UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Participação do nicho endosteal na regulação da hemopoese de camundongos submetidos à desnutrição proteica

Maristela Tsujita

São Paulo
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Participação do nicho endosteal na regulação da hemopoese de camundongos submetidos à desnutrição proteica

Maristela Tsujita

Versão Original

Tese para obtenção do título de
DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra.
Primavera Borelli

São Paulo

2016

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Tsujita, Maristela
T882p Participação do nicho endosteal na regulação da hemopoese de camundongos submetidos à desnutrição proteica / Maristela Tsujita. -- São Paulo, 2016.
186p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Borelli, Primavera

1. Hematologia I. T. II. Borelli, Primavera, orientador.

616.15 CDD

Autorizo a divulgação e reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Maristela Tsujita

Participação do nicho endosteal na regulação da hemopoese de camundongos submetidos à desnutrição proteica

Comissão julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

_____
Profa. Dra. Primavera Borelli

_____
1º examinador

_____
2º examinador

_____
3º examinador

_____
4º examinador

São Paulo,_____de _____de 2016.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria José e Carlos (*in memorian*)
pelo amor e dedicação.

Ao meu marido Dominique pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu irmão Carlos pelo apoio e carinho.

À profa. Dra. Primavera Borelli,

orientadora deste trabalho, amiga, conselheira e
exemplo de profissionalismo.

Minha eterna admiração e agradecimento.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

Ao professor Ricardo Fock pelas discussões científicas, apoio e incentivo. Minha admiração e respeito pelo seu profissionalismo.

À Araceli Hastreiter pelo auxílio técnico indispensável, discussões científicas e amizade.

À Graziela Batista da Silva, pela parceria no laboratório, sempre disposta a ajudar. Obrigada pelas conversas e amizade.

À Jéssica Luana de Oliveira minha parceira durante a iniciação científica, sempre prestativa.

Obrigada ao Laboratório de Metabolismo Ósseo do ICB: profa. Cecília Helena de Azevedo Gouveia, Marília Teixeira e Manuela Rodrigues pela aquisição das imagens e análises de dados e discussões científicas. Aprendi muito com vocês.

Tenho muito que agradecer ao professor Edgar Paredes-Gamero e ao Marcus Buri pelo auxílio técnico na citometria de fluxo realizada no Instituto de Farmacologia da UNIFESP. A colaboração de vocês foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Ao Dr. Sérgio Allegrini Júnior que pacientemente me ensinou muito sobre imuno-histoquímica e realizou os cortes histológicos.

À Renata Albuquerque pelo auxílio técnico na citometria de fluxo realizada na FCF-USP. Sempre disposta a me ajudar.

Ao Edson Naoto Makiyama, técnico do laboratório pelo auxílio técnico e amizade.

À Mariana Cristina do Laboratório de Imunoendocrinologia da FCF-USP sempre disposta a me ajudar. Obrigada pelas conversas e risadas. Você tornou minha jornada mais divertida.

Aos companheiros de pós-graduação do laboratório de Hematologia Experimental, Guilherme Galvão dos Santos, Ed Wilson Santos, Jackeline Beltran, Amanda Nogueira Pedro, Andressa Antunes, Dalila Oliveira, Carolina Dias e Samira Alves Abou Arabi.

A Luciene Lima do Laboratório de Hematologia Clínica sua experiência científica foi decisiva em uma etapa final e crítica do trabalho.

A amiga Nena pelo incentivo de sempre.

À equipe do biotério de Produção e Experimentação da FCF-USP pelo profissionalismo no fornecimento dos animais.

À FAPESP, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro para desenvolvimento do trabalho.

“O desejo profundo da humanidade pelo conhecimento
é justificativa suficiente para nossa busca contínua.”

Stephen Hawking

RESUMO

TSUJITA, M. **Participação do nicho endosteal na regulação da hemopoese de camundongos submetidos à desnutrição proteica.** 2016. 186f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O nicho endosteal da medula óssea abriga as células-tronco hemopoéticas (CTH) em quiescência/autorrenovação. As CTH podem ser classificadas em dois grupos: células que reconstituem a hemopoese em longo prazo (LT-CTH) e curto prazo (CT-CTH). Investigamos, neste trabalho, os efeitos da desnutrição proteica (DP) no tecido ósseo e a participação do nicho endosteal na sinalização osteoblasto-CTH. Para tanto, utilizamos camundongos submetidos à DP induzida pelo consumo de ração hipoproteica. Os animais desnutridos apresentaram pancitopenia e diminuição nas concentrações de proteínas séricas e albumina. Quantificamos as CTH por citometria de fluxo e verificamos que os desnutridos apresentaram menor porcentagem de LT-CTH, CT-CTH e de progenitores multipotentes (PMP). Avaliamos a expressão das proteínas CD44, CXCR4, Tie-2 e Notch-1 nas LT-CTH. Observamos diminuição da expressão da proteína CD44 nos desnutridos. Isolamos as células LT-CTH por *cell sorting* e avaliamos a expressão gênica de *CD44*, *CXCR4* e *NOTCH-1.* Verificamos que os desnutridos apresentaram menor expressão de CD44. Em relação ao ciclo celular, verificamos maior quantidade de LT-CTH nas fases G0/G1. Caracterizamos as alterações do tecido ósseo femoral, *in vivo.* Observamos diminuição da densidade mineral óssea e da densidade medular nos desnutridos. A desnutrição acarretou diminuição da área média das seções transversais, do perímetro do periósteo e do endósteo na cortical do fêmur dos animais. E na região trabecular, verificou-se diminuição da razão entre volume ósseo e volume da amostra e do número de trabéculas, aumento da distância entre as trabéculas e prevalência de trabéculas ósseas em formato cilíndrico. Avaliamos a expressão de colágeno, osteonectina (ON) e osteocalcina (OC) por imuno-histoquímica, e de osteopontina (OPN) por imunofluorescência no fêmur e verificamos diminuição da marcação para OPN, colágeno tipo I, OC e ON nos desnutridos. Evidenciamos, pela técnica do Picrosírius, desorganização na distribuição das fibras colágenas e presença de fibras tipo III nos fêmures dos desnutridos, além de maior número de osteoclastos evidenciados pela reação da fosfatase ácida tartarato resistente. Os osteoblastos da região femoral foram isolados por depleção imunomagnética, imunofenotipados por citometria de fluxo e cultivados em meio de indução osteogênica. Observamos menor positividade para fosfatase alcalina e vermelho de alizarina nas culturas dos osteoblastos dos desnutridos. Avaliamos, por *Western Blotting,* a expressão de colágeno tipo I, OPN, osterix, Runx2, RANKL e osteoprotegerina (OPG), e, por PCR em tempo real, a expressão de *COL1A2*, *SP7*, *CXCL12*, *ANGPT1*, *SPP1*, *JAG2* e *CDH2* nos osteoblastos isolados. Verificamos que a desnutrição acarretou diminuição da expressão proteica de osterix e OPG e menor expressão gênica de *ANGPT1*. Avaliamos a proliferação das células LSK ($Lin^{-}Sca1^{+}c\text{-}Kit^{+}$) utilizando ensaio de CFSE (*carboxifluoresceína succinimidil ester)*. Foi realizada cocultura de células LSK e osteoblastos (MC3T3-E1) na presença e ausência de anti-CD44. Após uma semana, verificamos menor proliferação das LSK dos desnutridos. O bloqueio de CD44 das LSK do grupo controle diminuiu a proliferação destas em três gerações. Entretanto, nos desnutridos, esse bloqueio não afetou a proliferação. Concluímos que a DP promoveu alterações no tecido ósseo e nas CTH. Entretanto, não podemos afirmar que as alterações observadas no sistema hemopoético foram decorrentes de alterações exclusivas do nicho endosteal.

Palavras-chave: desnutrição, hemopoese, nicho endosteal, célula-tronco.

ABSTRACT

TSUJITA, M. **Endosteal niche participation in the hematopoiesis of mice submitted to protein malnourishment.** 2016. 186p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The bone marrow endosteal niche hosts hematopoietic stem cells (HSC) in quiescence/self-renewal. HSC can be classified into two groups: cells capable of renewing indefinitely (LT-HSC) or repopulating in the short term (ST-HSC). In this work, we investigated the effects of protein malnutrition (PM) on bone tissue and the involvement of the endosteal niche in osteoblast-CTH signaling. Therefore, we used mice subjected to PM induced by the consumption of hypoproteic feed. Malnourished animals presented pancytopenia and decreased concentration of serum protein and albumin. We quantified the HSC by flow cytometry and found that the malnourished ones had lower percentage of LT-HSC, ST-HSC and multipotent progenitors (MPP). We assessed the expression of the CD44, CXCR4, Tie-2 and Notch-1 proteins in LT-HSC. We observed decreased expression of CD44 protein with the malnourished ones. We isolated the LT-HSC cells by means of cell sorting and assessed the gene expression of *CD44*, *CXCR4* and *NOTCH-1*. We found that malnutrition had lower expression of CD44. Regarding the cell cycle, we see greater amount of LT-HSC in the G0 and G1 phases. We characterized the changes of the femoral bone tissue *in vivo*. We observed a decrease in the bone mineral density and medullar density in malnourished animals. As for malnourished animals, the femoral cortical region showed a significant decrease in tissue area, periosteal and endosteal perimeter. The femoral trabecular region of malnourished animals showed decreased bone volume/tissue volume ratio, decreased trabecular number, increased trabecular separation and prevalence of rod-like trabeculae. We investigated the expression of collagen, osteonectin (ON) and osteocalcin (OC) by means of immunohistochemistry and the expression of osteopontin (OPN) by immunofluorescence and we found that malnourished animals showed decreased labeling for OPN, type I collagen, OC and ON in the cortical region of the femur. Picrosirius staining was used to analyze disorganization of collagen fibers and presence of type III fibers in the femurs of the malnourished. Cortical and trabecular regions of malnourished animals presented a higher number of osteoclasts as shown by tartrate-resistant acid phosphatase reaction. Moreover, osteoblasts were isolated from the femoral region by immunomagnetic depletion and immunophenotyped by flow cytometry and cultured in osteogenic induction medium. Results proved less positive for alkaline phosphatase and alizarin red in the cultures of osteoblasts of malnourished animals. We assessed, by means of Western blotting, type I collagen expression, OPN, osterix, Runx2, RANKL and osteoprotegerin (OPG) and, by real time PCR, the expression of *COL1A2*, *SP7*, *CXCL12*, *ANGPT1*, *SPP1*, *JAG2* and *CDH2* with the isolated osteoblasts. We found that malnutrition led to osterix and OPG decreased protein expression and lower ANGPT1 gene expression. We evaluated LSK cell ($Lin^{-}Sca1^{+}c\text{-}Kit^{+}$) proliferation by CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester). LSK cells and osteoblasts (MC3T3-E1) cocultures were performed in the presence and absence of anti-CD44. After a week, we found lower proliferation of LSK in the malnourished. The LSK CD44 blocking in the control group decreased the proliferation of these three generations. However, as for the malnourished, such blockage did not affect proliferation. We concluded that the PM has promoted changes in bone tissue and the CTH. However, we can’t claim that the alterations observed in hematopoietic system were due to endosteal niche-only changes.

Key-words: malnourishment, hematopoiesis, endosteal niche, stem-cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Modelo hierárquico da hemopoese..... 30

Figura 2 Diagrama esquemático das interações CTH e osteoblasto..... 36

Figura 3 Principais regiões do fêmur e microarquitetura óssea..... 40

Figura 4 Diferentes tipos de células do tecido ósseo..... 41

Figura 5 Osteoclastogênese..... 43

Figura 6 Remodelação óssea..... 45

Figura 7 Delineamento experimental durante as fases de crescimento e desnutrição dos animais..... 55

Figura 8 Avaliação do consumo de ração, proteína e água..... 85

Figura 9 Variação do peso corporal..... 86

Figura 10 Valores das concentrações séricas das proteínas totais..... 87

Figura 11 Valores do número total de células da medula óssea..... 89

Figura 12 Estratégia de seleção das populações de LT-CTH, CT-CTH e PMP da medula óssea..... 91

Figura 13 Gráficos da porcentagem de células LSK, PMP, CT-CTH e LT-CTH obtidas por imunofenotipagem das células da medula óssea..... 92

Figura 14 Gráficos das porcentagens de células LSK, LT-CTH, CT-CTH e PMP nas fases G0/G1 e S/G2M do ciclo celular..... 93

Figura 15 Gráficos das intensidades de fluorescência expressas pelos receptores CD44, Notch-1, Cxcr4 e Tie-2 nas células LSK e LT-CTH da medula óssea..... 94

Figura 16 Gráficos *dot plots* representativos da estratégica de seleção da população LT-CTH..... 95

Figura 17 Resultados da expressão gênica nas células LT-CTH, *ex vivo*, por PCR em tempo real..... 97

Figura 18 Valores das concentrações séricas de cálcio e fósforo..... 98

Figura 19 Valores das concentrações séricas de paratormônio..... 99

Figura 20 Imagens de raios-X dos animais..... 100

Figura 21 Gráficos dos valores de densidade óssea das regiões femorais..... 101

Figura 22 Gráficos dos valores da densidade da medula óssea das regiões femorais..... 102

Figura 23 Imagens representativas das regiões trabeculares do fêmur dos animais obtidas no µCT..... 105

Figura 24 Fotomicrografias de cortes histológicos longitudinais de esternos corados com HE..... 107

Figura 25 Fotomicrografias de cortes histológicos longitudinais de medula óssea esternal corados com HE..... 108

Figura 26 Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando as regiões cortical, endósteal, trabecular e medular, marcadas por imunofluorescência para osteopontina..... 109

Figura 27 Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando regiões cortical e trabecular marcada por imuno-histoquímica para colágeno tipo I..... 110

Figura 28 Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando região trabecular marcada por imuno-histoquímica para colágeno tipo I..... 111

Figura 29 Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando região cortical marcada por imuno-histoquímica para osteonectina..... 112

Figura 30 Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando região trabecular marcada por imuno-histoquímica para osteonectina..... 113

Figura 31 Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmur evidenciando região cortical marcada por imuno-histoquímica para osteocalcina..... 114

Figura 32 Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando região trabecular marcada por imuno-histoquímica para osteocalcina..... 115

Figura 33 Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmur. Coloração Picrossírius..... 117

Figura 34 Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando osteoclastos presentes nas regiões cortical e trabecular corados pela reação citoquímica de TRAP..... 119

Figura 35 Número de osteoclastos presentes nos cortes histológicos de fêmur..... 120

Figura 36 Fotomicrografias dos citocentrifugados das suspensões celulares removidas da região endosteal da medula óssea por tratamento com colagenase e posteriormente isoladas por imunodepleção magnética..... 121

Figura 37 Fotomicrografias de cortes longitudinais de fêmures corados com HE antes do tratamento com colagenase 0,2%, após remoção da medula óssea e após tratamento com colagenase 0,2% para remoção das células endosteais..... 122

Figura 38 Imunofenotipagem por citometria de fluxo da população celular obtida após tratamento com colagenase..... 124

Figura 39 Porcentagem de células positivas para os marcadores OPN, linhagem hematológica e Sca-1 presentes na suspensão celular obtida após o tratamento do fêmur com colagenase 0,2%..... 125

Figura 40 Fotomicrografias dos osteoblastos células isoladas da região endosteal após uma semana de cultura em meio α-MEM contendo 10% SFB..... 126

Figura 41 Fotomicrografia de células osteoblásticas, oriundas de animais do grupo controle, cultivadas após uma semana na presença de meio de indução e submetidas a reação citoquimica da fosfatase alcalina..... 127

Figura 42 Deposição de cálcio pelos osteoblastos evidenciado pela coloração com vermelho de alizarina dos osteoblastos após uma semana de cultura em meio de indução osteogênica..... 128

Figura 43 Análise quantitativa da coloração com vermelho de alizarina dos osteoblastos após uma semana de cultura em meio de indução osteogênica dos animais do grupo controle e desnutrido..... 128

Figura 44 Gráficos da expressão de colágeno tipo 1, osteopontina (OPN), osterix, Runx-2, osteoprotegerina (OPG), RANKL e relação OPG/RANKL nos osteoblastos, ex vivo, por *Western blotting*..... 129

Figura 45 Resultados da expressão gênica nos osteoblastos..... 131

Figura 46 Concentração de M-CSF (pg/mL) em lavado de medula óssea dos animais..... 132

Figura 47 Fotomicrografia de cultura de células MC3T3-E1 marcadas por imunofluorescência para osteopontina..... 133

Figura 48 Fotomicrografias de cocultura de células MC3T3-E1 e células (LSK) após sete dias de cultivo..... 134

Figura 49 Análise da incorporação do substrato fluorescente (CFSE) pelas células LSK..... 136

Figura 50 Histogramas das sucessivas gerações de células LSK em cocultura com células MC3T3-E1..... 137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição da ração de crescimento (AIN93G modificada)..... 52

Tabela 2 Composição das reações controle e hipoproteica (AIN93 modificada)..... 52

Tabela 3 Composição da mistura salínica..... 53

Tabela 4 Composição da mistura vitamínica..... 54

Tabela 5 Características dos ensaios utilizados para a avaliação da expressão gênica nas LT-CTH em PCR em tempo real..... 62

Tabela 6 Especificações dos parâmetros utilizados na aquisição das imagens no equipamento microtomógrafo de raios-X de alta resolução..... 64

Tabela 7 Etapas de desidratação..... 66

Tabela 8 Etapas de embebição, inclusão e polimerização..... 67

Tabela 9 Etapas de remoção da resina..... 68

Tabela 10 Etapas de hidratação..... 68

Tabela 11 Etapas de desidratação..... 69

Tabela 12 Descrição dos anticorpos utilizados nas reações de imunofluorescência e imuno-histoquímica..... 71

Tabela 13 Descrição dos anticorpos utilizados nas reações de *Western Blotting*..... 78

Tabela 14 Características dos ensaios utilizados para avaliação da expressão gênica nos osteoblastos em PCR em tempo real..... 80

Tabela 15 Valores da série eritrocitária em animais controle e desnutridos..... 88

Tabela 16 Valores da série leucocitária em animais controle e desnutridos..... 88

Tabela 17 Valores absolutos das populações celulares presentes na medula óssea..... 89

Tabela 18 Valores do diâmetro da cortical do fêmur em animais controle e desnutridos 103

Tabela 19 Avaliação dos parâmetros ósseos das regiões cortical e trabecular do fêmur..... 106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN: *American Institute of Nutrition* (Instituto Americano de Nutrição)

ANG1: angiopoetina-1

APC: *allophycocyanin* (aloficocianina)

ATP6V0D2: *ATPase, H+ Transporting, Lysosomal 38kDa, V0 Subunit D2* (isoforma da subunidade D2 na V-ATPase)

B.Ar: *bone area* (área óssea)

B.Pm: *bone perimeter* (perímetro do endósteo)

BMI1: *polycomb repressor*

BMP: *bone morphogenetic protein* (proteína morfogenética óssea)

BMPR1A: *bone morphogenetic protein receptor 1A* (receptor da proteína morfogenética óssea 1A)

