram em estado de repouso continuaram seguindo para as fases proliferativas do ciclo celular, e que aquelas populações de células que se encontravam em G0, começaram a

entrar no ciclo celular. Diferentemente do que ocorreu no grupo desnutrido, que manteve as populações de células em estado de repouso como ao 10º dia da administração da droga, assim como redução de células na fase G1 do ciclo celular e aumento destas em S/G2/M, o que evidencia a incapacidade das células de medula óssea dos animais do grupo desnutrido de voltar ao ciclo celular após o efeito do quimioterápico 5-Fluoracil, diferentemente das células que não entraram em estado de repouso, que aumentaram a proporção de células nas fases proliferativas.

Em indivíduos saudáveis, a concentração de células sangüíneas permanece relativamente constante, pois as células senescentes são removidas e constantemente substituídas por células recém-formadas de forma que, nestes indivíduos, cerca de um trilhão de células são produzidas diariamente (NARDI; ALFONSO, 1999).

Essas observações nos levam a supor que há uma incapacidade de determinadas células de medula óssea de animais submetidos à desnutrição em voltar ao ciclo celular mesmo frente a um estímulo como o final do efeito do antimetabólico da síntese da base nitrogenada uracila.

8. Conclusão

- Animais sob desnutrição protéica apresentam anemia normocítica-normocrômica, reticulocitopenia, leucopenia, hipoplasia medular com redução acentuada da série granulocítica, e hipoplasia esplênica com a predominância das linhagens eritrocítica e linfocítica;
- Células totais, células CD34⁺, células Sca-1⁺, células Gr-1⁺, células B220⁺ e células CD117⁺ de medula óssea de animais em desnutrição protéica estão em sua maioria nas fases G0 e G1 do ciclo celular;
- Células CD5⁺ e células Ter-119⁺ de medula óssea de animais mesmo sob desnutrição mantêm-se distribuído normalmente nas diferentes fases do ciclo celular;
- Após 10 dias da administração do quimioterápico 5-Fluoracil os animais dos grupos controle e desnutrido apresentam as seguintes alterações em relação à antes da administração do fármaco:
 - o efeito da droga em células hematopoiética em animais sob desnutrição protéica em refletido em anemia acentuada com reticulopenia, e leucopenia com significativa linfopenia;
 - o efeito do fármaco é caracterizado pela acentuada redução da celularidade da medula óssea em ambos os grupos experimentais,

embora com exacerbado aumento da celularidade do baço, com predominância da linhagem linfocítica nos dois grupos;

- as séries granulocítica e linfóide de medula óssea de animais controle e em desnutrição apresentam maior suscetibilidade ao efeito do 5-Fluoracil;
 - animais sob desnutrição apresentam a mesma proporção de células em repouso que após 10 dias da administração de 5-Fluoracil;
 - já com relação à fase G1, animais sob desnutrição com o quimioterápico apresentam a menor população de células totais nesta fase do ciclo;
- Após 15 dias da administração do 5-Fluoracil foram observadas as seguintes alterações em relação a antes e ao 10º dia da administração do fármaco:
- animais sob desnutrição protéico apresentam incapacidade de resposta eritropoética, entretanto com leucocitose com linfocitose, diferentemente do ocorrido ao 10º dia;
 - a celularidade da medula óssea em ambos os grupos retorna aos níveis observados a antes da administração, assim como a celularidade do baço é reduzida, se aproximando de antes da

administração, demonstrando fim da resposta das células hematopoética ao efeito do quimioterápico;

- o mielograma demonstrou que o 5-Fluoracil promove acentuada redução da série granulocítica em ambos os grupos, havendo predomínio linfóide e eritróide;
- células hematopoiéticas de animais sob desnutrição mantêm-se fora do ciclo celular;
- populações de células de medula óssea de animais em desnutrição que não entraram em estado de repouso do ciclo celular, conseguem prosseguir no ciclo, diferentemente daquelas que entram em G0 e não conseguem retornar ao ciclo mesmo com o estímulo que é o final do efeito do 5-Fluoracil;

9. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Celular and molecular immnology. 2ed., Sauders, p.239-60, 2000.

ABBOUD, C. N.; LICHTMAN, M. A. Struture of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: Williams Hematology. *McGraw Hill*. 6th ed., p.29-43, 2001.

AGAMI, R.; BERNARDS, R. Convergence of mitogenic and DNA damage signaling in the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Letter*. 177:111-118, 2002.

AKNER. G.; CEDERHOLM, T. Treatment of protein-energy malnutrition in chronic nonmalignant disorders. *Am. J. Clin. Nutr.* v.74, p.6-24, 2001.

ALEMNJI, G. A.; THOMAS, K. D.; DUROSINMI, M. A.; TAIWO, O.; FAKUNLE, J. B. Haematogram and serum iron status of malnourished Nigerian children. *East Afr Med J*. 1995 Sep;72(9):605-8.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, J.; ROBERTS, K.; WATSON, J. D. *Molecular Biology of the Cell*. New York, NY, 1997.

ALAHARI, S. K.; REDDIG, P. J.; JULIANO RL. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int Rev Cytol*. 2002;220:145-84.

ARAI, K.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.; ARAI, N.; YOKOTA, T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annual Review of Biochemistry*. v.59, p.783-836, 1990.

ASCHKENASY, A. Dietary proteins and amino acids in leucopoiesis: recent hematological and immunological data. *World Rev Nutr Diet*. 1975;21:151-97. Review.

ASSOIAN, R. K.; SCHWARTZ, M. A. Coordinate signaling by integrins and receptors tyrosine kinase in the regulation of G1 phase cell cycle progression. *Oncogenes and cell proliferation*. V. 11, p.48-53, 2001.