BMU: *bone multicelular unit* (unidade óssea multicelular)

BSA: *bovine serum albumine* (albumina sérica bovina)

BV/TV: *bone volume/total volume* (volume ósseo / volume total)

BV: *bone volume* (volume ósseo)

CD: *cluster of differentiation* (grupo de diferenciação)

CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média

c-Kit: (receptor de *stem cell factor*)

CSL: *supressor of hairless-Lag1*

CT: célula-tronco

CT-CTH: célula-tronco hemopoética com capacidade de autorrenovação a curto prazo

CTH: célula-tronco hemopoética

CTPH: célula-tronco progenitora hemopoética

CXCL12: *CXC chemokine ligand 12*

CXCR4: *CXC chemokine receptor 4*

DA: *degree of anisotropy* (grau de anisotropia)

DC-STAMP: *dendritic cell-specific transmembrane protein* (proteína transmembrana específica de célula dendrítica)

DMO: densidade mineral óssea

DP: desnutrição proteica

EDTA: *ethylenediaminetetracetic acid* (ácido etilenodiaminotetracético)
ERK: *extracellular-signal-regulated kinases* (quinase regulada por sinal extracelular)
FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FITC: *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)
HCM: hemoglobina corpuscular média
HE: hematoxilina-eosina
ICAM-1: *intercelular adhesion molecule* (integrina de adesão celular 1)
JNK: *c-Jun N-terminal quinase*
KIT: *c-kit-ligand*
LFA 1: *lymphocyte function-associated antigen 1*
Lin^-: linhagem negativa
Lin^-/c-Kit^+/Sca-1^+ ou “LSK”
LT-CTH: célula-tronco hematopoética com capacidade de autorrenovação a longo prazo
M-CSF: *macrophage colony-stimulating fator* (fator estimulador de colônia de macrófagos)
MEC: matriz extracelular
MITF: *microphthalmia-associated transcription fator* (fator de transcrição associado à microftalmia)
µCT: microtomografia computadorizada
MO: medula óssea
OC: osteocalcina
OMS: Organização Mundial da Saúde
ON: osteonectina
OPG: osteoprotegerina
OPN: osteopontina
NF-ķB: *nuclear factor kappa B* (factor nuclear kappa B)
PBS: *phosphate buffered saline* (solução tampão fosfato)
PE: *phycoerytrin* (ficoeritrina)
PME: progenitor hemopoético multipotente
PGM: progenitor granulo-monocítico
PI3K: *phosphatidylinositol-3 kinase* (fosfatidilinositol-3-quinase)
PKC: *protein kinase C* (proteína quinase C)

PL: progenitor linfoide

PLC: *phospholipase C* (fosfolipase C)

PTH: paratormônio

PM: progenitor mieloide

PME: progenitor megacariocítico-eritroide

PTH: paratormônio

PU.1: fator de transcrição da família ETS

RANK: *receptor activator of nuclear factor kappa-B* (receptor ativador do fator nuclear kappa-B)

RANKL: *receptor ativator of nuclear factor kappa-B ligand* (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B)

RGD: arginia-glicina-ácido aspártico

SPARC: *Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein* (proteína ácida secretada e rica em cisteína)

SCF: *stem cell fator* (fator estimulador de célula-tronco)

SDF-1: *stromal cell-derived fator 1* (fator derivado do estroma da medula óssea)

SFB: soro fetal bovino

SMADS: *mothers against decapentaplegic-related homologue*

SMI: *structural model index* (índice de modelo estrutural)

T.Ar: *tissue area* (área tecidual)

TGF-β: *transforming growth factor beta* (fator de transformação do crescimento beta)

TRAF6: *TNF receptor-associated fator 6*

TRAP: *tartarate-resistant acid phosphatase* (fosfatase ácida-tartarato resistente)

T.Pm: *tissue perimeter* (perímetro do periósteo)

Tb.N: *trabecular number* (número de trabéculas)

Tb.Sp: *trabecular separation* (separação trabecular)

Tb.Th: *trabecular thickness* (espessura trabecular)

Tie2: *tyrosine kinase receptor 2*

TNF: *tumor necrosis fator* (fator de necrose tumoral)

TV: *total volume* (volume total)

VCM: volume corpuscular médio

VLA4: *very late antigen-4*

VLA5: *very late antigen-5*

Wnt: *wingless-type MMTV integration site family*

LISTA DE SÍMBOLOS

µL	microlitro
µM	micromol
h	hora
kDa	kilodalton
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimol
Kg	kilograma
ºC	grau Celsius
rpm	rotações por minuto
s	segundo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 26
1.1 Desnutrição 26
1.2 Células-tronco hemopoéticas (CTH) 29
1.3 Nicho endosteal 33
1.4 Desnutrição e hemopoese 38
1.5 Tecido ósseo 41
1.5.1 Tipos celulares 41
1.5.2 Remodelação óssea 46
1.5.3 Colágeno e proteínas não-colagênicas: osteopontina, osteocalcina e osteonectina 47
2 OBJETIVOS 51
3 MATERIAL E MÉTODOS 53
3.1 Animais 53
3.2 Rações 53
3.3 Indução do processo de desnutrição 56
3.4 Avaliação do estado nutricional dos animais 57
3.5 Obtenção das amostras sanguíneas 57
3.6 Avaliação das concentrações séricas de albumina e proteínas 58
3.7 Hemograma e contagem de reticulócitos 58
3.8 Caracterização da hipoplasia medular e contagem diferencial das células da medula óssea (MO) 58
3.9 Quantificação das células LT-CTH da medula óssea 59
3.10 Avaliação, ex vivo, do ciclo celular das células-tronco hemopoéticas (CTH) da medula óssea (MO) 60
3.11 Avaliação da expressão proteica de CD44, CXCR4, Tie-2 e Notch-1 por citometria de fluxo 60
3.12 Ensaio de separação celular em citômetro de fluxo (fluorescense activated cell sorting) 61
3.12.1 Separação das células LSK 61
3.12.2 Separação das células-tronco de longa duração (LT-CTH) 62
3.13 Avaliação da expressão gênica de CD44, Cxcr4 (CXCR4) e Notch-1 (NOTCH-1) nas células-tronco de longa duração (LT-CTH), ex vivo, por PCR em tempo real 62
3.14 Avaliação das concentrações séricas cálcio e fósforo 64
3.15 Dosagem de paratormônio (PTH) 64

3.16 Análise da densidade mineral óssea e densidade medular femoral 65
3.17 Análise morfométrica por microtomografia (µCT) 65
3.18 Processamento dos cortes histológicos para inclusão em resina 67
3.18.1 Soluções fixadoras 67
3.18.2 Desidratação 68
3.18.3 Embebição, inclusão e polimerização 68
3.18.4 Cortes histológicos 69
3.18.5 Remoção da resina e hidratação dos cortes histológicos 69
3.19 Coloração dos cortes histológicos de esternos e fêmures com hematoxilina-eosina (HE) 70
3.20 Detecção, por imunofluorescência, de osteopontina em cortes histológicos de medula óssea 71
3.21 Detecção, por imuno-histoquímica, de colágeno tipo I, osteonectina e osteocalcina em cortes histológicos de medula óssea 72
3.22 Coloração de Picrossírius para identificação de colágeno em cortes histológicos de medula óssea femoral 73
3.23 Quantificação de osteoclastos em cortes histológicos de medula óssea 74
3.24 Isolamento dos osteoblastos da medula óssea femoral 75
3.25 Indução osteogênica dos osteoblastos isolados por imunodepleção magnética 76
3.26 Avaliação qualitativa da fosfatase alcalina por citoquímica 77
3.27 Ensaio de mineralização dos osteoblastos em cultura celular 77
3.28 Expressão proteica por Western Blotting, de colágeno tipo I, osteopontina, osterix, Runx2, OPG e RANKL nos osteoblastos isolados 78
3.29 Avaliação da expressão gênica de colágeno do tipo I (COL1A2), osterix (SP7), cxcl12 (CXCL12), angiopoetina (ANGPT1), osteopontina (SPP1), Jagged (JAG2) e N-caderina (CDH2), nos osteoblastos, ex vivo, por PCR em tempo real. 80
3.30 Quantificação de M-CSF do lavado de medula óssea dos animais ex vivo 82
3.31 Imunofluorescência para osteopontina (OPN) nas células MC3T3 83
3.32 Ensaio de proliferação das células LSK 83
3.33 Estabelecimento de cocultura de MC3T3 e LSK 84
4 RESULTADOS 86
4.1 Determinação da concentração proteica das rações 86
4.2 Análise do estado nutricional 86
4.2.1 Consumo de ração e água 86
4.2.2. Peso corporal 88
4.2.3 Determinação da concentração de proteínas totais e albumina 89
4.3 Análise do hemograma 89
4.4 Células totais da medula óssea e mielograma 90

4.5 Quantificação das células células-tronco hemopoéticas (CTH) 92

4.6 Avaliação do ciclo celular das células-tronco hemopoéticas (CTH) por citometria de fluxo 94

4.7 Avaliação da expressão proteica de CD44, Cxcr4, Notch-1 e Tie-2 em células-tronco hemopoéticas da medula óssea por citometria de fluxo 95

4.8 Isolamento das células-tronco hemopoéticas de longa duração (LT-CTH) da medula óssea 96

4.9 Avaliação da expressão gênica de CD44, Cxcr4 (CXCR4) e Notch-1 (NOTCH-1) nas células-tronco hemopoéticas de longa duração (LT-CTH) da medula óssea, ex vivo, por PCR em tempo real 98

4.10 Dosagem de cálcio e fósforo 100

4.11 Dosagem de paratormônio (PTH) 100

4.12 Avaliação da densidade mineral óssea do fêmur 101

4.13 Avaliação da densidade medular do fêmur 103

4.14 Avaliação do diâmetro da cortical do fêmur 104

4.15 Análise morfométrica das regiões cortical e trabecular do fêmur 105

4.16 Avaliação histológica de fêmures e esternos de animais controle e desnutrido corados com hematoxilina eosina (HE) 108

4.17 Detecção, por imunofluorescência, da osteopontina (OPN) em cortes histológicos de fêmur 111

4.18 Detecção, no fêmur, por imuno-histoquímica do colágeno tipo I, osteocalcina e osteonectina 112

4.19 Avaliação do colágeno da medula óssea por Picrossírius sob luz polarizada 118

4.20 Quantificação de osteclastos em cortes histológicos de fêmur 120

4.21 Isolamento dos osteoblastos 122

4.22 Caracterização imunofenotípica dos osteoblastos 125

4.23 Cultura dos osteoblastos 127

4.24 Avaliação da fosfatase alcalina em células de cultura 128

4.25 Caracterização do potencial de mineralização dos osteoblastos de animais controle e desnutrido 129

4.26 Quantificação das proteínas colágeno tipo I, osteopontina (OPN), osterix, Runx2, osteoprotegerina (OPG) e RANK-L nos osteoblastos, *ex vivo*, por *Western blotting* 131

4.27 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real de colágeno tipo 1 (COLA1A2), osterix (SP7), Cxcl12 (CXCL12), angiopoetina (ANGPT1), osteopontina (SPP1), jagged (JAG2) e N-caderina (CDH2). 133

4.28 Avaliação das concentrações de M-CSF em lavado de medula óssea e em sobrenadante de cultura de osteoblastos 134

4.29 Detecção, por imunofluorescência, da osteopontina (OPN) em cultura de células MC3T3-E1 135

4.30 Ensaio de cocultura de células LSK e MC3T3-E1 136

4.31 Ensaio de proliferação das células LSK em sistema de cocultura 137
5 DISCUSSÃO 141
5.1 Aspectos nutricionais 141
5.2 Aspectos hematológicos 144
5.3 Aspectos ósseos 148
6 CONCLUSÕES 161
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 162
8 ANEXOS 181
8.1 Informações para os membros da banca julgadora 181
8.2 Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa 182
8.3 Ficha do aluno 183
8.4 Currículo Lattes 185

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desnutrição

O termo desnutrição é definido como uma condição patológica causada pelo consumo insuficiente, desbalanceado ou excessivo de macronutrientes e/ou micronutrientes (FAO 2015).

Dados da FAO de 2015 indicam que há 795 milhões de pessoas desnutridas ao redor do globo, sendo que a maior parte dos casos de desnutrição encontra-se em países em desenvolvimento. Há 220 milhões de desnutridos na África subsaariana, 281 milhões em países do sul da Ásia e 34 milhões na América Latina e Caribe (FAO, 2015). Observou-se, na última década a diminuição de 167 milhões de indivíduos desnutridos, sobretudo em regiões em desenvolvimento. No Brasil, a porcentagem de crianças desnutridas menores de cinco anos caiu entre 1986 e 1996 de 33,9% para 22,2% e entre 1996 e 2006 de 22,2% para 5,9%. Melhorias na escolaridade materna, no acesso a serviços de água e esgoto e implementanção de políticas públicas foram particularmente importantes para o declínio da desnutrição no país (MONTEIRO, 2009). A participação do Brasil no programa de metas dos Objetivos de Desenvolvimento do Milênio também contribuiu para o decréscimo do número de desnutridos. Os objetivos foram criados em 2000 pela Organização das Nações Unidas (ONU) e visaram, entre outras metas, a redução da extrema pobreza e fome no mundo. De um total de 129 países, 72 atingiram a meta de diminuir pela metade o número de pessoas que passam fome (ONU, 2015). Nas regiões em desenvolvimento, de maneira geral, houve diminuição da desnutrição e da proporção de crianças menores de cinco anos abaixo do peso (ONU, 2015). O Brasil atingiu parte das metas estabelecidas – como no combate à fome e na redução da mortalidade infantil (ONU, 2015), com a ressalva de que o resultado obtido é substancialmente heterogêneo. Entretanto, a desnutrição prevalece em crianças das regiões Norte e Nordeste (LIMA et al., 2010). A desnutrição também é observada nas periferias das grandes cidades associada à

falta de saneamento e de hábitos alimentares, hábitos alimentares pouco saudáveis, ao baixo peso ao nascer e nanismo (SAWAYA et al., 2009).

Quanto à causa, a desnutrição pode ser classificada em primária ou secundária. Enquanto na desnutrição primária o consumo inadequado de nutrientes é o fator determinante desta morbidade, a secundária é causada por doenças não nutricionais, tais como doenças crônicas, trauma, sepse e condições inflamatórias agudas que resultam no catabolismo das reservas endógenas de proteínas, carboidratos e lipídeos.

A desnutrição proteico-energética (DPE), em seus diferentes estágios, desde as formas mais leves, capazes de causar deficiências discretas no crescimento ou pequenas perdas de peso, até as manifestações mais graves, como o *Kwashiokor* e o *Marasmus*, constitui umas das mais difundidas doenças carenciais e um dos principais problemas de saúde coletiva em países em desenvolvimento (JEN e YAN, 2010). O *Marasmus* e o *Kwarshiorkor* se manifestam clinicamente de formas distintas. No *Marasmus*, deficiência principalmente em energia, ocorre baixa ingestão de alimentos. A criança que tem *Marasmus* ingere muito pouco alimento, frequentemente porque a mãe não pode amamentar, é extremamente magra devido à perda de músculo e gordura corporal; quase invariavelmente desenvolve alguma infecção. A criança apresenta estatura inferior ao esperado para a idade, membros delgados devido à atrofia muscular e subcutânea, costelas proeminentes, sua pele se mostra solta e enrugada, apresenta infecções constantes, comumente é irritadiça e seu apetite é variável. No *Marasmus* ocorre depleção de tecido muscular esquelético e de gordura subcutânea para manutenção dos órgãos vitais, como cérebro, coração e as vísceras. O predomínio da ação catabólica ocorre, também, por causa da baixa concentração de insulina plasmática (AHMED et al., 2009).

Kwashiorkor é uma palavra africana que significa "primeira criança-segunda criança" e denomina a deficiência que se origina do fato de que a primeira criança desenvolve um quadro de desnutrição quando a segunda criança nasce, pois deixa de receber aleitamento materno (WILLIAMS, 1933). A primeira criança, desmamada, passa a ser alimentada com alimentos líquidos deficientes em proteína comparados ao leite materno. A deficiência de proteína no *Kwashiorkor* é normalmente mais significativa que a deficiência calórica, resultando em edema, erupções cutâneas e descoloração do cabelo. Nestas crianças não ocorre mobilização dos estoques de proteínas da musculatura de forma suficiente para manter a função dos órgãos

essenciais. O tipo intermediário de desnutrição proteico-calórica é denominado *Kwashiorkor* – marasmático. Crianças com esse tipo apresentam edema e têm mais gordura corporal do que as que têm *Marasmus*. O *Kwashiorkor* é menos comum do que o *Marasmus* e normalmente acontece como *Kwashiorkor* – marasmático (AHMED et al., 2009). O desenvolvimento comportamental pode ser extremamente atrasado na criança severamente subnutrida e pode acontecer oligofrenia. Frequentemente, a criança que tem *Marasmus* é mais severamente afetada do que uma criança mais velha que tenha *Kwashiorkor*.

A desnutrição acomete principalmente crianças (JOOSTEN e HULST, 2008), idosos (SAKA et al., 2010) e indivíduos hospitalizados (BARKER et al., 2011). Clinicamente, as consequências da desnutrição dependem da intensidade, da duração e da causa da deficiência e, na dependência desses aspectos, pode-se observar o comprometimento do desenvolvimento psicomotor e, no caso de crianças e adultos gravemente desnutridos, podem ocorrer alterações histológicas e funcionais em diversos órgãos como coração, pulmões, rins e trato gastrointestinal e o aumento da susceptibilidade às infecções (RODRÍGUEZ et al., 2011). A determinação do estado nutricional considera também a avaliação antropométrica que se destaca como um dos indicadores de saúde da criança. É um importante instrumento epidemiológico que fornece uma estimativa da prevalência e gravidade das alterações nutricionais. Pela aferição do peso e da altura, podem ser calculados três índices antropométricos mais frequentemente empregados na avaliação nutricional: peso/idade, estatura/idade e peso/estatura. Segundo a Organização Mundial da Saúde, indivíduos que apresentam índices de peso/estatura ou peso/idade menores que dois desvios-padrão da média comparado ao respectivo valor da referência são considerados desnutridos (WHO, 2015).

A DPE provoca alterações hormonais como diminuição na concentração plasmática de insulina tanto no *Marasmus* quanto no *Kwashiorkor*. Como a insulina estimula a síntese proteica no fígado e no músculo e inibe a proteólise, baixas concentrações deste hormônio permitem maior liberação de aminoácidos a partir dos músculos, a fim de privilegiar a síntese proteica de outros tecidos. Dados do nosso grupo mostram que camundongos submetidos à dieta hipoproteica apresentam altas concentrações plasmáticas de corticosterona, redução da glicemia e redução da concentração de insulina, que corroboram com a função essencialmente catabólica dos glicocorticoides (NAKAJIMA et al., 2014). Em relação

ao quadro hematológico, há alterações hematológicas quantitativas como anemia (BORELLI et al., 2007), leucopenia (BORELLI et al., 1995, 1998, 2007) linfocitopenia (BORELLI et al., 1995; FOCK et al., 2007) e neutropenia (BORELLI et al., 1995, 1998, 2007) como reflexo do comprometimento dos órgãos linfo-hemopoéticos em condições de desnutrição. Além disso, essas alterações hematológicas estão associadas à modificação da resposta imune específica e inata que se traduz por maior susceptibilidade à infecção (FOCK et al., 2010).