AUGER, M. J.; ROSS, J. A. The biology of the macrophage. In: The macrophage, by LEWIS, C. E.; McGREE, J. O. D., cap 1, p.1-57, 1992.

AUGUSTO, A. P. Avaliação nutricional. In: ALVES, D. C.; MANNARINO, I. C.; GERUDE, M. Terapia nutricional. São Paulo, Atheneu. p.2834, 1995.

BARON, R. B. Desnutrição protéico-energética. In: BENNET, J. C. & PLUM, F. C. Tratado de medicina interna. 20ed, Guanabara-Koogan, v.1, p.1273-7, 1997.

BELL, R. G.; HAZELL, L. A.; SHERIDAN, J. W. The influence of dietary protein deficiency on haemopoietic cells in the mouse. *Cell Tissue Kinet.* 1976 Jul;9(4): 305-11.

BENDER, J. G.; UNVERZAGT, K. L.; MAPLES, P. B.; MEHROTRA, Y.; MELLON, J.; van EPPS, D. E.; STEWART, C. C. Functional characterization of mouse granulocytes and macrophages produces in vitro from bone marrow progenitors stimulated with interleukin 3 (IL-3) or granulocytes-macrophages colony-stimulating factor (GM-CSF). *Epx. Hematol.*, New York, v.20, p. 1135-1140, 1992.

BERARDI, A. C.; WANG, A.; LEVINE, J. D. Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. *Science* 1995;267:104-108.

BERKOWITZ, F. E. Infections in children with severe protein-energy malnutrition. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Baltimore, v.11, p.750-9, 1992.

BENTACOURT, M.; ORTIZ, R.; GONZALEZ, C. Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. *Mutat Res.* 1992 Nov;283(3):173-7.

BEUTLER, E.; LICHTMAN, M. A.; COLLIER, B. S.; KIPPS, T. J.; SELIGSOHN, U. Williams Hematology. *McGraw Hill*. 6th ed., 1941p., 2001.

BLAIN, S. W.; MONTALVO, E.; MASSAUGLE, J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p27^{Kip1} with cyclinA-CDK2 and cyclinD2-CDK4. *J. Biol. Chem.* v.25863-25872, 1997.

BLATT, S. L. efeito da desnutrição protéica experimental na hemopoese medular. São Paulo. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. São Paulo, 215p, 2004.

BOONSTRA, J. Progression through the G1 phase of the On-going cell cycle. *J. Cell. Biochem.* v.90, p.244-252, 2003.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions mice. *Nutrition Research.* v.15, p.1477-85, 1995.

BORELLI, P.; SOUZA, I. P.; BROJEVIC, R.. DAGLI, M. L. Z.; KANG, H. C. Protein malnutrition: Some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. *Ann. Nutr. Metab.* v.42, p.367-73, 1998.

BORELLI, P.; NARDINELLI, L. Protein-calorie malnutrition a decreased in the macrophages respiratory burst capacity. *Rev. Cienc. Farm.* São Paulo, v.37, p. 51-60, 2001.

BORELLI, P.; FOCK, R. A.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; BEUTLER, B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G. Effect of protein deprivation on erythropoiesis. *British Journal Nutrition*, no prelo, 2006.

BORSATO, E. M. Desnutrição protéica: avaliação in vitro da capacidade proliferativa de progenitores grânulo-monocíticos da medula óssea de camundongos. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo. São Paulo, 84p, 1999.

BORSATO, E. & BORELLI, P. Effects of protein deficiency on proliferation and maturation of granulocyte-macrophage precursor cells. *Nutr.Res.*, New York, 1999.

BRACH, M. A.; HERRMANN, F. Hematopoietic growth factors: interactions and regulation of production. *Acta Haematol.* v.86, p.128-37, 1991.

BRAVO, R.; FRANK, R. BLUNDELL, P. A.; MACDONALD-BRAVO, H. Cyclin/PCNA is the auxiliar protein of DNA polymerase- δ . *Nature*. 1987;326:515-517.

BRUNDTLAND, G. H. Nutrition and infection: malnutriton and mortality in public health. *Nutr. Ver.* v.58, p.51-54, 2000.

BURGESS, A. W.; METCALF, D. The nature and action of granulocytes-macrophage colony stimulating factors. *Blood*, Orlando, v.56, p.947-958, 1980.

CEN, D.; LAVIN, J. Cell cycle status of murine megakaryocyte and granulocyte-macrophage colony-forming cells in bone marrow and spleen. *Exp Hematol*. 1992 Oct;20(9):1094-100.

CERECEDA, FC et al. Detection of malnutrition on admission to hospital. *Nutr Hosp*, v.18, n. 2, p. 95-100, 2003.

CHANDRA, R. K. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am. J. Clin. Nutri.*, Bethesda, v.53, p.1087-101, 1991.

CHENG, H. C.; GUAN, J. L. Association of localadhesion kinase with itspotential substrate phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. v.91, p. 10148-10152, 1994.

CHENG, M.; OLIVER, P.; DIEHL, J. A.; FERRO, M.; ROSSUEL, M. F.; ROBERTS, J. M.; SHERR, C. J. The p21 (Cip1) and p27 (Kip1) CDK inhibitors are essential activators of cyclinD-dependet Kinases in murine fibroblasts. *EMBO J.* v.18, p.1571-1583, 1999.

COFFMAN, R. L. 1982. Surface antigen expression and immunoglobulin gene rearrangement during mouse pre-B cell development. *Immunol. Rev.* 69: 5 - 23.

COOPER, M. P.; BALAJEE, A. S.; VILHELM, A. B, The C-terminal domain of p21 inhibits nucleotide excision repair in vitro and in vivo. *Mol. Biol. Cell.* 10:2119-2129, 1999.