1.2 Células-tronco hemopoéticas (CTH)

A hemopoese é um processo dinâmico no qual CTH se autorrenovam e/ou diferenciam-se em células do sistema sanguíneo. Este processo é mediado por citocinas, fatores de crescimento, hormônios, matriz extracelular e células estromais, constituindo um microambiente indutor, de forma a manter a quantidade e tipos celulares de acordo com as necessidades do organismo, sejam fisiológicas ou patológicas (MAYANI et al., 1992; EAVES et al., 1991; BRACH e HERMANN, 1991). Nesse processo a célula-tronco pluripotente origina células comprometidas para a linhagem mieloide ou linfoide e também é capaz de se autorrenovar para manter constante a quantidade de células-tronco na medula óssea (MO). Em condições homeostáticas o número constante de células-tronco é mantido por mecanismos de divisão celular simétrica ou assimétrica (WILSON e TRUMPP, 2006). Na teoria da divisão assimétrica, as duas células-filhas recebem diferentes conteúdos proteico e de RNAm. Durante a mitose, uma célula-filha retém a propriedade de autorrenovação e a outra irá originar células comprometidas com as linhagens mieloide e linfoide. Embora este mecanismo não tenha sido demonstrado *in vivo* em nenhuma célula-tronco de vertebrados, vários estudos *in vitro* indicam que as CTH podem apresentar este tipo de divisão (ROEGIERS e JAN, 2004). No modelo de divisão simétrica, as duas células filhas apresentam o mesmo conteúdo proteico e de RNAm, mas são expostas a diferentes sinais extrínsecos dependendo do microambiente. Enquanto uma célula-filha permanece no microambiente mantendo a capacidade de autorrenovação, a outra não se mantém no nicho de células-tronco e

recebe estímulos que iniciam seu comissionamento (OHLSTEIN et al., 2004). Alguns trabalhos científicos evidenciam a existência de ambos os modelos (QUESENBERRY et al., 2002; WILSON et al., 2009).

Em camundongos, assim como em humanos, as CTH originam progenitores multipotentes (PMM) que não apresentam capacidade de autorrenovação (CHRISTENSEN e WEISSMAN, 2001; SPANGRUDE et al., 1988) e se diferenciam para duas linhagens celulares restritas: a de progenitores linfoides (PL) (KONDO et al., 1997), da qual resultam os linfócitos T, linfócitos B e células *natural killers* (NK); ou para progenitores mieloides (PM) que originam os progenitores grânulo-monocíticos (PGM) e megacariocítico-eritroides (PME) (AKASHI et al, 1999).

Em relação às CTH, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram uma extensa heterogeneidade de fenótipo e de comportamento, sendo que estas podem diferir quanto à sua capacidade de autorrenovação, ao número de progenitores diferenciados por CTH, à capacidade de diferenciação e ao padrão de migração (SPANGRUDE et al., 1988). Contudo, as principais características que definem as CTH consistem na sua habilidade em manter um equilíbrio entre a autorrenovação e a diferenciação; serem multipotentes, podendo originar de 8 a 10 linhagens distintas de células sanguíneas; apresentarem uma extensa capacidade proliferativa apesar de a maioria da população encontrar-se na fase G0 do ciclo celular; serem muito raras, variando em torno de 1 a cada 10.000 a 100.000 células da MO; e serem capazes de repovoar o tecido lesado (BONNET, 2002). As CTH também podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com a sua habilidade em reconstituir as diferentes linhagens celulares em animais irradiados: as CTH com capacidade de reconstituição por tempo indefinido (*long-term reconstituting cells – LTRC*) ou LT-CTH, que podem manter o sistema hemopoético durante a vida inteira do animal transplantado e as com capacidade de reconstituição por um período de 6 a 8 semanas *(short-term reconstituting cells – STRC*) ou CT-CTH (REYA et al., 2001) (MÜLLER-SIEBURG et al., 2002), que podem repovoar as populações de células linfoides e mieloides por algumas semanas (ZHONG et al., 2005) (**Figura 1**). As LT-CTH, as mais primitivas e consideradas as verdadeiras células-tronco, proliferam mais lentamente que as CT-CTH, acarretando enxertia tardia, mas sustentável da medula óssea. Por outro lado, as CT-CTH apresentam enxertia precoce, porém, não sustentável. Dessa forma, para que um animal irradiado sobreviva à aplasia medular

é necessário o transplante concomitante de células com capacidade de enxertia precoce juntamente com as LT-CTH (ZHAO et al., 2000).

A metodologia mais utilizada para isolar e caracterizar as diferentes populações de CTH é a partir de um conjunto de marcadores de superfície, ou seja, de seu imunofenótipo. As células-tronco são comumente caracterizadas por não expressarem marcadores de células diferenciadas, mas expressarem os marcadores Sca-1 (*stem cell antigen-1*), c-Kit (receptor de *stem cell factor*), também denominado CD117 e, expressar, pelo menos em baixas quantidades, Thy1.1 (CD90), logo sendo denominadas Lin^{-} $Sca\text{-}1^{+}$ $c\text{-}Kit^{+}$ $Thy1.1^{fraco}$ (SPANGRUDE et al., 1988; PEARCE et al., 2004; BRYDER et al., 2006; WEISSMAN e SHIRUZU, 2008). Essa rara população de células engloba, praticamente, todas as LT-CTH e a maioria das CT-CTH.

Em camundongos, a atividade multipotente hemopoética está presente na população de células que não expressam marcadores de linhagem hemopoética denominada linhagem negativa (Lin^{-}), mas que apresentam alta expressão de marcadores associados à CT, tais como c-Kit e Sca-1. Desta forma as populações LT-CTH, ST-CTH e PMM expressam o fenótipo ($Lin^{-}/c\text{-}Kit^{+}/Sca\text{-}1^{+}$ ou "LSK"). A células LSK podem ainda ser classificada em subpopulações de acordo com a intensidade de expressão dos antígenos Thy1.1 (SPANGRUDE et al., 1988), CD34 (OSAWA et al., 1996) e Flk2/Flt3 (ADOLFSSON et al., 2001) (CHRISTENSEN e WEISSMAN, 2001). Na população LSK, a perda de expressão de Thy1.1 e o ganho de Flk2 estão correlacionados à diminuição da capacidade de autorrenovação celular (ADOLFSSON et al., 2001) (CHRISTENSEN e WEISSMAN, 2001) e ao aumento da proliferação (PASSEGUÉ et al., 2005). A fração de células LSK que expressa Flk2 não é completamente multipotente, pois não originam número significativo de progenitores megacariocíticos e eritrocíticos nos ensaios realizados (YANG et al., 2005; ADOLFSSON et al., 2005) (**Figura 1**).

Outros estudos de isolamento das LT-CTH realizados por CHEN e colaboradores demonstraram que estas células são exclusivamente encontradas na população que apresenta a coexpressão de endoglina (CD105) e capacidade de excluir o corante rodamina, além de expressarem $Sca\text{-}1^{+}c\text{-}Kit^{+}$ (CHEN et al., 2002). Em ensaios de reconstituição da hemopoese, 100 células com as características descritas foram capazes de reconstituir a medula óssea de camundongos irradiados (CHEN et al., 2003).

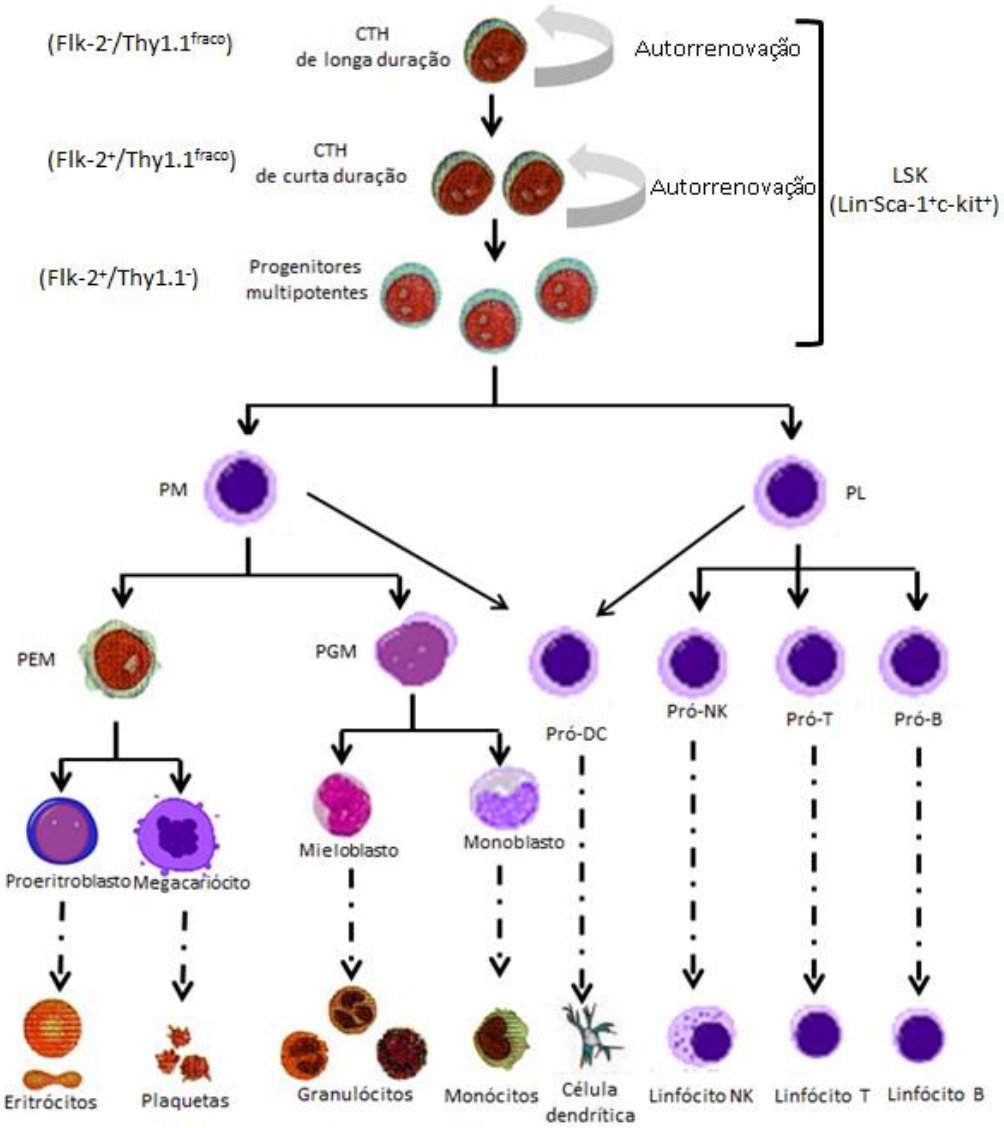


Figura 1 - Modelo hierárquico da hemopoese e caracterização fenotípica das CTH. As células-tronco hemopoéticas têm a capacidade de renovar-se por longos períodos (CTH de longa duração) ou por períodos curtos (CTH de curta duração) e de diferenciar-se em progenitores hemopoéticos multipotentes (PHM), os quais se comprometem com a linhagem mielóide (PM) ou com a linhagem linfóide (PL). O PM origina progenitor eritroide-megacariocítico (PEM) e progenitor grânulo-monocítico (PGM). A diferenciação dos precursores proeritroblasto, megariócito, mieloblasto e monoblastos originam, respectivamente, eritrócitos, plaquetas, granulócitos e monócitos. Os precursores pró-DC, pró-NK, pró-T e pró-B originam, respectivamente, células dendríticas, linfócitos NK ("natural killer"), linfócitos T e linfócitos B. Marcadores fenotípicos: linhagem hemopoética negativa (Lin^-), c-Kit, Sca-1, Flk2 e Thy1.1. A expressão antigênica pode ser positiva (+), negativa (-) ou de intensidade fraca. Adaptado de LARSSON e KALSSON, 2005.

1.3 Nicho endosteal

De acordo com o comprometimento e a cinética de proliferação, cada linhagem hemopoética está localizada em uma região distinta da medula óssea, denominada nicho. O termo nicho de célula-tronco pode ser definido como um espaço anatomicamente delimitado que controla a autorrenovação na ausência de diferenciação celular (**Figura 2**). Este nicho foi primeiramente descrito por Schofield que propôs a localização das CTH próximas às regiões endosteais e a necessidade de contato celular para a proliferação celular e inibição da capacidade de diferenciação das CTH (SCHOFIELD, 1978). Vários estudos demostraram a localização das CTH associadas às regiões ósseas (NILSSON et al. 2001; XIE et al. 2009). Além disso, também há um segundo nicho, o vascular. Este nicho é dinâmico e muda de localização conforme a resposta à injúria celular ou conforme observado após tratamento mieloablativo, entre outros. Vários fatores solúveis e ligantes celulares que induzem a mobilização das CTH fazem com que estas se soltem do nicho endosteal e migrem para o centro da medula óssea, até o nicho vascular, restabelecendo a hemopoese (TRUMPP et al., 2010). Logo, pressupõe-se que o nicho endosteal abriga as CTH em quiescência/autorrenovação e que no nicho vascular encontram-se as células em proliferação/diferenciação.

Estudos do ciclo celular das CTH indicam que estas se encontram em quiescência (SUDA et al., 2011) e que, nesses locais onde se encontram, há baixa quantidade de oxigênio. A quiescência é um mecanismo que minimiza o acúmulo de danos celulares em decorrência de estresse oxidativo ou fisiológico, bem como potencializa a capacidade proliferativa das CTH (FOLMES et al., 2012). Estudos têm demonstrado que a atividade mitocondrial das CTH é menor quando comparada à dos progenitores em fases mais diferenciadas (NORDDAHL et al., 2011). E ainda, as LT-CTH apresentam menor potencial de membrana mitocondrial, menor consumo de oxigênio, baixos níveis de ATP e maior taxa metabólica de glicólise quando comparadas às demais (NORDDAHL et al., 2011).

A autorrenovação e diferenciação estão relacionadas ao estado metabólico no qual as CTH se encontram. A manutenção da população de CTH depende da divisão assimétrica que origina duas populações distintas de células filhas com quantidades distintas de mitocôndrias (WU et al., 2007). Há evidências de que a

divisão assimétrica permita que células filhas percam mitocôndrias o que consequentemente diminui a produção de espécies reativas de oxigênio produzidas durante a respiração mitocondrial (MANTEL et al., 2010); enquanto que, o grupo de CTH que acumula mitocôndrias torna-se comprometido com a diferenciação celular.

As LT-CTH estão preferencialmente localizadas no nicho endosteal, enquanto que as regiões centrais e perisinusoidais abrigam progenitores em proliferação celular e células mais diferenciadas (LAM; ADAMS, 2010). Os osteoblastos estão aderidos à superfície óssea de um lado e interagem com células estromais e hemopoéticas de outro. Há um consenso, limitado, de que os osteoblastos são caracterizados fenotipicamente pela ausência de marcadores hemopoéticos, ou seja, não expressam marcadores de linhagem hemopoética, Lin^-, não expressam Sca-1 e expressam osteopontina (OPN) (MAYACK; WAGERS, 2008). Recentes estudos demonstraram que o estágio de maturação do osteoblasto influencia na função das CTH. Osteoblastos imaturos que expressam Runx2, CD44, CD90, CD166 (ALCAM) e baixos níveis de OC foram capazes de aumentar o potencial das CTH em repovoar a medula óssea de camundongos irradiados, quando comparados às células de camundongos que não expressam CD166 (ALCAM) e expressam osteocalcina (OC) (CHITTETI et al., 2013).

A comunicação celular entre osteoblasto e CTH ocorre por meio da interação entre ligantes celulares ou por fatores solúveis produzidos pelos osteoblastos que se ligam a receptores nas CTH. Há vários mediadores descritos que regulam o destino das CTH, entre estes, OPN/CD44, angiopoetina/Tie-2, SDF-1(CXCL12)/CXCR4, SCF/c-kit, Jagged/Notch, Wnt, N-caderina/N-caderina e outros possíveis mecanismos.

Osteoblastos produzem e secretam OPN a qual interage com o receptor CD44 presente nas CTH. Estudos com camundongos *OPN*$^{-/-}$ sugerem que tal proteína seja um regulador negativo do *pool* de CTH, uma vez que animais *OPN*$^{-/-}$ apresentaram maior porcentagem de CTH (4,11%) quando comparados ao grupo *OPN*$^{+/+}$ (0,93%), caracterizados imunofenotipicamente como $Sca1^+$/c-Kit^+ (STIER et al., 2005).

CD44 é uma glicoproteína transmembrânica de 80 a 95kD expressa em diferentes tipos celulares. A expressão do antígeno CD44 é relatada em células T, células B, monócitos, granulócitos, eritrócitos e mais fracamente em plaquetas. Outros tipos de células positivas ao antígeno CD44 incluem as células epiteliais,

células gliais, fibroblastos e miócitos. O antígeno é um receptor de superfície de célula para ácido hialurônico, colágeno e osteopontina que participa da proliferação, adesão, migração, sobrevivência e apoptose (THORNE et al., 2004). O *splicing* alternativo do gene CD44 resulta na geração de várias isoformas, que são classificadas em CD44 padrão ou isoformas variantes CD44v de acordo com a presença ou ausência de sequências codificadas pelos exões variantes (LYNCH, 2004). A expressão aumentada do antígeno CD44 é encontrada em alguns tumores e relata-se que a transição das linhas celulares de tumor de não metastáticas para metastáticas pode ser associada com mudanças na expressão das variantes do antígeno CD44 (JORDAN et al., 2015).

Outra via de sinalização que mantém a quiescência das CTH é mediada pela interação entre angiopoietina 1 (Ang1), produzida por osteoblastos, e o receptor Tie2, presente nas CTH. A ativação dos receptores do tipo tirosina quinase Tie2 mantém as CTH no nicho hemopoético e impede divisões celulares (ARAI et al., 2005).