COQUERET, O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene.* v.299, p.35-55, 2002.

CORTES, E.; GONZALEZ, C.; BENTACOURT, M.; ORTIZ, R. Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow, and peripheral blood from malnourished rats by single cell gel electrophoresis assay. *Teratog Carcinog Mutagen.* 2001;21(3):231-47.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Environmental and Nutrition Disease. In: *Pathologic Basis of the Disease.* 6ed., W. B. Saunders, p.403-57, 2000.L

DANEN, E. H. J.; YAMADA, K. M. Fibronectin, Integrins and Growth Control. *J. Cell. Physiol.* v.189, p.1-13, 2001.

DARZYNKIEWICZ, Z.; GONG, J.; JUAN, G; ARDELT, B; TRAGANOS, F. Cytometry of cyclin proteins. *Cytometry.* v.25(1), p. 1-13, 1996.

DE ANGELIS, R. C. Desnutrição calórico-protéica (Má nutrição calórico-protéica). In: *Fisiologia da nutrição.* 3ed. São Paulo, Nobel, 2v. p.38-56, 1986. *Mol. Cell Biol.* 15:4215-4224, 1995.

DeGRAGORI, J.; KEWALIK, T.; NEVINS, J. R. DE ONIS, M. MONTEIRO, C.; AKRÉ, D.; CLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the database on child growth. *Bull. Of the World Health Organ.*, v.71 (6):703-12, 1993.

DEITCH, E. A.; MA, W. J.; BERG, R. D.; SPECIAND, R. D. Protein malnutrition predisposes to inflammatory induced gut-origin septic states. *Ann. Surg.*, v. 211, p.560-7, 1990.

DELLA RAGIONE, F.; BORRIELLO, A.; MASTROPIETRO, S.; DELLA PIETRA, V.; MONNO, F.; GABUTTI, V.; LOCATELLI, F.; BONSI, L.; BAGNARA, G. P.; IOLASCON, A. Expression of G1-phase cell cycle genes during hematopoietic lineage. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Feb 3;231(1):73-6.

DU, F.; HIGGINBOTHAM, A.; WHITE, B. D. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.* 130:514-521, 2000.

DUNKI, J. P. B.; RUEVEKAMP, M.; HART, G. A.; DE GRAAF, P. W. Dietary influences on cell proliferation in bone marrow. *Eur J Cancer Clin Oncol*. 1989 Jun;25(6):953-7.

DYSON, N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev*. 1998 Aug 1;12(15):2245-62.

EGELKROUT, E. M.; MARICONTI, L.; SETTLAGE, S. B.; CELLA, R.; ROBERTSON, D.; HANLEY-BOWDON, L. Two E2F Elements Regulate the Proliferating Cell Nuclear Antigen Promoter Differently During Leaf Development. *The plant cell*. v.14, p.3225-3236, 2002.

EIGHAZALI, S.; MIKHALI, M.; AWADALLAH, M. SHATLA, H. Significant increase of chromosomal damage in protein energy malnutrition. *J Trop Med Hyg*. 1990 Dec;93(6):372-6.

EVANS, C. J.; CASHMAN, J. D.; SUTHERLAND, H. J.; OTSUKA, T.; HUNPHIRIES, R. K.; HOGGE, D. E.; LANDSDROP, P. L.; EAVES, A. C. Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v.628, p.298-306, 1991.

FOCK, R. A.; SILVA, O. P. P. S.; BORELLI, P. Desnutrição protéica modifica a síntese de óxido nítrico em macrófagos. *Rev. Bras. Ciên. Farm.* v.39, supl. 3, p. 115, 2003.

FONGWO, N. P.; ARINOLA, O. G.; SALIMONU, L. S. Leucocyte migration inhibition factor (L-MIF) in malnourished Nigerian children. *Afr J Med Med Sci*. 1999 Mar-Jun;28(1-2):17-20.

FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. www.fao.org, december, 2006.

FINCH, C. A. Erythropoiesis in protein-calorie malnutrition. In: OLSON, R. E., ed. Protein-calorie malnutrition. New York: Academic Press, 1975. p.247-256. (The Nutrition Foundation monograph series) (Papers presented at a symposium sponsored by the Faculties of Medicine of Chiang Mai and St. Louis Universities and the International Union of Nutrition Science and held Jan. 8-11, 1973 in Chiang Mai).

FLEMING, T. J.; FLEMING, M. L.; MALEK, T. R. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *The Journal of Immunology*. **1993 Sep 1;151(5):2399-408.**

FLEMINGTON, E. K.; SPECK, S. H.; KAELIN, W. G. Jr. E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Aug 1;90(15):6914-8.

FRIED, W.; GURNEY, C. W. Erythropoietic effect of plasma from mice receiving testosterone. *Nature*. 1965 Jun 12;206(989):1160-1. No abstract available.

FRIED, W.; BARONE, S. J.; ANAGNOSTOU, A. Effect of protein deprivation on hematopoietic stem cells and on peripheral blood counts. *J Lab Clin Med*. 1978 Aug;92(2):303-10.

FRIED, W. Hematologic complications of chronic renal failure. *Med Clin North Am*. 1978 Nov;62(6):1363-79.

FRISO, S; CHOI, S. W. Gene-nutrient interactions and DNA methylation. *J Nutr.* 2002 Aug;132(8 Suppl):2382S-2387S.

FURUKAWA, Y. Cell cycle control during hematopoietic cell differentiation. *Hum Cell.* 1997 Sep;10(3):159-64.

FURUKAWA, Y. Cell cycle regulation of hematopoietic stem cells. *Hum Cell.* 1998 Jun;11(2):81-92.

GADDUCCI, A.; COSIO, S.; FANUCCI, A.; GENAZZANI, A. R. Malnutrition and cachexia in ovarian cancer patients: pathophysiology and management. *Anticancer Res.* v.21, p.2941-7, 2001.

GARCIA, P. B. Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição proteica: análise da mobilidade celular e da hematopoese. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1992.

GAMELLI, R. L.; FOSTER, R. S. Effects of protein-calorie malnutrition and refeeding on fluorouracil toxicity. *Arch Surg.* 1983 Oct;118(10):1182-5.

GENG, Y.; EATON, E. N.; PICON, M.; ROBERTS, J. M.; LUNDBERG, A. S.; GIFFORD, A.; SARDET, C.; WEINBERG, R. A. Regulation of cyclin E transcription by E2Fs and retinoblastoma protein. *Oncogene.* 1996 Mar 21;12(6):1173-80.

GIET, O.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; DI STEFANO, I.; HUYGEN, S.; GREIMERS, R.; BEGUIN, Y.; GOTHOT, A. Increased binding and defective migration across fibronectin of cycling hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2002 Mar 15;99(6):2023-31.

GOOD, R. A.; LORENZ, E. Nutrition, immunity, aging and cancer. *Nutri. Rev.*, v. 46, p.62-7, 1988.

GOMEZ, J. L.; CAMPOS, C.; RANGEL, P.; ORTIZ, R. Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. *Mutat Res.* 1996 Jun 10;352(1-2):57-60.

GORNAL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.177, p. 751, 1949.

GREER, J.; FOERSTER, J.; LUKENS, J. N.; RODGERS, G. M.; PARASKEVAS, F.; GLADER, B. Wintrobe's Clinical hematology. 11th ed, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, vol.1, p.2710, 2004.

GROSS, R. L.; NEWBERNE, M. P. Role of nutrition in immunologic function. *Physiol. Rev.* v.60, p.188-302, 1980.

GUPTA, R.; GUPTA, M.; RAMDEO, I. N. Chromosomal abnormalities in protein-calorie malnutrition. *Am J Clin Nutr.* 1977 Dec;30(12):1974-8.

HANKS, S. K.; POLTE, T. R. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays.* 1997 Feb;19(2):137-45.

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. Chromatin remodeling and Rb activity. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Dec;12(6):685-9.

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 2000 Oct 1;14(19):2393-409.

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2000 Apr;2(4):E65-7.

HELIN, K.; HARLOW, E.; FATTAEY, A. Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol.* 1993 Oct;13(10): 6501-8.

HELIN, K.; ED, H. The retinoblastoma protein as a transcriptional repressor. *Trends Cell Biol.* 1993 Feb;3(2):43-6.

HELIN, K.; WU, C. L.; FATTAEY, A. R.; LEES, J. A.; DYNLACHT, B. D.; NGWU, C.; HARLOW, E. Heterodimerization of the transcription factors E2F-1 and DP-1 leads to cooperative trans-activation. *Genes Dev.* 1993 Oct;7(10):1850-61.

KEENAM, S. M.; LENTS, N. H.; BALDASSARE, J. J. Expression of cyclin E renders cyclin D-cdk4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppression protein, activation of E2F, and G1-phase progression. *The J. Biol. Chemistry.* 279(7):5387-5396, 2004.

HERESI GP, SAITUA MT, SCHLESINGER L. Leukocyte migration inhibition factor production in marasmic infants. *Am J Clin Nutr.* 1981 May;34(5):909-13.

HODGSON GS, BRADLEY TR. Properties of haematopoietic stem cells surviving 5-fluorouracil treatment: evidence for a pre-CFU-S cell? *Nature* 1979;281:381-382.

KLEIN, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia.* 1995 Sep 29;51(9-10):914-26.

HSIEH, T.; HALICKA, D.; LU, X.; KUNICKI, J.; GUO, J.; DARZYNKIEWICZ, Z; WU, J. M. Effects of resveratrol on the G0-G1 transition and cell cycle progression of mitogenically stimulated human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 297:1311-1317, 2002.

HULLEMAN, E.; BIJVELT, J. J.; VERKLEIJ, A. J.; VERRIPS, C. T.; BOONSTRA, J. Integrin signaling at the M/G1 transition induces expression of cyclin E. *Exp Cell Res.* 1999 Dec 15; 253(2):422-31.

HULLEMANN, E.; BOONSTRA, J. Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* v.58, p.80-93, 2001.

HULLEMANN, E.; van ROSSUN, G. S. A. T. Regulation of G1 phase progression by growth factors. In: BOONSTRA, J. G1 phaser progression. New York: *Laudes Biosciences*, Georgetown, Klumer Academic. p.97-113, 2003.

KERST, J. M.; SANDERS, J. B.; SLAPER-CORTENBACH, I. C.; DOORAKKERS, M. C.; HOOIBRINK, B.; VAN OERS, R. H.; VON DEM BORNE, A. E.; VAN DER SCHOOT, C. E. Alpha 4 beta 1 and alpha 5 beta 1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way. *Blood*. 1993 Jan 15;81(2):344-51.

KEUSCH, G. T. History of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J. Nutr.* v.133, p.3365-405, 2003.

KHOURI, F. P.; MacLAREN, D. S. Cytogenetic studies in protein-calorie malnutrition. *Am J Hum Genet*. 1973 Sep;25(5):465-70.

KINA, T.; IKUTA, K.; TAKAYAMA, E.; WADA, K.; MAJUMDAR, A. S.; WEISSMAN, I. L.; KATSURA, Y. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. 2000. *Br. J. Haematol*. 109: 280 – 287.

KING, L. E.; OSATI-ASHTIANI, F.; FRAKER, P. J. Depletion of cells of the B lineage in the bone marrow of zinc-deficient mice. *Immunology*. 1995 May; 85(1):69-73.