Em paralelo aos fatores produzidos pelas CTH, a interação celular também contribui para a regulação CTH-nicho endosteal, destacando-se as caderinas, importantes para a localização e o *homing*. Caderinas são moléculas transmembrânicas, dependentes de cálcio e mediadoras da adesão celular que desempenham papel central na manutenção da arquitetura tecidual. Ainda não há consenso se a expressão dessa proteína é essencial para adesão e sinalização entre a CTH e o osteoblasto. Alguns estudos reportam que o receptor de N-caderina não é expresso em LT-CTH (KIEL et al., 2007). Entretanto, mais recentemente, outro estudo utilizando camundongos *knockout* para N-caderina demonstrou que as CTH que não apresentam este receptor tinham redução da ancoragem à região endosteal, com comprometimento da enxertia (HOSOKAWA et al., 2010). As caudas citoplasmáticas, altamente conservadas, interagem por meio de um grupo de proteínas de ancoramento intracelular denominadas cateninas. As mais conhecidas são α-catenina, β-catenina e p120-catenina. A interação caderina-catenina é essencial para a eficiente adesão celular. A β-catenina também participa da transdução de sinal via Wnt que controla vários processos biológicos, incluindo migração e adesão celular. Alterações em genes que controlam a síntese de membros desta via estão associadas à transformação em várias neoplasias, incluindo as leucemias. As proteínas Wnt são ligantes dos receptores *frizzled*

presentes nas células-tronco progenitoras hemopoéticas (CTH). Na ausência de sinais Wnt, a catenina citoplasmática é direcionada para degradação pelo proteossomo. Quando ligantes Wnt sinalizam, a degradação de catenina é inibida e seu acúmulo no citoplasma induz sua translocação para o núcleo, onde forma um complexo com o fator de transcrição de célula T (TCF). Como consequência, inicia-se a transcrição de genes importantes no controle da proliferação e autorrenovação, como ciclina D1 e myc. Vias alternativas ativadas por Wnt são reguladas de forma independente de β-catenina. A via Wnt está envolvida na geração e expansão das CTH. Em camundongos com ativação prolongada da sinalização Wnt/β-catenina foi verificado um aumento de LT-CTH, mas com falhas na diferenciação e na capacidade de regeneração do sistema hemopoético. Entretanto, a via de sinalização Wnt também pode ser ativada de forma β-catenina independente e é conhecida como via não-canônica (JEANNET et al., 2008).

Outra via de interação osteoblasto-CTH é a partir da sinalização via Notch, uma proteína da superfamília das imunoglobulinas. A sinalização pelo receptor Notch ocorre na dependência de contato célula-célula. O receptor Notch é ativado por ligantes, tais como delta e Jagged que ao interagirem com Notch, ativam sinalizações importantes na linfopoese. Jagged-1 está presente nos osteoblastos. Uma vez ocorrendo interação entre os receptores, uma série de clivagens do receptor Notch resulta na liberação de seu domínio intracelular (Notch ICD), que é imediatamente translocado para o núcleo. No núcleo, Notch ICD liga-se a CSL (CBF1 em humanos e RBPJ em camundongos), um fator de transcrição, convertendo-o de repressor a ativador transcripcional (WEBER; CALVI, 2010). De fato, diversos estudos associam a sinalização de Notch à auto-renovação/expansão das CTH. Em um dos estudos, a estimulação com o hormônio paratireoidiano (PTH) resultou na superexpressão de Jagged-1 nos osteoblastos e no concomitante aumento de CTH devido à estimulação da via de Notch (CALVI et al., 2003).

Vários fatores solúveis e moléculas de adesão regulam a interação das CTH com o nicho endosteal, o que determina sua migração, mobilização ou quiescência. Um dos fatores envolvidos é o CXCL12 (fator derivado de célula de estroma-1, SDF1), expresso constitutivamente em várias células da medula óssea, incluindo osteoblastos e células endoteliais. Devido a injúrias ou agentes quimioterápicos, CXCL12 induz motilidade, quimiotaxia, adesão celular, secreção de metaloproteinases e fatores angiogênicos nas células que expressam o seu ligante,

CXCR4, tais como as CTH. Camundongos *knockout* para CXCR4 apresentaram número reduzido de CTH e prejuízo na diferenciação de células mieloides (SUGIYAMA et al., 2006).

Há, ainda, fatores que atuam especificamente nos osteoblastos, resultando em efeitos no *pool* de CTH. É o caso da superexpressão de receptores de PTH, que resulta em aumento do número de trabéculas ósseas e no número de CTH (CALVI et al., 2003); ou, ainda, a perda de expressão de receptores da proteína morfogênica óssea (BMP) que causa aumento do número de osteoblastos e concomitante aumento do número de CTH (ZHANG et al., 2003).

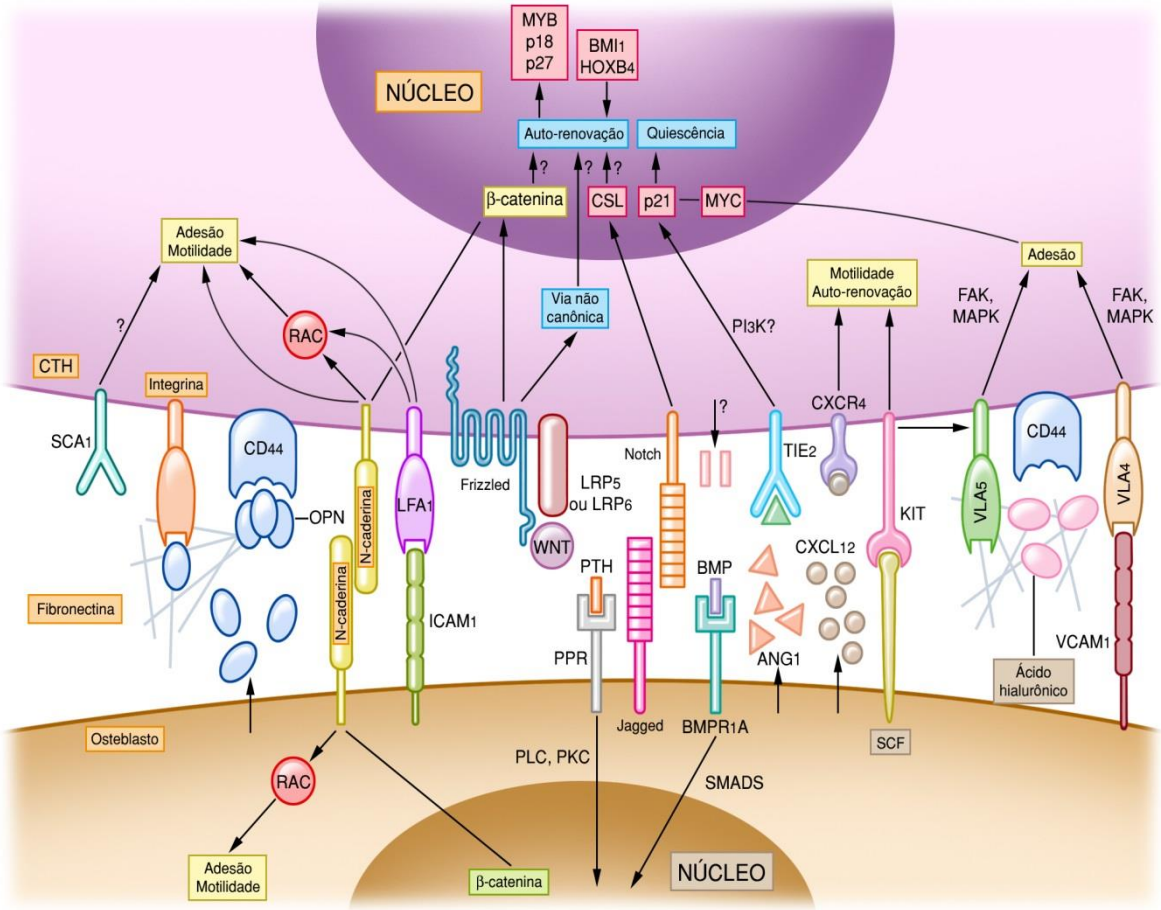


Figura 2 - Diagrama esquemático das interações entre CTH e osteoblasto. Estas interações podem ser do tipo ligante-receptor e moléculas de adesão. Células-tronco hemopoéticas (CTH), angiopoietina-1 (ANG1); (BMI1), repressor polycomb; BMP, proteína morfogenética óssea; receptor de proteína BMP (BMPR1A), fatores de transcrição (CSL, p21, MYC, MYB, p18, p27, BMI1, HOXB4), antígeno de função linfocitária (LAG1); CXCL12 (ligante de CXCL 12), receptor de CXCR4 (CXCR4), quinase de adesão focal (FAK), proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), integrina de adesão celular (ICAM-1); antígeno associado à função de linfócitos (LFA-1), proteína de baixa densidade da lipoproteína - relacionadas ao receptor LRP, osteopontina (OPN), fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K), fosfolipase C (PLC), proteína quinase C (PKC), hormônio da paratireoide (PTH), receptor de PTH, ligante de SCF (c-KIT), fator estimulante de célula-tronco (SCF) e receptor de tirosina quinase 2 (TIE2), receptores de fibronectina (VLA4 e VLA5). "?"' denota moléculas e/ou interações que apresentam apenas uma evidência indireta ou contraditória. Adaptado de WILSON e TRUMP, 2006.

1.4 Desnutrição e hemopoese

Deficiências de macro e micronutrientes afetam a produção de células sanguíneas uma vez que o tecido hemopoético tem alta taxa de renovação celular. A DPE promove alterações nos órgãos linfo hemopoéticos, tais como involução do timo, baço e linfonodo (XAVIER et al., 2007).

A DPE está associada ao aumento de suscetibilidade à infecção. A desnutrição em crianças compromete o desenvolvimento tímico e, consequentemente, a resposta imune com presença de linfopenia no sangue periférico (BHUTTA e SALAM, 2002). Em relação à função dos linfócitos T, a DPE compromete a produção de citocinas e a capacidade dos linfócitos de responder adequadamente à citocinas (RODRIGUEZ et al., 2005). González-Torres e colaboradores demonstraram que linfócitos de crianças desnutridas expressam menor quantidade de IL-2, IL-18 e IL-21 e diminuição das concentrações de INF-γ, o que contribui para a incapacidade de “resolver” infecções (GONZÁLEZ-TORRES et al., 2013). Macrófagos de camundongos desnutridos são menos suceptíveis à ativação por lipopolissacarídeo (LPS), em parte devido à diminuição da translocação de NF-κB. A capacidade de fagocitose, produção de citocinas e espécies retivas de oxigênio está prejudicada (SHEN et al, 2009).

A carência proteica também afeta diretamente a produção de cortisol, que regula a mobilização e migração de células sanguíneas da medula óssea para o sangue periférico e para o foco inflamatório. Altos níveis séricos de glicocorticoides inibem a expressão de moléculas de adesão em leucócitos, diminuem a permeabilidade vascular e comprometem a transmigração de leucócitos para o foco inflamatório (BARJA-FIDALGO et al., 2003).

Estudos do nosso grupo evidenciaram, em modelo murino de DP, alterações nas contagens periféricas do sangue, entre estas: diminuição do número de hemácias, diminuição das concentrações de hemoglobina, diminuição do número de reticulócitos e leucopenia com linfopenia (BORELLI et al., 1995, 2007).

Quanto às alterações nas células da MO, verificou-se que animais desnutridos apresentavam hipoplasia medular com redução na porcentagem de células que expressam os marcadores CD45, CD19, CD22, CD3 e CD5. Entretanto, estes animais expressavam maior porcentagem de células CD5 na fase do G0 quando comparados aos animais do grupo controle (FOCK et al., 2007). Os animais em DPE também apresentaram redução no número de células de unidades granulo-monocíticas (GM-CFU), redução no número de unidades de formação expansiva eritroide (BFU-E) e unidade de formação de colônia eritroide (CFU-E), além das células da MO e do baço expressarem menor quantidade dos marcadores CD45, CD117, CD119 e CD7, evidenciando diminuição dos progenitores eritroides (BORELLI et al., 2007).

Verificou-se que, além das alterações quantitativas do sangue periférico e da medula óssea, os animais desnutridos também apresentavam alterações histológicas da matriz extracelular (MEC) (XAVIER et al., 2007). A MEC da MO é formada por um conjunto de moléculas que interagem entre si e com moléculas da superfície celular, o que permite a regulação do desenvolvimento e funcionamento celular. A MEC é composta de colágenos, glicoproteínas não colagênicas, proteoglicanos, glicosaminoglicanos, elastina e ácido hialurônico. Os componentes da MEC são produzidos pelas células estromais, principalmente os fibroblastos. Além de terem a função de suporte físico para os elementos celulares, os componentes da MEC podem controlar diferentes processos biológicos, tais como adesão, migração e proliferação celular. Estudos *in vitro* demonstraram que o depósito de fibronectina, colágeno tipo IV e laminina é abundante ao redor dos sinusoides capilares. A fibronectina induziu a proliferação de células-tronco de camundongos com consequente aumento da produção de megacariócitos quando comparada à MO tratada com trombopoetina. Entretanto, o tratamento com fibronectina resultou em menor ploidia dos megacariócitos (MALARA et al., 2014).

Em relação à DPE, Vituri e colaboradores encontraram alterações na proporção de proteínas, especialmente de fibronectina, trombospondina e laminina, na MEC da MO de camundongos desnutridos, situação que poderia contribuir para a hipoplasia observada (VITURI et al., 2000). A partir da caracterização imunohistoquímica e ultraestrutural da medula óssea esternal (XAVIER et al., 2007), evidenciou-se aumento na deposição de fibronectina especialmente em sítios endostais e paratrabeculares (regiões de fixação de células-tronco hemopoéticas), aumento na deposição de laminina, particularmente em regiões perisinusoidais (região do nicho vascular de células-tronco hemopoéticas), além da perda da relação topográfica entre as células.

Desta forma, as alterações na composição da MEC podem comprometer a migração celular e consequentemente interferir na proliferação, diferenciação, formação de nichos celulares e liberação das células para a corrente circulatória.

Recentemente, Nakajima e colaboradores demonstraram que a DP também promove alterações no ciclo celular, com diminuição da progressão do ciclo celular e com maior porcentagem de células-tronco (LSK) na fase G0-G1 do ciclo (BORELLI et al., 2009; NAKAJIMA et al., 2014).

1.5 Tecido ósseo

1.5.1 Tipos celulares

Classicamente, as principais funções dos ossos são: movimento (como local de ancoragem e transferência de forças para os músculos), proteção de órgãos e reserva de íons. Entretanto, outras funções têm sido atribuídas a este tecido, evidenciado sua função endócrina. Entre estas novas funções estão a da participação dos osteoblastos na regulação do número de células-tronco hemopoéticas (CTH) (CALVI, 2003; ZHANG, 2003) e a secreção de osteocalcina pelos osteoblastos que regula a produção de insulina pelo pâncreas (CLEMENS e KARSENTY, 2011).

O tecido ósseo é um tecido mineralizado de natureza conjuntiva, composto por células (osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) e matriz óssea de natureza orgânica e inorgânica. A matriz orgânica (35%) contém fibras colágenas, principalmente, tipo I (90%), proteoglicanos ricos em condroitinsulfato, queratansulfato e ácido hialurônico; e proteínas não colágênicas; osteopontina (OPN), osteocalcina (OC), osteonectina (ON), albumina e proteínas ósseas não morfogenéticas (BMPs). A matriz inorgânica é constituída de íons fosfato, cálcio e, em menor quantidade, por bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato. A ligação do fosfato e do cálcio forma cristais com estrutura de hidroxiapatita $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ que, associada às fibras de colágeno, fornecem a resistência e a dureza características do tecido ósseo (BOSKEY; COLEMAN, 2013).

A microestrutura do tecido ósseo pode ser porosa, denominada osso trabecular, ou compacta, denominada osso cortical. O osso trabecular é composto de trabéculas cujo formato varia entre bastonetes e placas e possui uma grande área superficial. Este tipo de microestrutura é encontrado formando a maior parte da estrutura dos ossos curtos, chatos e irregulares, como os do crânio, da mandíbula, das costelas, do esterno e nas extremidades dos ossos longos e protegida por uma camada de osso cortical. Entre as trabéculas, existem espaços preenchidos por vasos sanguíneos e pela medula óssea. As superfícies internas e externas dos ossos são recobertas por células osteogênicas e tecido conjuntivo, que constituem

o endósteo e o periósteo, respectivamente. No osso cortical, praticamente não há espaços medulares, existindo, no entanto, um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos denominados canais de Volkmann e canais de Havers. Os canais de Volkmann partem da superfície do osso (interna ou externa), possuindo uma trajetória perpendicular em relação ao eixo maior do osso. Esses canais se comunicam com os canais de Havers, que percorrem o osso longitudinalmente e que podem comunicar-se por projeções laterais (**Figura 3**).

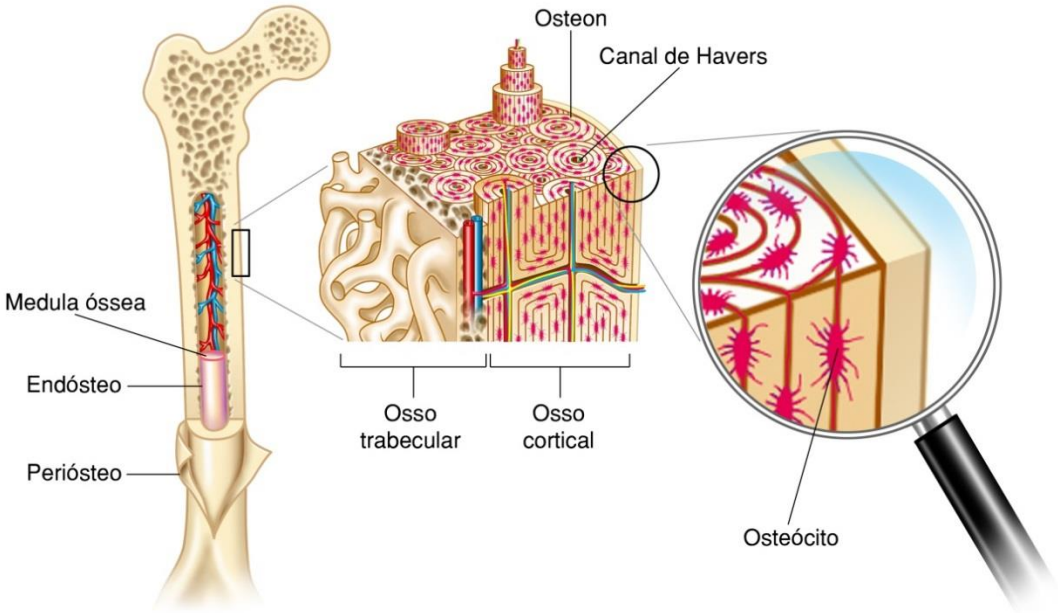


Figura 3 - Principais regiões do fêmur e microestrutura óssea: periósteo, endósteo e medula óssea. A microestrutura do tecido ósseo pode ser porosa (osso trabecular) ou compacta (osso cortical). Cada ósteon é estruturado na forma de camadas concêntricas de lamelas ósseas densas que cercam o canal de Havers. No centro de cada canal, há um feixe vásculo-nervoso e nas lamelas densas estão situados os osteócitos. Adaptado de MENG BAO et al., 2013.

A osteogênese resulta de uma complexa cascata de sinalização que envolve a proliferação de células-tronco mesenquimais (CTM), a diferenciação em células progenitoras osteogênicas, a maturação dos osteoblastos, a formação de matriz óssea e, finalmente, a mineralização (JUSTESEN et al., 2002). Três tipos celulares são importantes para a formação dos ossos: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos são derivados de células osteoprogenitoras (células-tronco mesenquimais diferenciadas), que apresentam formato fusiforme e podem ser encontradas nas superfícies do endósteo e periósteo. Ao receberem estímulos

específicos, originam pré-osteoblastos que amadurecem a osteoblastos maduros e, ao final do processo, em osteócitos (**Figura 4**).

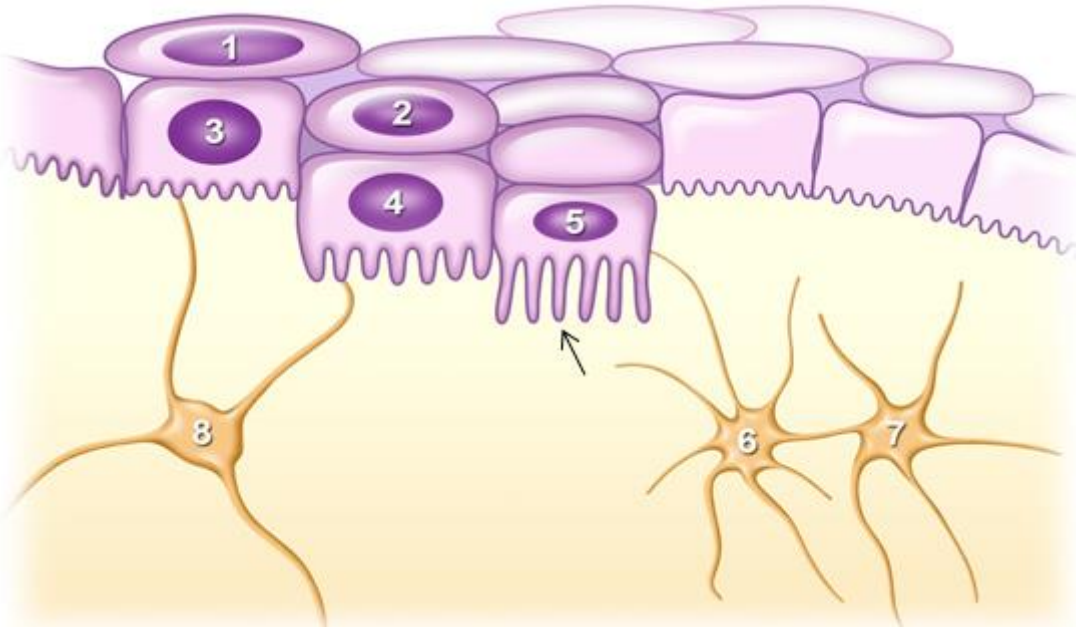


Figura 4 - Diferentes tipos celulares do tecido ósseo: (1) pré-osteoblasto, (2) pré-osteoblasto em transição para osteoblasto, (3) osteoblasto, (4) osteoblasto em transição para osteócito (pré-osteócito tipo I), (5) pré-osteócito tipo II, (6) pré-osteócito tipo III, (7) osteócito jovem, (8) osteócito maduro. A seta indica os prolongamentos citoplasmáticos nos osteócitos que permitem a comunicação com os osteoblastos. Adaptado de FRANZ-ODENDALL et al., 2006.

Os osteoblastos exercem papel central na formação óssea e estão aderidos à superfície da matriz óssea. Estas células também podem permanecer como células de reserva na matriz da superfície óssea, em estado de menor síntese proteica, e são denominadas *bone lining cells*. Os pré-osteoblastos e osteoblastos em diferentes estágios de maturação estão presentes na região endostal, em contato direto com a matriz óssea e o estroma medular. Quando ativos, apresentam grande atividade de síntese na matriz óssea, expressando morfologia cuboide, citoplasma intensamente basofílico e núcleo excêntrico. Durante o processo de diferenciação, expressam as proteínas colágeno I, osteopontina, osteocalcina e osteonectina, além da expressão da enzima fosfatase alcalina, cuja atividade contribui para o início da mineralização e o progressivo aumento dos cristais de hidroxiapatita. A expressão dessas proteínas ocorre em períodos distintos e será discutida posteriormente.

À medida que os osteoblastos sintetizam a matriz óssea, cerca de 10% a 20% são revestidos pela própria matriz que secreta e torna-se osteócito. Dessa forma, os

osteócitos são encontrados por toda a matriz extracelular calcificada dentro de lacunas denominadas osteoplastos que têm acesso a nutrientes e gases por canalículos formados por processos celulares dos próprios osteócitos.

Os osteoclastos são células gigantes e multinucleadas (4 a 20 núcleos), formados a partir da diferenciação da célula progenitora hemopoética. A osteoclastogênese pode ser separada em quatro etapas fundamentais: comprometimento da CTH em linhagem osteoclástica, diferenciação dos pré-monócitos em precursores osteoclásticos, fusão intracelular dos precursores osteoclásticos e reabsorção óssea. A ativação dos fatores de transcrição PU.1 (fator de transcrição da família ETS específico para monócitos e linfócitos B) e do complexo Mitf/Tfe3 (fator de transcrição associado à microftalmia/ fator de transcrição E3) favorece a diferenciação da célula progenitora hemopoética em pré-monócitos e também induz a expressão do receptor de M-CSF (M-CSFR) nestas células (MELLIS et al., 2011). A ligação de M-CSF ao seu receptor ativa uma cascata de sinalização via ERK/Grb-2 (quinase regulada por sinal extracelular/proteína 2 ligada ao receptor de fator de crescimento) e Akt/PI3K (proteína quinase B /fosfatidilinositol-3-fosfato), que regulam proliferação, diferenciação e sobrevivência das células progenitoras de osteoclastos (TANAKA et al.,2006). O efeito mais precoce do M-CSF é promover a expressão de RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa B) nas células precursoras de osteoclastos, o que permite a estas células responderem ao ligante de RANK (RANKL) (BOYCE et al., 2012). A ativação dos receptores RANK por RANKL em células progenitoras de osteoclastos leva ao recrutamento da molécula adaptadora – TRAF6 (fator 6 associado ao receptor TNF). Na sequência, TRAF6 ativa múltiplas vias de sinalização intracelulares, entre estas NF-kB, JNK, c-Myc e Src (BOYLE et al., 2003). A via do NF-kB recruta RelA/p50 (proteína que favorece a ativação de NF-κB) ao se ligar ao promotor de NFATc1 (fator nuclear c1 ativador de células T), sendo este um fator primordial para a diferenciação osteoclástica. NFATc1 induz a transcrição de genes específicos à osteoclastogênese, que codificam TRAP (fosfatase ácida-tartarato resistente), integrina β3 e catepsina K (ASAGIRI et al., 2005). Na sequência, ocorre a fusão intracelular dos precursores de osteoclastos pela ativação de DC-STAMP (proteína transmembrana específica de célula dendrítica), ATP6V0D2 (isoforma da subunidade d na V-ATPase) e CD9 (MELLIS et al., 2011) (**Figura 5**).

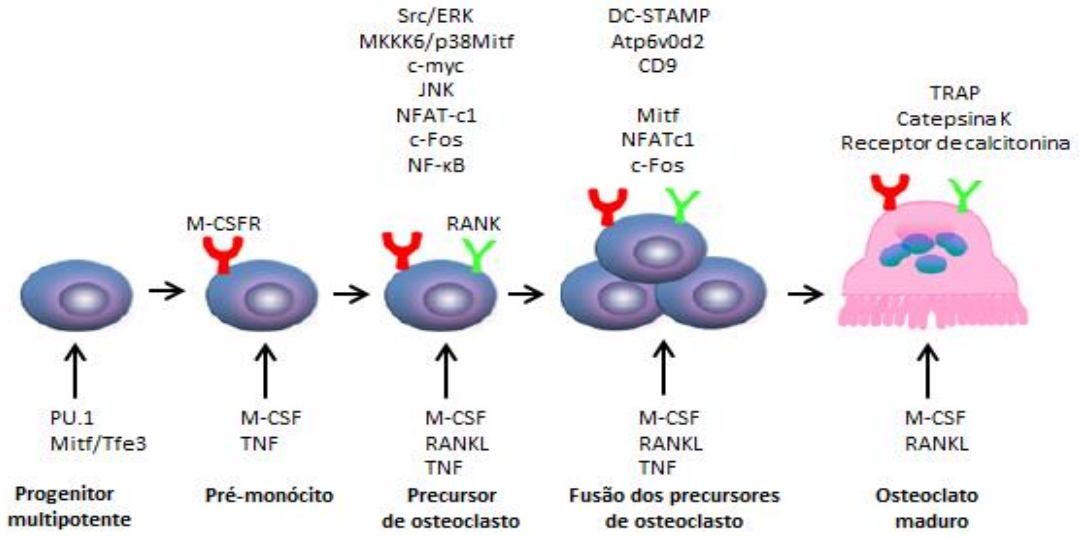


Figura 5 - Osteoclastogênese. O primeiro requisito para diferenciação de células progenitoras mieloides em precursores de osteoclastos é a expressão de PU.1 e MITF, que induzem a expressão de M-CSFR, o receptor de M-CSF. M-CSF induz a expressão de RANK nessas células, o que permite a ligação a RANKL TNF também induz a expressão de RANK, o que induz a expressão de fatores de transcrição que favorecem a diferenciação de células que expressam RANK. Estes incluem o NF-kB, c-Fos, e NFATc1. Eles induzem a expressão de várias proteínas envolvidas na ativação dos osteoclastos, incluindo TRAP, catepsina K, e o receptor de calcitonina. RANKL e TNF também induzem a ativação de c-myc, o que promove ainda mais a proliferação destas células, bem como MAP quinase/quinase 6 (MKK6), p38, e MITF, juntamente com Src e Erk, que tem múltiplos efeitos na ativação e sobrevivência dos osteoclastos. Adaptado de BOYCE, 2013.

Os osteoclastos são mantidos na MO pela ação de citocinas, tais como o fator derivado de estroma 1 (SDF-1). Este efeito pode ser modulado pelo fator de necrose tumoral (TNF), que inibe a produção de SDF-1 pelas células da MO, permitindo a mobilização de osteoclastos para o sangue periférico, em condições inflamatórias (ZHANG et al., 2008). O esfingolipídio bioativo, esfingosina-1 fosfato (S1P) secretado por hemácias e plaquetas, também favorece a migração de osteoclastos para o sangue periférico.

Finalmente, os osteoclastos, em contato com a superfície óssea mineralizada, realizam o processo de reabsorção óssea. Essas células apresentam borda em escova e aderem ao tecido ósseo, criando um compartimento extracelular fechado. Neste compartimento há íons de hidrogênio que são produzidos pela ação de bombas de prótons presentes na borda em escova, o que acarreta diminuição do pH local. Esta diminuição de pH favorece a atividade de enzimas lisossomais (proteinases e fosfatases) e não-lisossomais (metaloproteinases) secretadas pelos

osteoclastos, que degradam os cristais de hidroxiapatita e expõem a matriz orgânica (MIYAMOTO, 2011).

1.5.2 Remodelação óssea

O tecido ósseo é constantemente renovado pelo acoplamento dos processos de formação e reabsorção óssea. O processo de remodelação é importante para o crescimento, reparo e a manutenção óssea, e ocorre pela ação das unidades multicelulares ósseas (BMU). Estas unidades são independentes e individuais, constituindo-se cada qual de osteoblastos e osteoclastos (**Figura 6**). Estes processos são estreitamente acoplados e ocorrem nas superfícies ósseas do periósteo e endósteo. Em condições fisiológicas, a formação e a reabsorção óssea devem ocorrer de maneira equilibrada, de forma que a mesma quantidade de osso reabsorvida seja renovada. Quando há maior atividade osteoclástica, ocorrem reabsorções patológicas que podem levar a alterações da arquitetura e ao comprometimento da função óssea, acarretando prejuízo da qualidade óssea.

Vários fatores que controlam a reabsorção óssea agem diretamente sobre os osteoblastos, tais como paratormônio (PTH), 1,25 dihidroxivitamina D3, esteroides sexuais, prostaglandinas, citocinas (interleucina-1, interleucina-6 e interleucina-11) e fator transformador de crescimento beta (TGF-β) (MARTIN, 2013). Receptores de PTH estão presentes nos osteoblastos e seus precursores. O PTH produz efeitos anabólicos e catabólicos sobre os ossos que dependem do perfil temporal de seu aumento (SILVA e BILEZIKIAN, 2015). Em situações patológicas em que há aumento contínuo das concentrações plasmáticas de PTH, como no hiperparatireoidismo primário ou secundário à deficiência de cálcio, o PTH aumenta a taxa de remodelação óssea. Entretanto, em situações em que há aumento intermitente de PTH, em baixas doses, são observados efeitos anabólicos deste hormônio sobre os ossos, como observado na utilização do peptídeo PTH (1-34) no tratamento da osteoporose (SILVA e BILEZIKIAN, 2015).

O PTH estimula a reabsorção óssea ao ligar-se aos seus receptores presentes nos osteoblatos, o que promove a ativação de RANK-ligante (RANKL) e inibição da síntese de osteoprotegerina (OPG), responsáveis pela diferenciação e

subsequente ativação de precursores osteoclásticos. (HUANG et al., 2004). A via RANKL/RANK/OPG é a principal via regulatória da diferenciação osteoclástica. RANKL é uma molécula de superfície da membrana pertencente à família dos receptores do TNF e essencial para a diferenciação de osteoclastos. A OPG é uma citocina liberada pelos osteoblastos que inibe a maturação e ativação dos osteoclastos, *in vivo e in vitro*. A OPG liga-se com grande afinidade ao RANKL nos osteoblastos, impedindo que este, por sua vez, se ligue ao RANK na superfície dos precursores osteoclásticos. A OPG inibe a reabsorção óssea produzida pelos osteoclastos maduros estimulados pelo RANKL. Portanto, a proporção entre RANKL e OPG é determinante para regular a atividade osteoclástica e reabsorção óssea (KOHLI e KOHLI, 2011).

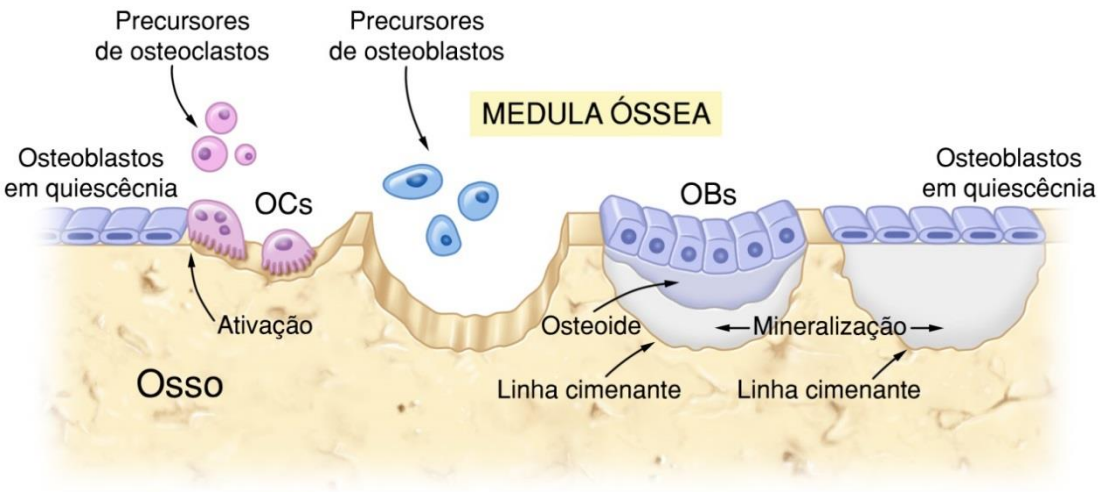


Figura 6 - Remodelação óssea. Os osteoclastos (OCs) aderem à superfície óssea e reabsorvem tecido ósseo. Após a reabsorção, os precursores de osteoblastos são recrutados, proliferam e diferenciam-se em osteoblastos (OBs) maduros. Estes produzem a matriz mineralizada do osso, finalizando o processo de remodelação. A quantidade de tecido ósseo formado é equivalente à reabsorvida. Adaptado de KEARNS e KALLMES, 2008.

1.5.3 Colágeno e proteínas não-colagênicas: osteopontina, osteocalcina e osteonectina

O colágeno é a principal classe de proteína fibrosa insolúvel encontrada na matriz extracelular e nos tecidos conectivos e cuja principal função é estrutural. A

molécula de colágeno é uma glicoproteína composta por três cadeias polipeptídicas helicoidais, cada uma com cerca de 1000 aminoácidos, denominadas cadeias α. As cadeias possuem aproximadamente um terço de glicina, além de prolina e lisina, que são hidroxiladas por processos enzimáticos dependentes da vitamina C.

As moléculas são secretadas pela célula, apresentando domínios globulares terminais, e são denominadas de procolágeno. Estas regiões globulares são clivadas em graus variados antes da agregação extracelular e originam o tropocolágeno. Os vários arranjos entre as cadeias polipeptídicas permitem a formação de pelo menos 27 tipos de colágenos. Os colágenos dos tipos I, II e III são os mais abundantes do organismo. O tipo I está presente na pele, tendão e osso; o tipo II, em cartilagem e humor vítreo; e o tipo III, na pele e músculos. Cerca de 90% da matriz extracelular óssea é constituída por colágeno tipo I, e os 10% restantes pelas demais proteínas não-colagênicas (ALLISTON, 2014).

Apesar do colágeno constituir a maior parte das proteínas da matriz óssea, as proteínas não-colagênicas, que representam aproximadamente 10% da matriz orgânica do osso, também exercem importantes funções na organização da matriz colagênica e na regulação da formação e do crescimento de cristais de hidroxiapatita. A maior parte das proteínas não-colagênicas atua como centro nucleador ou inibidor do crescimento dos cristais. As proteínas não-colagênicas regulam a mineralização das fibras de colágeno, modulam a divisão, migração, diferenciação e maturação das células ósseas. As principais proteínas não-colagênicas da matriz óssea são sintetizadas em diferentes estágios da diferenciação osteoblástica e regulam os processos de mineralização e de reabsorção óssea (ALLISTON, 2014).

A OPN é uma glicoproteína fosforilada e constitui cerca de 2% das proteínas não-colagênicas da matriz óssea, contém 5% de ácido siálico e uma extensão de nove resíduos consecutivos de ácido aspártico que permitem à molécula ligar-se à hidroxiapatita, tendo sido também descrita tanto na mineralização quanto na reabsorção óssea (SODEK et al., 2000). A molécula de OPN também apresenta uma sequência RGD (arginina – glicina – ácido aspártico), a qual permite sua ligação a uma variedade de células. A OPN tem afinidade por vários receptores celulares, incluindo CD44 e as integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ e $\alpha_v\beta_1$, e muitos desses sítios de ligação de integrinas reconhecem a sequência RGD (CHABAS, 2005). Também pode se ligar ao colágeno e à fibronectina presentes na matriz extracelular (ALFORD

e HANKENSON, 2006). Apesar de ter sido inicialmente identificada como proteína da matriz óssea, posteriormente observou-se que a OPN também está expressa em macrófagos, linfócitos B, T e NK. Além disso, a OPN está presente em tecidos e fluidos orgânicos e participa de vários processos que incluem inflamação, processos patológicos de proliferação celular de células neoplásicas e metástase (FISHER et al., 2001).