KING, L. E.; FRAKER, P. J. Variations in the cell cycle status of lymphopoietic and myelopoietic cells created by zinc deficiency. *J Infect Dis*. 2000 Sep;182 Suppl 1:S16-22.

KING, L. E.; FRAKER, P. J. Zinc deficiency in mice alters myelopoiesis and hematopoiesis. *J Nutr*. 2002 Nov;132(11):3301-7.

KING, L. E.; FRENTZEL, J. W.; MANN, J. J.; FRAKER, P. J. Chronic zinc deficiency in mice disrupted T cell lymphopoiesis and erythropoiesis while B cell lymphopoiesis and myelopoiesis were maintained. *J Am Coll Nutr.* 2005 Dec; 24(6):494-502.

KLASING, G. G. Nutritional Aspects of Leucocytic cytokines. *J. Nutrition.* v.118, p.1436-45, 1998.

KNOWLES, R. W. Immunochemical analysis of the T-cell-specific antigens. In: einherz EL, Haynes BF, Nadler LM, Bernstein ID, eds. *Leukocyte Typing II: Human T Lymphocytes.* New York, NY: Springer-Verlag; 1986;1:259-288.

KURIAN, J.; O'DONNELL, M. Sliding clamps of DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 234:915-925, 1993.

IWASE, S; FURUKAWA, Y.; KIKUCHI, J.; NAGAI, M.; TERUI, Y.; NAKAMURA, M.; YAMADA, H. Modulation of E2F activity is linked to interferon-induced growth suppression of hematopoietic cells. *J Biol Chem.* 1997 May 9;272(19): 12406-14.

ITO, M.; ANAN, K.; MISAWA, M.; KAI, S.; HARA, H. In vitro differentiation of murine Sca-1⁺, Lin⁻ cells into myeloid, B cell and T cell lineages. 1996. *Stem Cells* 14: 412 - 418.

ISHII, T.; FUJISHIRO, M.; MASUDA, M.; OKUDELA, K.; KITAMURA, H.; TERAMOTO, S.; MATSUSE, T. Nutritional deficiency affects cell cycle status and viability in A549 cells: role of p27Kip1. *Cancer Lett.* 2004 Sep 15;213(1): 99-109.

JACOB, D. P. B.; RUEVEKAMP, M.; HART, G. A.; DE GRAAF, P. W. Dietary influences on cell proliferation in bone marrow. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1989 Jun;25(6):953-7.

JARRIGE, A.; MARINOF, C.; MORON, P. Hematopoietic changes in states of severe malnutrition in anorexia nervosa. *Encephale.* 1984;10(5):211-4.

JULIANO, R. Movin' on through with Cdc2. *Nat Cell Biol.* 2003 Jul;5(7):589-90.

LaBAER, J.; GARRETT, M. D.; STEVESON, L. F.; SLINGERLAND, J. M.; SANDHU, C.; CHOU, H. S.; FATTAEY, A.; HARLOW, E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* v.11, p.847-862, 1997.

LANZA, F.; CAMPIONI, D.; MORETTI, S.; DOMINICI, M.; PUNTURIERI, M.; FOCARILE, E.; PAULI, S.; DABUSTI, M.; TIEGHI, A.; BACILIERI, M.; SCAPOLI, C.; DE ANGELI, C.; GALLUCCIO, L.; CASTOLDI, G. CD34(+) cell subsets and long-term culture colony-forming cells evaluated on both autologous and normal bone marrow stroma predict long-term hematopoietic engraftment in patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Exp Hematol.* 2001 Dec;29(12):1484-93.

LARSSON, J.; BLANK, U.; KLINTMAN, J.; MAGNUSSON, M.; KARLSSON, S. Quiescence of hematopoietic stem cells and maintenance of the stem cells pool is not dependent on TGF- β signaling *in vivo*. *Exp. Hematol.* 33 (2005) 592-596.

LE CAM, L.; POLANOWSKA, J.; FABBRIZIO, E.; OLIVIER, M.; PHILIPS, A. N. G.; EATON, E.; CLASSON, M.; GENG, Y.; SARDET, C. Timing of cyclin E gene expression depends on the regulated association of a bipartite repressor element with a novel E2F complex. *EMBO J.* 1999 Apr 1;18(7):1878-90.

LEE, G. R.; HERBERT, V. Nutritional factors in the production and function of erythrocytes. In: LEE, G. R. Witrobe's clinical hematology. 10ed, Williams & Wilkins, v.1, p.228-602, 1989.

LERMER, C.; HARRISON D., E. 5-fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Exp Hematol* 1990;18:114-118.

LEWIN, B. *Genes VII. Artmed.* 1th ed, 2000, p.956

LICHTMAN, M. A.; WILLIAMS, J. W.; Hematology in the Aged. In: Williams Hematology. *McGraw Hill.* 6th ed., p.93-100, 2001.

LIPSCHITZ, D. A.; MITCHELL, C. O. The correctability of the nutritional, immune, and hematopoietic manifestations of protein calorie malnutrition in the elderly. *J Am Coll Nutr.* 1982;1(1):17-25.

LYRA, J. S.; MADI, K.; MAEDE, C. T.; SAVINO, W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J Pathol.* 1993 Nov;171(3):231-6.

JACOB, D. P. B.; RUEVEKAMP, M.; HART, G. A.; DE GRAAF, P. W. Dietary influences on cell proliferation in bone marrow. *Eur J Cancer Clin Oncol.* 1989 Jun;25(6):953-7.

JULIANO, R. Movin' on through with Cdc2. *Nat Cell Biol.* 2003 Jul;5(7):589-90.