A OPN é sintetizada por pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos e, após ser secretada, é incorporada à matriz óssea. A presença de OPN também foi observada em superfícies ósseas onde estão aderidos os osteoclastos, sugerindo participação da OPN na ligação entre o osteoclasto e a matriz mineralizada. A abundância e distribuição de aspartato e resíduos de serina fosforilada permitem forte ligação com cristais de fosfato de cálcio em tecidos mineralizados, inibindo o crescimento dos cristais (HUNTER et al., 1996).

A grande quantidade de sítios fosforilados na molécula de OPN permite a dissipação de grandes quantidades de energia quando o osso está submetido à tensão e grandes quantidades de OPN foram observadas nas linhas cimentantes (FANTNER et al, 2007). A OPN também tem papel importante na resistência óssea a fraturas. Estudos demonstraram que camundongos *Opn* $^{-/-}$ apresentaram diminuição de 30% na resistência às fraturas quando comparados ao grupo selvagem, sugerindo papel importante da OPN na prevenção de propagação de fissuras. Esta diminuição não estava associada à perda de massa óssea ou mudanças na estrutura óssea (THURNER, et al. 2010).

Outra proteína não-colagênica que participa do processo de mineralização é a osteocalcina (OC). Ela é encontrada mais tardiamente no processo de diferenciação dos osteoblastos, sendo importante na progressão da mineralização e no controle da formação dos cristais de hidroxiapatita. A OPN interage com a OC na regulação da resistência óssea a fraturas, o que foi demonstrado a partir da utilização de animais *OC*$^{-/-}$, *OPN*$^{-/-}$ e *OC-OPN* $^{-/-}$; $^{-/-}$. OPN e OC interagem e a eliminação de uma ou de ambas conduz à perda de resistência óssea (POUNDARIK et al., 2012).

A osteonectina (ON) também conhecida como SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*) é a proteína não-colagênica mais abundante da matriz extracelular óssea, representando cerca de 25% das proteínas não-colagênicas. Estudos em camundongos deficientes em ON mostraram diminuição das unidades de remodelação com consequente desenvolvimento de osteopenia (DELANY et al.,

2000). Estudos *in vitro* indicaram que a ON se liga ao colágeno e à hidroxiapatita e pode regular a proliferação celular e a interação célula-matriz (YOUNG et al., 1992; LANE e SAGE, 1994). Em várias formas de osteopenia, tais como na osteogênese imperfeita e em distintos modelos animais de fragilidade óssea, a expressão de ON está diminuída (MURIEL, 1991).

2 OBJETIVOS

Considerando-se que a DP induz modificações no estroma celular e alterações na hemopoese, pretendemos, neste trabalho, avaliar os efeitos da DP no tecido ósseo e verificar a participação do nicho endosteal na sinalização osteoblasto-CTH em camundongos desnutridos. Nossa hipótese é de que, em DP há alterações no nicho endosteal da CTH que induzem a permanência das mesmas em quiescência.

Para atingir estes objetivos, nos propusemos:

(i) Induzir processo de DP em camundongos isogênicos, C57Bl/6J caracterizando o estado nutricional dos animais utilizando como parâmetros o consumo de ração e de água, monitoramento do peso corpóreo, a quantificação de proteínas totais e albumina sérica;

(ii) Avaliar as repercussões da DP no quadro hematológico dos camundongos utilizando como parâmetros o hemograma, a contagem de reticulócitos e o mielograma;

(iii) Quantificar as células LT-CTH da MO;

(iv) Avaliar o ciclo celular das células LT-CTH;

(v) Avaliar a expressão proteica, por citometria de fluxo, de CD44, Cxcr4 e Notch-1 e Tie-2 nas células LT-CTH;

(vi) Isolar as células LT-CTH por *FACS sorting*;

(vii) Avaliar a expressão gênica, por PCR em tempo real, de *CD44*, *CXCR4* e *NOTCH-1* nas células LT-CTH;

(viii) Avaliar as repercussões estruturais, histológicas e bioquímicas da DP no tecido ósseo utilizando como parâmetros as concentrações séricas de cálcio, fósforo e paratormônio (PTH);

(ix) Avaliar, *in vivo,* a densidade óssea e densidade medular óssea do fêmur dos animais por imagens de raio X;

(x) Avaliar, *ex vivo*, por microtomografia computadorizada (µCT), as alterações das regiões cortical e trabecular do fêmur;

(xi) Avaliar, por técnica de imunofluorescência, a expressão da proteína não-colagênica: osteopontina (OPN) em cortes histológicos do fêmur;

(xii) Avaliar, por técnica de imuno-histoquímica, a expressão de colágeno tipo I e das proteínas não-colagênicas: osteonectina (ON) e osteocalcina (OC) em cortes histológicos do fêmur;

(xiii) Quantificar, por técnica de citoquímica TRAP (fosfatase ácida- tartarato resistente), os osteoclastos nas regiões cortical e trabecular em cortes histológicos do fêmur;

(xiv) Isolar osteoblastos da cavidade femoral e caracterizá-los imunofenotipicamente, *ex vivo*, por citometria de fluxo e *in vitro* pela propriedade de mineralização óssea.

(xv) Avaliar a expressão proteica, por *Western Blotting* de colágeno tipo I, osteopontina (OPN), osterix, runx2, RANKL e osteoprotegerina (OPG) nos osteoblastos isolados;

(xvi) Avaliar a expressão gênica, por PCR em tempo real de colágeno tipo 1 (*COL1A2*), osterix (*SP7*), *CXCL12*, angiopoetina (*ANGPT1*), osteopontina (*SPP1*), jagged (*JAG2*) e N-caderina *(CDH2*) nos osteoblastos isolados;

(xvii) Estabelecer a cocultura de osteoblastos e células LSK e avaliar a proliferação das CTH utilizando ensaio de CFSE (carboxifluoresceína succinimidil ester).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram obtidos camundongos da linhagem C57BL/6J, machos, recém-desmamados de colônias do Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (protocolo CEUA n° 346) (em anexo).

3.2 Rações

Os animais recém-desmamados receberam ração de crescimento (17% de proteína) (**Tabela 1**) até completarem 60 dias de vida. Em seguida, foram separados aleatoriamente em gaioleiros individuais e passaram por um período de adaptação durante duas semanas no qual receberam ração controle ou normoproteica (12% de proteína). Após esse período, o grupo experimental passou a receber ração hipoproteica (2% de proteína) e o grupo controle continuou a receber ração controle (**Tabela 2**) (BORELLI et al., 2009). As rações foram preparadas em nosso laboratório na forma de “pellets” e conservadas a 4° C até o momento do uso. As rações controle e hipoproteica são isocalóricas e diferem apenas no conteúdo proteico. A fonte proteica foi caseína (LABYNTH®, Diadema, Brasil). Em relação ao conteúdo de vitaminas e sais minerais, observa-se que não há diferença nas quantidades fornecidas aos dois grupos e quanto à quantidade de fosfato nas rações, esta foi corrigida aumentando-se a quantidade de fosfato na mistura mineral oferecida ao grupo desnutrido, justamente para evitar-se a carência do mesmo uma vez que a quantidade de caseína utilizada foi de 2%. Desta forma, a adição de menor quantidade de caseína na ração hipoproteica diminuiu a quantidade

disponível de fosfato. Portanto, foram realizadas correções na composição da mistura salínica para remoção da diferença na concentração de fosfato (**Tabela 3**). A correção foi realizada adicionando-se maior quantidade de fosfato de potássio monobásico na ração hipoproteica, o que, por sua vez, provoca aumento na quantidade de potássio. Uma nova correção foi necessária e assim, o potássio da ração hipoproteica foi removido na forma de citrato de potássio. Caso a correção foi realizada com remoção do potássio na forma de sulfato de potássio haveria prejuízo da quantidade de sulfato na ração hipoproteica, interferindo diretamente na síntese proteica pelo organismoA concentração proteica da caseína e das rações foi determinada pelo método micro-Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) e realizada no laboratório de Bioquímica da Nutrição (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo).

Tabela 1 - Composição da ração de crescimento (AIN93G modificada)

Constituintes	Ração de crescimento
Proteínas (%)	17
Mistura salínica (g)*	3,5
Mistura vitamínica (g)**	1
Fibra (g)	5
Óleo de milho (g)	7
Sacarose (g)	10
L-cistina (g)	0,3
Bitartarato de colina (g)	0,24
Tert-butilhidroquinona (mg)	0,0014
Amido de milho (g)	100

* Vide tabela 3 ** Vide tabela 4

Tabela 2 - Composição das reações controle e hipoproteica (AIN93 modificada)

Constituintes	Ração controle	Ração hipoproteica
Proteínas (%)	12	2
Mistura salínica (g)*	3,5	3,5
Mistura vitamínica (g)**	1	1
Fibra (g)	1	1
Óleo de milho (g)	8	8
Sacarose (g)	10	10
L-metionina (g)	0,15	0,15
Bitartarato de colina (g)	0,25	0,25
Tert-butilhidroquinona (mg)	8	8
Amido de milho (g)	100	100

Rações isocalóricas de 1.716,3KJ/100g (BORELLI et al., 2009) * Vide tabela 3 ** Vide tabela 4

Tabela 3 - Composição da mistura salínica

Constituintes	Ração de crescimento (g/kg de MS)	Ração controle (g/kg de MS)	Ração hipoproteica (g/kg de MS)
Carbonato de cálcio anidro	357,00	357,00	357,00
Fosfato de potássio monobásico	96,58	258,00	262,45
Cloreto de sódio	74,00	74,00	74,00
Citrato de potássio	70,29	12,87	0
Sulfato de potássio	46,60	46,60	46,60
Óxido de magnésio	24,00	24,00	24,00
Citrato férrico	6,06	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65	1,65
Carbonato de manganês	0,63	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30	0,30
Iodato de potássio	0,01	0,01	0,01
Selenato de sódio anidro	0,01025	0,01025	0,01025
Paramolibdato de amônio tetrahidratado	0,00795	0,00795	0,00795
Meta-silicato de sódio monohidratado	1,45	1,45	1,45
Sulfato de potássio e crômio dodecahidratado	0,275	0,275	0,275
Cloreto de lítio	0,0174	0,0174	0,0174
Ácido bórico	0,0815	0,0815	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635	0,0635	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318	0,0318	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066	0,0066	0,0066
Sacarose	221,54	209,806	132,506

Composição das misturas salínicas (MS) utilizadas no preparo das rações controle e hipoproteica. Foram utilizados 175g da mistura salínica para cada 5kg de ração preparada. (REEVES, 1993)

Tabela 4 - Composição da mistura vitamínica

Constituintes	**Quantidade (g/kg de mistura vitamínica)**
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-HCl	0,70
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,60
Ácido fólico	0,2
D-biotina	0,02
Vitamina B12	2,50
Vitamina E	15,00
Vitamina A	0,80
Vitamina D3	0,25
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,655

Composição da mistura vitamínica utilizada no preparo das rações de crescimento, controle e hipoproteica (REEVES, 1993).

3.3 Indução do processo de desnutrição

Os animais recém-desmamados receberam ração de crescimento até completarem 60 dias de idade. Após esse período, os animais, previamente pesados, foram alocados individualmente em gaiolas (BORELLI et al, 1995, 1998, 2001, 2007), sendo mantidos sob temperatura ambiente (TA) de 22 a 25° C, ciclo de luz claro-escuro de 12 horas, umidade de 55 ± 10% e pesados a cada 48 horas. Durante período de adaptação, às condições do gaioleiro (duas semanas), todos os animais receberam ração controle contendo 12% de proteínas para, em seguida, serem separados em dois grupos: controle**,** que permaneceu recebendo a ração controle; e desnutrido, que passou a receber ração hipoproteica, contendo 2% de proteínas (Du et al., 2000, BORELLI et al, 1998, 2001, 2007). Ambos os grupos de animais tiveram livre acesso à água deionizada e às rações. Após cinco semanas sob esse regime alimentar, os animais de ambos os grupos foram submetidos a radiografias para análise óssea e, após a coleta de sangue, foram eutanasiados para obtenção das demais amostras biológicas e execução das análises (**Figura 7**).

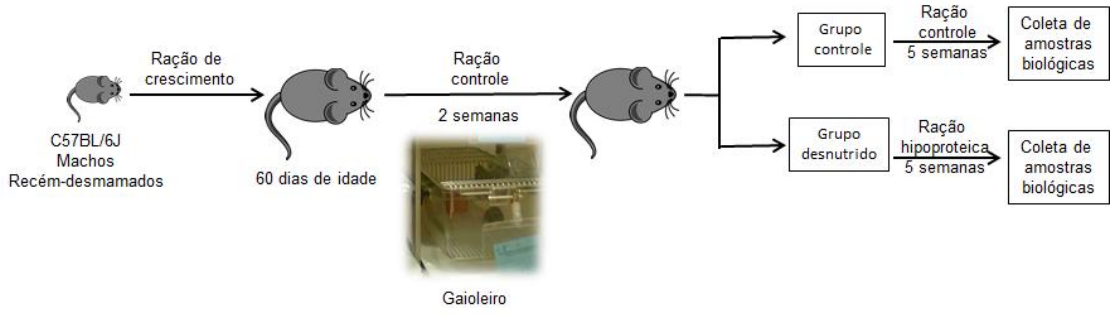


Figura 7 - Delineamento experimental durante as fases de crescimento e desnutrição dos animais.

3.4 Avaliação do estado nutricional dos animais

A avaliação do estado nutricional dos animais foi baseada na determinação do peso corporal, consumo de ração e de água a cada 48 horas e na análise dos seguintes parâmetros bioquímicos: concentração de proteínas totais e albumina séricas.

3.5 Obtenção das amostras sanguíneas

As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção do plexo axilar, em camundongos previamente anestesiados com 10mg/kg de peso de cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer, HealthCare Animal Health, Leverkusen, Alemanha) e 100mg/kg de peso de cloridrato de cetamina (Ketamina®, Cristália, São Paulo, Brasil) e colhidas com e sem anticoagulante. O sangue foi centrifugado 3000rpm durante 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras de soro foram utilizadas para as dosagens de proteínas totais, albumina sérica, cálcio e fosfato, e as amostras sanguíneas coletadas com o anticoagulante EDTA 10% foram utilizadas para a realização do hemograma e contagem de reticulócitos.

3.6 Avaliação das concentrações séricas de albumina e proteínas

A determinação de proteínas totais e albumina foi realizada em duplicata utilizando-se *kits* comerciais Labtest® (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) seguindo as orientações do fabricante e as leituras realizadas em espectrofotômetro modelo Varioskan Flash® (Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia).

3.7 Hemograma e contagem de reticulócitos

A partir do sangue colhido com EDTA, foi realizado o hemograma no equipamento ABC Vet® (ABX Diagnostics, Horiba, Kioto, Japão), utilizando-se controles comerciais para a validação do processo. A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas coradas com May-Grunwald-Giemsa, modificado por Rosenfeld, e a leitura realizada em microscópio óptico utilizando ocular de 10x e objetiva de 100x em microscópio modelo Eclipse 80i, (Nikon, Tóquio, Japão).

Para a contagem dos reticulócitos, o sangue foi imediatamente processado, sendo corado com corante supravital azul de cresil brilhante, e os reticulócitos contados em 10 campos contendo cerca de 200 hemácias cada um, nas extensões preparadas no prazo máximo de 30 minutos após a coleta (BRECHER, 1949). As contagens foram realizadas com ocular de 10x e objetiva de 100x em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

3.8 Caracterização da hipoplasia medular e contagem diferencial das células da medula óssea (MO)

As células da MO foram obtidas por meio de lavagem da cavidade medular com meio Iscove´s® (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). A suspensão celular foi mantida

imersa em gelo até a realização de lâminas por citocentrifugação (Incibrás, São Paulo, Brasil), sendo estas coradas pelo corante de May-Grünwald-Giemsa, modificado por Rosenfeld. A contagem total de células foi realizada em hemocitômetro de Neubauer após diluição de amostras da suspensão celular com líquido de Turk. Para a análise das diferentes populações celulares, foram contadas, no mínimo, 300 células/animal utilizando ocular de 10x e objetiva de 100x em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

3.9 Quantificação das células LT-CTH da medula óssea

Os fêmures dos animais, previamente anestesiados e eutanasiados, de ambos os grupos, foram removidos cirurgicamente e a camada muscular removida com auxílio de bisturi. O canal medular foi exposto e a cavidade lavada com 4mL de meio Iscove's contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). A suspensão celular foi homogeneizada, lavada com meio Iscove's com 10% SFB e centrifugada a 300g durante 10 minutos a 4º C. Em seguida, 10^7 células/mL foram fixadas em PBS contendo 2% paraformaldeído durante 30 minutos à TA, lavadas com 1mL de tampão PBS contendo 0,5% BSA e marcadas com o "cocktail" de anticorpos que reagem com as células da linhagem hemopoética contendo CD5, CD45R, CD11b, anti-Gr-1, Ly-6G/C e Ter-119 conjugados à biotina, durante 20 minutos à TA e ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1 mL de tampão PBS, centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos. Em seguida, 10^6 células foram incubadas com anticopos antibiotina conjugado ao fluorocromo APC (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, Califórnia, EUA), anti-Sca-1 (D7) (PE-Cy-7) (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA), anti-c-Kit (2B8) (Percp-Cy5.5) (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA), anti-CD90.1 (OX-7) (APC-Cy7) (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) e anti-Flk-2 (A2F10.1) (PE-594) (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) durante 20 minutos à TA e ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1mL de tampão PBS, centrifugadas a 1500 rpm durante 5min e ressuspensas em 400µL de PBS. As células foram adquiridas em citômetro de fluxo FACSAria III® (Becton Dickinson, San

Jose, CA, USA) e as análises, realizadas em aplicativo FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA).

3.10 Avaliação, *ex vivo*, do ciclo celular das células-tronco hemopoéticas (CTH) da medula óssea (MO)

Um total de 10^7 células da MO foi fixado em PBS contendo 2% paraformaldeído durante 30 minutos à TA. Em seguida, as células foram permeabilizadas com saponina a 0,01%, tratadas com 1 mg/ml de RNase durante 45 minutos a 37º C e incubadas com 0,25µM de Sytox Green® (Life Technologies). Finalmente, os anticorpos descritos no item 3.9 foram adicionados para identificação das subpopulações celulares. Após a incubação; 10^6 células foram adquiridas e em citômetro de FACS Aria III® (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) e as análises, realizadas em aplicativo FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA).

3.11 Avaliação da expressão proteica de CD44, CXCR4, Tie-2 e Notch-1 por citometria de fluxo

Procedeu-se como descrito no item 3.9; entretanto, juntamente com os anticorpos para a identificação das subpopulações de CTH, foram adicionados individualmente os anticorpos CD44 (A95-1) (FITC) (BD Pharmingen, San Diego, EUA), Notch-1 (mN1A) (PE) (eBioscience, San Diego, EUA), CXCR4 (2B11) (PE) (eBioscience, San Diego, EUA) e Tie-2 (TEK) (PE) (Biolegend, San Diego, EUA). Após a incubação, as células foram adquiridas em citômetro de FACS Aria III® (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) e as análises, realizadas em aplicativo FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA).