MAJDIC, O.; STOCKL, J.; PICKL, W. F.; BOHUSLAV, J.; STROBL, H.; SCHEINECKER, C.; STOCKINGER, H.; KNAPP, W. Signaling and induction of enhanced cytoadhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34. *Blood.* 1994 Mar 1;83(5):1226-34.

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. *Eur. J. Clin. Nutri.* v.54, p.561-4, 2000.

MARTINS, G. L., *et al.*, Padrões hematológicos em grupos de população da zona da mata de Pernambuco. *Ver. Bras. Pesq. Med. Biol.* v. 4, n.4, 1971.

MATSUSHIME, H.; EWEN, M. E.; STROM, D. K.; KATO, J. Y.; HANKS, S. K., ROUSSEL, M. F.; SHERR, C. J. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. *Cell.* 1992 Oct 16;71(2):323-34.

MAYANI, H.; GUILBERT, L. J.; JANOWSA-WIECZOREK, A. Biology of the hematopoietic microenvironment. *European J. Hematology.* v.49, p.225-33, 1992.

MAZUR, E. M.; COHEN, J. L. Basic concepts of hematopoiesis and the hematopoietic growth factors. *Clin Pharmacol Ther.* 1989 Sep;46(3):250-6.

METCALF, D. The hematopoietic regulators na embarrassment of riches. *Bioessays*. v.14, p.799-805, 1992.

METCALF, D. The 1993 Burnet Lecture. The colony stimulating factors-discovery t clinical use. *Austrlas Biotechnol*. v.4, p.337-40, 1994.

MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1997;13:261-91.

MORRISON, S., J.; WEISSMAN, I., L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994;1:661-673.

MORRISON, S. J.; WANDYCZ, A. M.; HEMMATI, H. D.; WRIGHT, D. E.; WEISSMAN, I. L. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development*. 1997 May;124(10):1929-39.

MUNÕZ, E.; MARCOS, A.; UNGANZA, M. T. Effect of protein deficiency on the lysosomal enzyme activities of the spleen and thymus of weanling rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.111, p.2133-2144, 1981.

MURAOKA, R. S.; LENFERINK, A. E.; LAW, B.; HAMILTON, E.; BRANTLEY, D. M.; ROEBUCK, L. R.; ARTEAGA, C. L. ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells. *Mol Cell Biol*. 2002, Apr;22(7): 2204-19.

NARDI, NB; ALFONSO, ZC. The hematopoietic stroma. *Braz J Med Biol Res*, v. 32, n. 5, p. 601-609, 1999.

NEVINS, J. R. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr; 10(7):699-703.

NEW YORK TIMES. Malnutrition Is Cheating Its Survivors, and Africa's Future. article in the New York Times by Michael Wines, December 28, 2006.

NICOLA, N. A. Guidebook to cytokines and theirs receptors. *Cytokines and theirs receptors*. Oxford: Oxford University Press, 1994. New York. 261p.

NIELSEN, S. J.; SCHNEIDER, R.; BAUER, U. M.; BANNISTER, A. J.; MORRISON, A.; O'CARROLL, D.; FIRESTEIN, R.; CLEARY, M.; JENUWEIN, T.; HERRERA, R. E.; KOUZARIDES, T. Rb targets histone H3 methylation and HP1 to promoters. *Nature*. 2001 Aug 2;412(6846):561-5.

NILSSON, S. K.; JOHNSTON, J. M.; COVERDALE, J. A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*. 2001 Apr 15;97(8):2293-9.

NOVA, E.; SAMARTÍN, S.; GÓMEZ, MORANDÉ, G.; MARCOS, A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. *Eur. J. Clin. Nutr.* v.56, p.534-7, 2002.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. v.84, p.2844-53, 1993.

OHTAMI, K.; DeGREGORI, J.; NEVINS, J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92:12146-12150, 1995.

OLIVEIRA, R. A. G.; POLI NETO, A. Anemias e Leucemias. 1ed. *Roca*, p.4-6, 2004.

OLMOS, S.; REINOSO, M. F.; MARQUEZ, M. G.; ROUX, M. E. Cytogenetic studies in bone marrow cells from Wistar rats in protein malnutrition. *Metabolism*. 2001 Sep;50(9):1025-9.

OPAS, M. Substratum mechanics and cell differentiation. *Int. Rev. Cytol.* v.150, p.119-37, 1994.

ORTEGA, S.; MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Mar 14;1602(1):73-87.

ORTIZ, R.; BENTACOURT, M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *J Nutr*. 1984 Mar;114(3):472-6.

ORTIZ, R.; BENTACOURT, M. Length of cell cycle in vitro and sister-chromatid exchange (SCE) frequency in bone marrow cells from severely malnourished rats. *Mutat Res*. 1990 Sep;232(1):71-5.

ORTIZ, R.; CORTES, L.; GONZALEZ-MARQUEZ, H.; GOMEZ, J. L.; GONZALEZ, C.; CORTES, E. Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. *Br J Nutr*. 2001 Nov;86(5):545-8.

OSATI-ASHTIANI, F.; KING, L. E.; FRAKER, P. J. Variance in the resistance of murine early bone marrow B cells to a deficiency in zinc. *Immunology*. 1998 May;94(1):94-100.

PAIVA, R. P. Estudo de proteínas plasmáticas de macrófagos peritoneal de camundongos submetidos à desnutrição protéica. São Paulo. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 76p., 2001.

PAPADIMITRIOU, J. M.; VAN BRUGGEN, I. The effects of malnutrition on murine peritoneal macrophages. *Exp. Mol. Pathology*, v.49, p.161-70, 1998.

POLOLI-ANAGNOSTOU, L.; SCHADE, S.; ANAGNOSTOU, A. The effect of protein deprivation on erythroid stem cell growth. *Int J Vitam Nutr Res*. 1981;51(1):59-63.