3.12 Ensaio de separação celular em citômetro de fluxo (*fluorescense activated cell sorting*)

A separação celular foi realizada em FACS Aria III® (BD Biosciences, San Jose, Califórnia, EUA) do laboratório multiusuário do Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular da Escola Paulista de Medicina, com o auxílio técnico do professor Dr. Edgar Paredes-Gamero e do aluno de doutorado Marcus Vinícius Buri. Antes de cada experimento, microesferas CST *Cytometer Setup and Tracking* foram utilizadas para a estabilidade dos tubos fotomultiplicadores. A compensação foi realizada antes de cada experimento de separação com microesferas recobertas com o respectivo anticorpo a ser pesquisado. Em seguida, o fluxo contínuo do tampão de separação foi ligado e a frequência e amplitude da gota foram estabelecidas. O *nozzle* utilizado foi o de 85µm. As células foram recuperadas em meio Iscove's contendo 10% SFB. O ensaio de separação celular foi utilizado para a obtenção das células LSK com a finalidade de utilizá-las em ensaio de cocultura em células MC3T3 e também para a obtenção das células LT-CTH, a partir das quais foi obtido RNAm.

3.12.1 Separação das células LSK

Foram utilizados os procedimentos técnicos descritos no item 3.26, entretanto, as células foram marcadas com o *cocktail* de anticorpos que reagem com as células da linhagem hemopoética contendo CD5, CD45R, CD11b, anti-Gr-1, Ly-6G/C e Ter-119 conjugados à biotina, durante 20 minutos a TA e ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1mL de tampão PBS, centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpos antibiotina conjugados ao fluorocromo APC (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, Califórnia, EUA), anti-Sca-1 (D7) (PE-Cy-7) (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) e anti- c-Kit (2B8) (Percp-Cy5.5) (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) durante 20 minutos à TA e ao abrigo da luz. As células foram lavadas com 1mL de tampão PBS,

centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 600µL de PBS e aquiridas. As células LSK separadas foram coletadas em tubo do tipo Eppendorff contendo 500µL de meio Iscove's 10% SFB.

3.12.2 Separação das células-tronco de longa duração (LT-CTH)

Foram utilizados os procedimentos técnicos descritos no item 3.26. As células foram lavadas com 1mL de tampão PBS, centrifugadas a 1500rpm durante 5 minutos, ressuspensas em 600µL de PBS e adquiridas. As células separadas foram coletadas em tubo do tipo Eppendorff contendo 500µL de meio Iscove's 10% SFB.

3.13 Avaliação da expressão gênica de *CD44*, Cxcr4 (*CXCR4*) e Notch-1 (*NOTCH-1*) nas células-tronco de longa duração (LT-CTH), *ex vivo*, por PCR em tempo real

As células LT-CTH recolhidas foram centrifugadas a 8.000rpm a 4º C, o meio foi retirado e adicionou-se 500µL de Trizol® (Life Tecnology, Carlsbad, California, EUA). As células foram lisadas em vortex à TA durante 5 minutos. Em seguida, foi adicionado clorofórmio para precipitação de proteínas. A amostra foi homogeneizada em vortex durante 15 segundos. O tubo foi incubado em gelo durante 10 minutos e centrifugado a 16.000rpm durante 15 minutos a 4º C. A extração do RNA foi realizada com a adição de isopropanol e banho de gelo durante 10 minutos. Após esta incubação, o tubo foi centrifugado a 12.000rpm durante 15 minutos a 4º C. O sobrenadante foi removido e adicionou-se etanol a 75%. O sobrenadante foi novamente removido e aguardou-se 3 minutos para a completa secagem da amostra. O RNA foi eluído em água DPEC e quantificado em equipamento NanoVue Plus® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido).

Para a amplificação dos fragmentos-alvo, foram utilizados os seguintes componentes: 5µL de máster mix, 0,5µL do respectivo *primer*, 3,5µL de água

ultrapura livre de DNase e RNase e 1µL da amostra de cDNA. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) identificadas pelos códigos descritos na **Tabela 5**. O gene gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi selecionado como controle endógeno de reação, a partir da análise de 32 genes candidatos analisados em placa TaqMan Array 86 well fast plate® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações de TaqMan PCR foram realizadas no equipamento Step One Plus® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) com as seguintes condições de amplificação: ciclo de desnaturação de 3 minutos a 95º C, 40 ciclos de 15 segundos a 95º C e 1 minuto a 60º C. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em triplicata e o produto da amplificação de cada alvo foi analisado diretamente no equipamento. A aquisição de dados ocorreu na etapa de anelamento de cada ciclo e o ciclo limiar (Ct), para cada amostra, foi calculado pela determinação do momento em que a fluorescência excedeu o limite. A quantificação da expressão gênica foi realizada pelo método de quantificação relativa (LIVAK e SCHITTGEN, 2001) de acordo com a fórmula:

$$\text{Taxa de expressão relativa} = 2^{-(\Delta Ct\ \text{amostra} - \Delta Ct\ \text{calibrador})} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

O ΔCt foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média do controle endógeno, para normalização dos dados. Como calibrador, foi utilizada a média aritmética do ΔCt dos osteoblastos do grupo controle empregada como base para resultados comparativos. Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em triplicata e, para cada placa de reação, foram utilizados controles negativos. Os resultados foram analisados pelo programa StepOne® versão 2.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabela 5 - Características dos ensaios utilizados para a avaliação da expressão gênica nas LT-CTH em PCR em tempo real

Nome do gene	Símbolo do gene	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
CD44	*CD44*	Mm01277161_m1	84
Cxcr4	*CXCR4*	Mm01996749_s1	144
Notch-1	*NOTCH-1*	Mm00627185_m1	83
Gapdh	*GAPDH*	Mm99999915_g1	107

pb (pares de base)

3.14 Avaliação das concentrações séricas cálcio e fósforo

A dosagem de cálcio foi realizada pelo método de cresolftaleína e a de fósforo pelo método do molibdato de acordo com as orientações do fabricante dos *kits* comerciais da Labtest (Labtest Diagnóstica, Lagoa Santa, Brasil) e as leituras realizadas em espectrofotômetro modelo Varioskan Flash® (Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia).

3.15 Dosagem de paratormônio (PTH)

A dosagem de PTH foi realizada por teste de ELISA com o *kit Mouse RTH* 1-84 *ELISA* (Immutopics, Califórnia, EUA) com plasma coletado em EDTA de acordo com as especificações do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda 620nm. Imediatamente após a leitura, foram pipetados 100µl da solução de STOP. Homogeneizou-se a placa durante um minuto. A segunda leitura foi realizada em 450nm. Para o tubo branco, foram usados 100µl do substrato e 100µl da solução de STOP. Todas as leituras foram realizadas no espectrofotômetro Varioskan Flash® (Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia).

3.16 Análise da densidade mineral óssea e densidade medular femoral

A aquisição e análise das imagens foram realizadas no equipamento MS FX® (Carestream Health, Toronto, Canadá) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Inicialmente, apenas com a placa de raios X dentro do equipamento, foi realizada a calibração dos raios X. Em seguida, foram determinados os parâmetros de referência para aquisição das imagens: tempo de exposição de 30,125 segundos, ganho de imagem de 4x4, 35KVP de energia e filtro de 0,4mm. Para a câmera, foram utilizados os seguintes parâmetros: abertura óptica (f-stop) de 2,8; campo de visão (*field of view*, FOV) igual a 60. Na sequência, os animais, previamente anestesiados como descrito no item 3.5, foram posicionados individualmente em decúbito ventral sobre um suporte acrílico, submetidos aos raios X e as imagens foram adquiridas.

A análise dos fêmures foi padronizada do lado esquerdo de todos os animais. O fêmur foi dividido em quatro regiões de interesse para análise. Uma vez definidas as regiões, utilizou-se o recurso *template* para criar cópia das mesmas e padronizar a análise de todos os outros fêmures dos grupos controle e desnutridos.

3.17 Análise morfométrica por microtomografia (µCT)

A aquisição das projeções e a reconstrução 2D e 3D das amostras foram realizadas em microtomógrafo de raios-X de alta resolução, modelo 1172 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica), no laboratório de Metabolismo Ósseo do Instituto de Biociências da USP, contando com o auxílio técnico das pós-graduandas Marília Grecco Teixeira e Manuela Miranda e sob supervisão da profa. Dra. Cecília Helena de Azevedo Gouveia. Os fêmures do lado esquerdo dos animais foram fixados em suporte circular com massa de modelar para se obter um alinhamento vertical e evitar deslocamentos durante a movimentação angular. Para as análises morfométricas 2D e 3D, utilizou-se o aplicativo CT-Analyser® (Skyscan, Aartselaar, Bélgica). A **tabela 6** descreve as especificações do microtomógrafo no procedimento

de aquisição das projeções das amostras ósseas para a quantificação microestrutural.

Tabela 6 - Especificações dos parâmetros utilizados na aquisição das imagens no equipamento microtomógrafo de raios-X de alta resolução, modelo 1172 (Skyscan, Aartselaar, Bélgica)

Parâmetros	Valor	Unidade
Voltagem da fonte de raios X	50	kV
Corrente da fonte de raios X	800	µA
Distância da fonte ao objeto	266,60	mm
Distância da fonte à câmera	266,50	mm
Tamanho do pixel das seções transversais	6,74	pixel
Tempo de exposição	4,500	ms
Filtro de alumínio	0	mm
Passo de rotação	0,7	graus

Os parâmetros do osso cortical e trabecular foram obtidos em análise 2D e 3D respectivamente. Para se comparar amostras com diferentes dimensões, utilizou-se a razão entre o volume ósseo da amostra e o volume total da amostra (BV/TV). Os seguintes parâmetros foram medidos em análise 2D: área média de tecido ósseo nas secções transversais da amostra (B.Ar), área média das secções transversais da amostra (T.Ar), perímetro do periósteo (T.Pm) e perímetro do endósteo (B.Pm).

Em seguida, foram definidos os demais parâmetros morfométricos medidos na análise 3D:

a) Espessura trabecular (Tb.Th): é a espessura média das trabéculas. A unidade de medida é “mm”, determinada utilizando-se esferas cujo diâmetro deve preencher a estrutura da trabécula.
b) Número de trabéculas (Tb.N): é o inverso da distância entre os eixos médios das trabéculas ósseas. A unidade de medida é “mm^{-1}”.
c) Separação trabecular (Tb.Sp): é a espessura média das cavidades que contêm medula óssea. A unidade de medida é “mm”.

O índice de modelo experimental (SMI) indica a predominância de trabéculas em formato de placas ou hastes no osso trabecular. O valor de SMI varia de 0,

quando há predomínio de trabéculas em formato de placas, até 3, quando há predomínio de trabéculas em formato de hastes. O grau de anisotropia (DA) refere-se à direção das trabéculas, sendo estas verticais e horizontais.

3.18 Processamento dos cortes histológicos para inclusão em resina

O fêmur esquerdo do animal foi removido por procedimento cirúrgico e o tecido muscular que envolve o periósteo, retirado com auxílio de bisturi. O fêmur foi dividido em duas metades para permitir a melhor penetração das soluções utilizadas durante o processamento histológico. Em relação aos esternos, o tecido muscular e conjuntivo associado foram removidos com auxílio de bisturi e duas pequenas incisões foram feitas nas extremidades com o mesmo propósito citado. Todas as etapas, desde a fixação até a infiltração, foram realizadas com os fêmures e esternos alocados individualmente em cassetes histológicos e frascos coletores. Utilizou-se 40 mL de todas as soluções descritas desde a fixação até a infiltração, sendo todas as etapas realizadas a 4° C.

Os fragmentos foram fixados em solução 1,4% de paraformaldeído a 4º C, preparado imediatamente antes do uso, durante 24 horas. Após esse período, as peças foram desidratadas em soluções alcoólicas seriadas a 70% até absoluto, permanecendo 1 hora em cada concentração. Dessa forma, as peças foram incluídas em resina de metilmetacrilato Technovit 9100 New® (Heraeus Kulzer, Wehrhrin, Alemanha).

3.18.1 Soluções fixadoras

Os fêmures foram fixados em solução de paraformaldeído 1,4% (preparadas no momento do uso) em tampão fosfato 0,04mmol/L contendo 10% de sacarose e a solução trocada após 12 horas. Em seguida, as peças foram lavadas em tampão

fosfato 0,04mmol/L contendo 10% sacarose e mantidas nesta mesma solução durante 6 horas.

3.18.2 Desidratação

A desidratação das peças foi realizada utilizando-se soluções seriadas de álcool etanol 70% até absoluto (**Tabela 7**), nas quais as peças permaneceram até o início do processamento de embebição e inclusão em resina (**Tabela 8**).

Tabela 7 - Etapas de desidratação

Solução	Tempo (h)	Temperatura (º C)
Etanol 70%	1	4
Etanol 80%	1	4
Etanol 96%	1	4
Etanol absoluto	1	4
Etanol absoluto	1	4
Etanol absoluto	1	4
Etanol absoluto	1	4

3.18.3 Embebição, inclusão e polimerização

Anteriormente à embebição na resina, as peças foram incubadas duas vezes em xilol durante 3 horas cada incubação e, posteriormente, em solução de resina diluída em 50% xilol durante 12 horas. Na sequência, procedeu-se à pré-infiltração, que consistiu na adição do reagente de polimerização diluído em resina durante 6 horas. A infiltração foi realizada utilizando-se reagente de polimerização e polimetilmetacrilato (PMMA) diluídos em resina durante 24 horas. Na etapa de polimerização, as peças foram transferidas dos cassetes histológicos e alocadas em formas próprias para a polimerização (Heraeus Kulzer, Wehrhrin, Alemanha) e obtenção dos cortes histológicos. Após adição da solução de polimerização sobre as peças, as formas foram hermeticamente fechadas e permaneceram a -20° C durante 48 horas (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Etapas de embebição, inclusão e polimerização

Solução	Tempo (h)	Temperatura (º C)
Xilol	3	4
Xilol	3	4
Xilol/Technovit 50%	12	4
Resina + polimerizador	6	4
Resina + polimerizador + PMMA	24	4
Solução de polimerização	72	-20

3.18.4 Cortes histológicos

Os blocos obtidos foram cortados em micrótomo modelo RM2245® (Leica, Wetzlar, Alemanha). Os cortes de 5µm de espessura foram montados em lâminas de vidro cobertas com polilisina.

3.18.5 Remoção da resina e hidratação dos cortes histológicos

A resina foi removida dos cortes histológicos através de incubações em solventes (xilol, 2-metiletoxieacetato e acetona), realizadas à temperatura ambiente, conforme descrito na **Tabela 9**. Em seguida, os cortes foram hidratados em álcool 95%, álcool 70% e água destilada também à temperatura ambiente conforme descrito na **Tabela 10**.

Tabela 9 - Etapas de remoção da resina

Solução	Tempo (min)	Temperatura (° C)
Xilol	10	TA
Xilol	10	TA
2-metoxietilacetato	5	TA
Acetona	5	TA
Acetona	5	TA

Tabela 10 - Etapas de hidratação

Solução	Tempo (min)	Temperatura (° C)
Álcool 95%	2	TA
Álcool 70%	2	TA
Água destilada	2	TA

3.19 Coloração dos cortes histológicos de esternos e fêmures com hematoxilina-eosina (HE)

Para a coloração por H.E., os cortes foram primeiramente corados com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante 2 minutos, lavados em água corrente por 5 minutos e corados com eosina a 1% (Merck, Darmstadt, Alemanha) por 2 minutos. Após a coloração, os cortes, obtidos e processados conforme descrito no item 3.11, foram desidratados em soluções alcóolicas a 70%, 95% e 100%, conforme especificado na tabela 9. A montagem foi feita com Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha) e lamínula.

Tabela 11 - Etapas de desidratação

Solução	Tempo (min)	Temperatura (° C)
Álcool 70%	1	TA
Álcool 95%	1	TA
Álcool 95%	1	TA
Álcool absoluto I	1	TA
Álcool absoluto II	1	TA
Xilol I	1	TA
Xilol II	1	TA

3.20 Detecção, por imunofluorescência, de osteopontina em cortes histológicos de medula óssea

Os cortes histológicos obtidos e processados conforme descrito no item 3.11, foram lavados seis vezes durante 5 minutos em cada incubação em TA. Em seguida, foram fixados em tampão PBS contendo 4% paraformaldeído pH7,4, durante 10 minutos à TA. As células foram permeabilizadas com solução 0,1% Triton-X (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA) preparada em tampão PBS contendo 1% de BSA, pH 7,4, durante 1 hora à TA. Os cortes foram lavados seis vezes. O anticorpo primário antiosteopontina (ABCAM, Cambrigde, Reino Unido) diluído 1:100 em PBS contendo 1% albumina sérica bovina (BSA) foi adicionado sobre cada corte e incubado durante 12 horas em câmara úmida à 4º C e posteriormente lavados seis vezes durante 5 minutos em cada incubação em TA e novamente lavados seis vezes com PBS 1% BSA. O anticorpo secundário anticoelho conjugado ao fluoróforo Dy-light®550 (ABCAM, Cambrigde, Reino Unido) foi diluído 1:200 em PBS 1% BSA e adicionado sobre cada corte. Após 1 hora de incubação à TA, os cortes foram lavados seis vezes em solução salina fosfato (PBS) contendo 1% de BSA pH7,4. Para coloração dos núcleos, adicionou-se 1µM 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) durante 5 minutos e, a seguir, as lâminas foram lavadas uma vez com PBS. Como controle negativo, um dos cortes foi incubado apenas com o anticorpo secundário. Os cortes foram analisados imediatamente em microscópio de fluorescência modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão). A leitura da fluorescência do DAPI foi realizada

com o filtro UV-2EC, cujo espectro de emissão é de 325 a 375nm e o de emissão, de 435 a 485nm. Em seguida, foi realizada a aquisição da fluorescência DyLight 550 em filtro Y-2E/C, cujo espectro de excitação é de 540 a 580nm e o de emissão é de 600 a 660nm. Os tempos de exposição foram os mesmos para ambos os grupos.