POSPÍSIL, M.; HOFER, A.; VACEK, A.; ZNOJIL, V.; PIPALOVA, I. Effects of stable adenosine receptor agonists on bone marrow hematopoietic cells as

inferred from the cytotoxic action of 5-fluorouracil. *Physiol. Res.* 53: 549-556, 2004.

QUESENBERRY, P. J. Hemopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: BEUTLER, E.; LICHTMSN, M. A.; COLLIER, B. S.; KIPPS, T. J. Williams hematology. 5ed., McGraw Hill, v.22, p.211-28, 1995.

RAMDATH, D. D.; GOLDEN, M. H. N. Non-hematological aspects of iron nutrition. *Nutr. Res. Rev.*; Basel, v.2, p.29-50, 1989.

RANDAL, T., D.; WEISSMAN, I., L. Characterization of a Population of Cells in the Bone Marrow that Phenotypically Mimics Hematopoietic Stem Cells: Resting Stem Cells or Mystery Population? 1998. *Stem Cells* 16;38-48.

RAYMAN, R. B.; ANTUNANO, M. J.; GARBER, M. A.; HASTINGS, J. D.; ILLIG, P. A.; JORDAN, J. L.; LANDRY, R. F.; MCMEEKIN, R. R.; NORTHRUP, S. E.; RUEHLE, C.; SAENGER, A.; SCHNEIDER, V. S. Medical guidelines for space passengers--II. *Aviat Space Environ Med.* 2002 Nov;73(11):1132-4.

REENSTRA, W. R.; ORLOW, D. L.; SVOBODA, K. K. ECM-stimulated signaling and actin reorganization in embryonic corneal epithelia are Rho dependent. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Oct;43(10):3181-9.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the Ain-76 Rodent Diet. *J. Nutr.*, Bethesda, v. 123, n.11, p.1939-1951, 1993.

REIF, S.; LU, R. B.; TANO, N.; TERRANOVA, V.; YUONG, C.; FISCHER, J.; PETTEL, J.; LENBENTHAL, B. Perinatal food restriction in rats reduces the content but not concentration of liver extracellular matrix proteins. *J Nutr.* 1993 May;123(5):811-6.

REYNOLDS, J. V.; REDMOND, H. P.; UENO, N.; STEIGMAN, C.; ZIEGLER, M. M.; DALY, J. M.; JOHNSON JR, R. B. Impairment of macrophage activation

and granuloma formation by protein deprivation in mice. *Cellular Immunology*, v. 139, p.493-504, 1992.

RIOS, M.; WILLIAMS, D. A. Systematic analysis of the ability of stromal cell lines derived from different murine adult tissues to support maintenance of hematopoietic stem cells in vitro. *J. Cell Physiol.* v.145, p.434-43, 1990.

ROBERTS, A. W.; METCALF, D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines. *Blood*. 1995 Aug 15;86(4):1600-5.

ROUSSEL, M. F. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene*. 1999 Sep 20;18(38):5311-

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan*. v.20, p.315-28, 1947.

ROSENDAAL, M.; HODGSON, G. S.; BRADLEY, T. R. Organization of haemopoietic stem cells: The generation-age hypothesis. 1979 *Cell Tissue Kinet* 12:17.

RUAS, M.; PETERS, G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Oct 14;1378(2):F115-77.

SCHAFER, K, A. The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol.* v. 35, p.461-478, 1998.

SHAPIRO, H.M. Flow cytometric estimation of DNA and RNA content in intact cells stained with Hoechst 33342 and pyronin Y, *Cytometry* 2 (1981) 143–150.

SHEAFF, R. J.; GROUDINE, M.; GORDON, M.; ROBERTS, J. M.; CLURMAN, B. E. Cyclin E-Cdk2 is a regulator of p27 Kip1. *Genes Dev* 1997, 11:1464-1478.

SHERR, C. J. Cancer cell cycle. *Science*. v. 274, p.1672-1677, 1996.

SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulation of G1 phase progression. *Gene Dev.* v. 13, p.1501-1512, 1999.

SHERR, C. J.; McCORMICK, F. The Rb and p53 pathway in cancer: Review. *Cancer Cell.* v.2, p.103-111, 2002.

SCRIMSHAW, N. S. Nature of protein requirements. *J. Am. Assoc.* v.54, p. 94-102, 1969.

SILVA, O. P. P. Influência da carência protéica na resposta hematológica, na produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico e no sistema antioxidante enzimático de camundongos inoculados com BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). São Paulo. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 126p., 2000.

SMITH, R.; JAMES, W. P. T. Nutrição: base bioquímica, In: WEATHERALL, D. J.; LEDINGHAM, J. G. G.; WARREL, D. A. Oxford tratado de medicina interna. 2 ed. São Paulo: Roca, 1992. v.2, p.83-86.

SPIVAK, J. H.; FERRIS, D. K.; FISCHER, J.; NOGA, S. J.; ISAACS, M.; CONNOR, E.; HANKINS, W. D. Cell cycle-specific behavior of erythropoietin. *Exp. Hematol.* New York, v.24, p.141-150, 1996.

SPIVAK, J. H.; FISCHER, J.; NOGA, S. J.; ISAACS, M.; HANKINS, W. D. Protein kinases and phosphates are involved in erythropoietin mediated signal transduction. *Exp. Hematol.* New York, v.20, p.500-504, 1992.

SOOS, T. J.; KIYOKAMA, H.; YAN, J. S.; RUBIN, M. S.; GIORDANO, A.; DeBLASIO, A.; BOTTEGA, S.; WONG, B.; MENDELSON, J.; KOFF, A. Formation of p27-CDK complex during the human mitotic cell cycle. *Cell. Growth Differ.* v.7, p.135-146, 1996.

SOUZA, I. P. Desnutrição protéica: efeitos sobre a ativação, espalhamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais de camundongos.

São Paulo. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, 80p., 1995.

SOUZA, I. P.; KANG, H. C.; NARDELLI, L.; BORELLI, P. Desnutrição protéica: efeitos sobre a fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. *Bras. J. Pharm. Sci.*, São Pulo, v.37, p.143-151, 2001.

SUGAHARA, T.; SASAKI, T.; MURAKAMI, H. Enhancement of immunoglobulin productivity of human-human hybridoma HB4C5 cells by basic proteins and poly-basic amino acids. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1994 Dec;58(12):2212-4.

THACKER, S. A.; BONNETTE, P. C.; DURONIO, R. J. The Contribution of E2F-Regulated Transcription to *Drosophila* PCNA Gene Function. *Current Biology.* v.13, p.53-58, 2003.

TAVASSOLI, M.; MIGUELL, J. J. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991 Apr;196(4):367-73.

TESTA, N. G.; DEXTER, T. M. Haemopoietic growth fators and haematological malignancies . *Bailliers Clin. Endicrinol. Metab.* v.4, p.177-89, 1990.

TOBA, K.; WINTON, E.F.; KOIKE, T.; SHIBATA, A.; Simultaneous threecolor analysis of the surface phenotype and DNA–RNA quantitation using 7-amino-actinomycin D and pyronin Y, *J. Immunol. Methods* 182 (1995) 193–207.

TOMKINS, A. Malnutrition, morbidity and mortality in children and their mothers. *Proc. Nutr. Soc.* v.59, p.135-46, 2000.

TRAGANOS, F.; DARZYNKIEWICZ, Z.; SHARPLESS, T.; Melamed, M. Simultaneous staining of ribonucleic and deoxyribonucleic acid in unfixed cells using acridine laranja in flow cytofluorome system, *J. Histochem. Cytochem.* 25 (1977) 46–56.

TRETIN, J. J. Hemopoietic microenviroments. *Transplant. Proc.*, New York, v. 10, p.77-82, 1978.

TRIMARCHI, J. M.; LESS, J. A. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Jan;3(1):11-20.

UCHIDA, N.; FLEMING, W. H.; ALPERN, E. J.; WEISSMAN, I. L. Heterogeneity of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Immunol.* 1993 Apr;5(2):177-84.

UCHIDA N, WEISSMAN IL. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{lo} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med.* 1992 Jan 1;175(1):175-84.

VAN ZANT, G. Studies of hematopoietic stem cells spared by 5-fluorouracil. 1984 *J Exp Med* 159:679.

VERFAILLIE, C. M.; MCCARTHY, J. B.; McGLAVE, P. B. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin. *J Exp Med.* 1991 Sep 1;174(3):693-703.

VETVICKA, V.; KINCADE, P. W.; WITTE, P. L. Effects of 5-fluorouracil on B lymphocyte lineage cells. 1986 *J Immunol* 137:2405.

VICTORIA, J. W.; HERNANDEZ, V. Q. Efecto del estado nutricional de los pacientes sometidos a cirugía eletiva. *Ver. Gastroenterol.* V.55, p.207-10, 1990.

VISVANATHAN, R et al. The nutritional status of 250 older Australian recipients of domiciliary care sservices and its association with outcomes at 12 months. *J Am Geriatr Soc*, v.51, n. 7, p. 1007-1011, 2003.

VITURI, C. L.; BORELLI, P. ALVAREZ-SILVA, M.; TRETIN, A. Z.. Alteration of the bone marrow in extracelulkar matrixin mice undernourished. *Baz. J. Med. Biol. Res.* v.33, p.889-95, 2000.

VLACH, J.; HENNECKE, S.; AMATI, B. Phosphorylation-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. *EMBO J.* 1997 Sep 1;16(17):5334-44.

WAITZBERG, D. L.; PLOPPER, C.; TERRA, R. M. Postoperative total parenteral nutrition. *World J. Surg.* v.23, p.560-4, 1999.

WALKER, F.; NICOLAS, N. A.; METCALF, D.; BURGESS, A. W. Hierarchical down-modulation of hematopoietic growth factor receptors. *Cell.* v.43, p.269-76, 1995.

WATERLOW, R.; ALLYENE, G. A. O. Protein malnutrition in children: advances in Knowledge in last ten years. *Adv. Protein Chem.*, v.25, p. 117-241, 1996.

WATERLOW, R. Malnutrição proteico-energetica. Washigton: Organización Panamericana de la Salud., 501p. (publicação científica n.555), 1996,

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1973.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004.

WICKRAMASINGHE, S. N.; AKINYANJU, O. O.; GRANGE, A. Ultrastructure and cell cycle distribution of bone marrow cells in protein-energy malnutrition. *Clin Lab Haematol.* 1988;10(2):135-47.

WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. *J Nutr* 89:300-306, 1966.

XAVIER, J. G. Repercussões estruturais da desnutrição protéica e renutrição em tecidos linfohematopóiticos de camundongos. São Paulo, 254p. Tese de doutorado, 1999.

YEAGER, A. M.; LEVIN, J.; LEVIN, F. The effects of 5-fluorouracil on hematopoiesis: Studies of murine megakaryocyte-cfc, granulocyte-macrophage, and peripheral blood cell levels. 1983 Exp Hematol 11:944.

ZACKSENHAUS, E.; JIANG, Z.; CHUNG, D.; MARTH, J. D.; PHILLIPS, R. A.; GALLIE, B. L. pRb controls proliferation, differentiation, and death of skeletal muscle cells and other lineages during embryogenesis. Genes Dev. 1996 Dec 1;10(23):3051-64.

ZHANG, H. S.; DEAN, D. C. Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression. O