3.21 Detecção, por imuno-histoquímica, de colágeno tipo I, osteonectina e osteocalcina em cortes histológicos de medula óssea

Todas as lavagens dos cortes foram realizadas três vezes, durante 5 minutos a TA, em solução tampão TBS contendo tween 0,1%, pH7,6. Os cortes histológicos obtidos e processados, conforme descrito no item 3.11, foram lavados e incubados à TA com TBS contendo 3% H_2O_2 durante 30 minutos (com troca de nova solução a cada 10 minutos) para bloqueio da peroxidase endógena. Em seguida, foram lavados novamente e incubados à TA, com TBS 2% gelatina de pele de peixe (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA) durante 1 hora para bloqueio dos sítios inespecíficos. Os cortes foram novamente lavados e 200µL do anticorpo primário diluídos em TBS 1% gelatina de peixe e adicionados sobre cada corte. As especificações e diluições dos anticorpos estão descritas na **Tabela 12**. Como controle negativo, foi adicionado o anticorpo isotípico de cadeia para cada anticorpo, na mesma concentração do anticorpo correspondente. A incubação do anticorpo primário foi feita *overnight* a 4º C. No outro dia, os cortes foram lavados e 200µL do anticorpo secundário ligados à peroxidase, diluídos em TBS 1% gelatina de peixe, foram adicionados aos cortes durante 1 hora a TA. Os cortes foram lavados e revelados com 200µL do sistema revelador contendo diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA). Os cortes foram lavados durante 1 minuto com TBS e 1 minuo com água destilada. Em seguida, foram desidratados conforme tabela 9 e montados em Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). A leitura foi realizada com microscópio em campo aberto utilizando-se os mesmos tempos de exposição para os cortes dos grupos controle e experimental em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

Tabela 12 - Descrição dos anticorpos utilizados nas reações de imunofluorescência e imuno-histoquímica

Anticorpos	Descrição	Espécie hospedeira	Diluição	Concentração original	Fabricante	Referência
anti-OPN	IgG policlonal	coelho	1:100	75mg/mL	ABCAM	ab8448
anti colágeno tipo I	IgG policlonal HRP	coelho	1:500	1mg/mL	USBiological	C7510-17J
anti-ON	IgG2b monoclonal	rato	1:500	0,5mg/mL	USBiological	O8063-09
anti-OC	IgG policlonal	coelho	1:100	0,2mg/mL	Millipore	AB10911
anticoelho	IgG policlonal HRP	cabra	1:3000	1mg/mL	ABCAM	ab97051
antirrato	IgG policlonal HRP	coelho	1:5000	2mg/mL	USBiological	I1904-48S
anticoelho	IgG policlonal DyLight®550	burro	1:200	0,5mg/mL	ABCAM	ab98489
anti-IgG	IgG monoclonal	coelho	1:200	0,2mg/mL	ABCAM	ab125938
anti-IgG	IgG policlonal	coelho	1:100	0,2mg/mL	ABCAM	ab27478

3.22 Coloração de Picrossírius para identificação de colágeno em cortes histológicos de medula óssea femoral

Esta coloração baseia-se no fato do corante *sírius red* ser fortemente ácido, contendo grupos sulfônicos que se ligam a aminoácidos básicos do colágeno, sendo que as moléculas do corante se alinham paralelamente ao eixo longo de cada molécula de colágeno. Quando se utiliza a luz polarizada, observa-se aumento da birrefringência das fibras de colágeno que assumem cores e intensidades variadas em consequência de diferentes graus de agregação física dos diferentes tipos de colágeno. É possível distinguir diferentes tipos de colágenos através dos padrões de

cores, diferenças de diâmetro e arranjo estrutural das fibras (HIRSHBERG et al., 1999). O colágeno do tipo I é composto por fibras espessas amarelas brilhantes, laranjas ou vermelhas; o tipo II se apresenta como fibras finas com cores variadas distintas das observadas no colágeno I; o tipo III está representado por fibras extremamente delgadas esverdeadas e amarelo-esverdeadas. Os cortes histológicos obtidos e processados conforme descrito no item 3.18, foram incubados durante 1 hora à TA com solução 0,1% de *sírius red* saturada com ácido pícrico, pH2,0. Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente, desidratados em sequência de etanol 70%, 90%, 100%, 100% durante 5 minutos em cada “banho” e a diafanização e xilol (2 “banhos” de 5 minutos cada). As lâminas foram montadas com lamínula e Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). A aquisição das imagens foi realizada em microscópio Eclipse E600® (Nikon, Tóquio, Japão) no laboratório de Biologia Celular e Anatomia Funcional do Instituto de Biociências da USP.

3.23 Quantificação de osteoclastos em cortes histológicos de medula óssea

Inicialmente foi preparada a solução completa de Burstone (BURSTONE, 1958) obtida a partir da dissolução de 1,361g de acetato de sódio em 50 mL de tampão acetato pH5,0. Em seguida foram adicionados 8 mg de naftol AS bifosfato e 0,5 mL de N,N-dimetil formamida, 70 mg de sal “fast red violet” e 50 µL de cloreto de magnésio 10%. Os cortes histológicos, obtidos e processados conforme descrito no item 3.11, foram incubados em jarra Coplin contendo a solução de Burstone durante 5 minutos a 37º C. Em seguida, adicionou-se 0,4704 g de D(-) ácido tartárico e as lâminas permaneceram em incubação durante 3 horas a 37º C. Após a incubação, os cortes foram lavados e deixados para secar em estufa a 60º C durante 24 horas. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris a 10% durante 7 minutos e lavadas em água corrente por 10 minutos. Após a coloração, as lâminas foram desidratadas em sequência de etanol 70%, 90%, 100%, 100% durante 5 minutos cada “banho” e a diafanização em xilol (dois “banhos” de 5 minutos). As lâminas foram montadas com lamínula e Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha). A quantificação de osteoclastos em regiões trabeculares dos cortes histológico dos

fêmures dos animais de ambos os grupos foi realizada em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão) e programa do próprio microscópio que permitiu a quantificação/área óssea.

3.24 Isolamento dos osteoblastos da medula óssea femoral

Os fêmures dos animais previamente anestesiados e eutanasiados de ambos os grupos foram removidos cirurgicamente e a camada muscular removida com auxílio de bisturi. Os ossos foram colocados em placas de seis poços (Corning, Nova Iorque, EUA) e tratados, por 15 minutos, com PBS contendo tripsina 0,125% e colagenase do tipo II (Gibco, Thermo Fisher®, Carlsbad, Califórnia, EUA) 0,1%, na proporção1:1 e repetido três vezes, para a remoção das células aderentes do periósteo. A placa foi mantida em agitação de 200rpm a 37º C. Em seguida, as epífises foram removidas e as células da medula óssea retiradas a partir da lavagem da cavidade medular com 4mL de PBS. Os ossos foram cortados em pequenos segmentos, transferidos para tubos Falcon® (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) de 50mL e tratados duas vezes com colagenase do tipo II (Gibco, Thermo Fisher, Carlsbad, Califórnia, EUA) 0,2% preparada em meio α-MEM sem soro fetal bovino (SFB) durante 30 minutos na primeira remoção e 60 minutos no segundo tratamento, ambos a 37º C em agitação de 200rpm. As células foram recolhidas separadamente, lavadas com meio α-MEM 10% SFB e centrifugadas a 300g durante 10 minutos a 4º C. As células removidas foram separadas por coluna magnética para remoção das células da linhagem hematológica utilizando-se *kit* de separação magnética por microesferas (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, Califórnia, EUA). O *kit* de separação continha os seguintes anticorpos monoclonais conjugados à biotina: CD5, CD45R (B220), CD11b, anti-Gr-1 (Ly-6G/C), anti 7-4 e Ter-119. As células assim obtidas por depleção negativa foram incubadas com anticorpo anti-Sca1 FITC (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, Califórnia, EUA), processo seguido por incubação com microesferas magnéticas anti-FITC. As células foram colocadas em coluna magnética e recolhidas para fenotipagem. A fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se os anticorpos antibiotina APC (Miltenyi Biotec Inc., Auburn,

Califórnia, EUA), Sca-1 PE (clone D7) (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) e OPN PE (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Um total de 20.000 eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) com íon argônio e as análises realizadas em aplicativo FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA).

A fim de se verificar a morfologia e a correlação da imunofenotipagem com a remoção dos osteoblastos, foram realizados citocentrifugados das suspensões celulares e corados pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado por Rosenfeld. A eficiência do processo de remoção dos osteoblastos também foi avaliada por corte histológico de fêmur, após os tratamentos com tripsina e colagenase corados com H.E.

3.25 Indução osteogênica dos osteoblastos isolados por imunodepleção magnética

Após o isolamento e a separação magnética descritos no item 3.24, $5x10^5$ células foram plaqueadas em 1mL meio α-MEM 10% SFB em placa de 24 poços (Corning, Nova Iorque, EUA) e mantidas em estufa com 5% de CO_2, 37°C e 55±10% de umidade. A cada 48 horas, metade do meio de cultura foi trocado. Após uma semana de cultivo em meio α-MEM 10% de SFB, as células foram tratadas com meio de indução osteogênica contendo 50µg de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich®, St.Louis, EUA), 10nM de dexametasona (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA) e 10mM de β-glicerofosfato (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA). Esse sistema foi mantido em estufa com 5% de CO_2, 37°C por mais uma semana, sendo que a cada 72 horas trocou-se 50% do meio de cultura.

3.26 Avaliação qualitativa da fosfatase alcalina por citoquímica

Após duas semanas de cultura, conforme descrito no item 3.25, o meio de cultura foi removido e as células rinsadas com solução PBS. Para a determinação da fosfatase alcalina, as células foram incubadas em tampão Tris 0,05M, pH10,5, contendo 0,025% de naftil fosfato de sódio e 0,025% de sal fast *violet B* durante 1 hora em “banho” a 37º C. As células foram rinsadas em tampão Tris 0,05M pH10,5. As imagens das placas foram realizadas em microscópio modelo Eclipse 80i (Nikon, Tóquio, Japão).

3.27 Ensaio de mineralização dos osteoblastos em cultura celular

A capacidade de mineralização *in vitro* das células isoladas e cultivadas durante duas semanas com meio de indução osteogênico foi realizada com coloração vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA). O meio de cultura foi removido e as células rinsadas com solução PBS por duas vezes. As células foram fixadas com álcool 70% durante 1 hora a 4º C e lavadas com PBS e água destilada. Em seguida, as células foram coradas com vermelho de alizarina 2% pH 4,2 durante 15 minutos à TA. A análise quantitativa da coloração foi realizada pelo método colorimétrico segundo Petri e colaboradores (2010). Os poços foram lavados três vezes com PBS durante 5 minutos à TA. Após 24 horas, 280µL de ácido acético 10% foram adicionados a cada poço e a placa permaneceu em agitação durante 30 minutos. As células foram removidas e o conteúdo transferido para um tubo do tipo Eppendorff. Os tubos foram agitados durante 30 segundos em vórtex e aquecidos a 85º C durante 10 minutos. Em seguida, foram incubados a 4º C em gelo durante 5 minutos. Os tubos foram centrifugados durante 20 minutos a 13.000 rpm e 100µL do sobrenadante transferido para placa de 96 poços. A leitura da densidade óptica foi realizada em 405nm. As imagens das placas foram realizadas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

3.28 Expressão proteica por *Western Blotting*, de colágeno tipo I, osteopontina, osterix, Runx2, OPG e RANKL nos osteoblastos isolados

As células removidas da região endosteal e isoladas por microesferas magnéticas, conforme descrito em relatório anterior, foram lavadas uma vez com 2mL de PBS para remoção do meio de cultura e centrifugadas durante 5 minutos a 1500rpm. Após a retirada do sobrenadante, adicionou-se 100µL de tampão RIPA® (Thermo Fisher, Carlsbad, Califórnia, EUA) contendo inibidores de proteases e de fosfatases (50mM de NaF e 1mM de PMSF). Os tubos do tipo Eppendorff contendo as células foram mantidos em gelo, durante 1 hora, para a obtenção do lisado celular. O lisado foi centrifugado a 14.000rpm durante 15 minutos a 4º C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e congelado em freezer a -40º C até a realização das análises. As proteínas obtidas foram determinadas pelo *kit* comercial BCA® (Thermo Fisher, Carlsbad, Califórnia, EUA). Todas as amostras foram processadas em duplicata e as leituras realizadas a 540nm em espectrofotômetro Varioskan Flash® (Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia).

As proteínas foram diluídas em tampão Laemmli 5x concentrado (Tris HCl 1M pH 6,8, contendo 0,01% de azul de bromofenol,10% de SDS, 50% de glicerol e 10% de mercaptoetanol) na proporção de uma parte de tampão para quatro partes de amostra, deixando-se em ebulição durante 5 minutos para a desnaturação. As amostras foram armazenadas a -40º C até o momento da análise.

A corrida de eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida docecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando-se gel de empilhamento a 4% e gel de separação a 8% para as proteínas osteopontina, colágeno do tipo I, Runx2 e osterix. Utilizou-se 10µg de proteínas em cada poço do gel e 10µL do padrão de peso molecular (Spectra, Thermo Fisher, Carlsbad, Califórnia, EUA). A eletroforese foi realizada em tampão de corrida pH8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 0,1% de SDS e água deionizada. Inicialmente, aplicou-se corrente de 60V para a migração das amostras até o gel de separação e, na sequência, aplicou-se 100V para a migração das amostras em todo o gel de separação. A transferência das amostras foi feita em membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Pittsburgh, EUA) em tampão de transferência pH8,3 (25mM de trizma base, 192mM de glicina, 20% de metanol e 0,02% de SDS) a 70V por 60 minutos. A verificação da transferência das proteínas

foi realizada incubando-se a membrana em Ponceau S durante 5 minutos e, em seguida, a membrana foi lavada durante 10 minutos com tampão de lavagem TBS contendo 0,01% de Tween 20 (TBS-T). O bloqueio da membrana foi realizado com solução 5% TBS-T em leite em pó Molico® desnatado (Nestlé, Vevey, Suiça) durante 1 hora, à temperatura ambiente, sob agitação. Após este período, a membrana foi lavada três vezes, durante 10 minutos em cada lavagem, com tampão TBS-T, sob agitação constante e posteriormente incubada com o anticorpo primário de interesse, na diluição padronizada, diluído em TBS-T contendo 3% de leite. A incubação foi realizada durante 12 horas por toda a noite, a 4º C, em agitação constante. A seguir, a membrana foi lavada três vezes como descrito anteriormente. O anticorpo secundário, diluído em TBS-T contendo 3% de leite, foi incubado durante 1 hora à temperatura ambiente, em agitação constante. Novamente, a membrana foi lavada como descrito e procedeu-se à detecção utilizando-se reagente ECL® (*ECL Select Western Blot Detection Reagent*) (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) no equipamento ImageQuant TL® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A marcação com β-actina foi utilizada para a normalização. As especificações e diluições dos anticorpos utilizados estão descritas na **tabela 13**.

Tabela 13 - Descrição dos anticorpos utilizados nas reações de *Western Blotting*

Anticorpo	Descrição	Espécie hospedeira	Diluição	Concentração original	Fabricante	Referência
anti-OPN	IgG policlonal	coelho	1:2.500	75mg/mL	ABCAM	ab8448
anti-colágeno tipo I	IgG policlonal HRP	coelho	1:2.000	1mg/mL	USBiological	C7510-17J
anti-Sp7 osterix	IgG policlonal HRP	coelho	1:1000	0,9mg/mL	ABCAM	ab22552
anti-Runx2	IgG policlonal HRP	coelho	1:1.000	0,5mg/mL	ABCAM	ab81357
anti-OPG	IgG policlonal HRP	coelho	1:2500	0,2mg/mL	R&D Systems	AF459
anti-RANKL	IgG policlonal HRP	coelho	1:1.000	0,2mg/mL	R&D Systems	AF462
anticoelho	IgG policlonal HRP	cabra	1:10.000	1mg/mL	ABCAM	ab97051

3.29 Avaliação da expressão gênica de colágeno do tipo I (COL1A2), osterix (*SP7*), cxcl12 (CXCL12), angiopoetina (*ANGPT1*), osteopontina (*SPP1*), Jagged (*JAG2*) e N-caderina (*CDH2*), nos osteoblastos, *ex vivo*, por PCR em tempo real.

A extração do RNA dos osteoblastos foi realizada com *kit* para extração de RNA – RNAspin Mini RNA Isolation® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) com tratamento com DNase, conforme protocolo determinado pelo fabricante. O processo consistiu em colocar as células em pequenas colunas de extração adaptáveis a um tubo do tipo Eppendorff de 1,5mL. O RNA ficou retido nas colunas e foi posteriormente lavado e purificado. Na etapa final, o reagente promoveu a liberação do RNA da coluna, o qual foi mantido em *freezer* -40º C até o momento do uso.

A quantificação e verificação de contaminação das amostras de RNA total obtidas foram analisadas no equipamento NanoVue Plus® (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido), permitindo a quantificação do “pool” total de RNA contido em cada amostra individual, além de verificar a presença de contaminação por proteínas, pela comparação das razões de absorbância a 260/280nm. As amostras consideradas adequadas para utilização apresentaram razões de absorbância entre 1,9 e 2,1.

Para a síntese de cDNA, foi utilizado o *kit* High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (Life Technologies, Califórnia, EUA). Em um micro tubo, foram adicionados 1µg de RNA e o volume ajustado para 10µL com água tratada com DEPC. Na sequência, o *mix* foi adicionado: 2µL de tampão de reação (10x) da transcriptase reversa, 0,8µL da mistura de dNTPs (25x) (100mM), 2µL de *random primer* (10x), 1µL da enzima Multiscribe RT (50U/µL), 1µL de inibidor de RNase (20U/µL), 3,2µL de água livre de RNase e DNase e 10µL de água ultrapura. A reação foi incubada em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research, Massachusetts, EUA) nas temperaturas de 25º C por 10 minutos para ativação inicial da enzima, 37º C por 2 horas para a síntese de cDNA, seguido da inativação enzimática a 85º C por 5 segundos. O cDNA foi armazenado a -20º C até o momento da amplificação do cDNA.

Para a síntese de cDNA e amplificação dos fragmentos-alvo, procedeu-se como descrito no item 3.13. Foram utilizadas sondas marcadas com FAM, adquiridas no formato TaqMan Gene Expression Assays® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e identificadas pelos códigos descritos na **Tabela 14**.

Tabela 14 - Características dos ensaios utilizados para avaliação da expressão gênica nos osteoblastos em PCR em tempo real

Nome do gene	Símbolo do gene	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Osterix	*SP7*	Mm04209856_m1	88
Osteopontina	*SPP1*	Mm00436767_m1	114
Colágeno tipo 1	*COL1A2*	Mm00483888_m1	67
Cxcl12	*CXCL12*	Mm00445553_m1	85
Angiopoetina	*ANGPT1*	Mm00456503_m1	84
Jagged	*JAG2*	Mm01325629_m1	101
N-caderina	*CDH2*	Mm01162497_m1	82
Gapdh	*GAPDH*	Mm99999915_g1	107

pb (pares de base).

3.30 Quantificação de M-CSF do lavado de medula óssea dos animais ex vivo

As amostras para a quantificação de M-CSF em lavado de medula óssea foram obtidas após lavagem da cavidade medular femoral com volume de 1mL de meio de cultura Iscove's. A determinação de M-CSF foi realizada por teste de ELISA com o *kit Mouse* M-CSF DuoSet (R&D Systems, Minneapolis, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. A leitura foi realizada em comprimento de onda 450nm no espectrofotômetro Varioskan Flash® (Thermo Scientific, Vantaa, Finlândia).

3.31 Imunofluorescência para osteopontina (OPN) nas células MC3T3

As células osteoblásticas MC3T3-E1 derivadas de camundongo e obtidas da calvária foram cultivadas em placa de 24 poços, na densidade de 10^5 células/poço, e foram cultivadas em meio de cultura α-MEM (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA), 10% soro fetal bovino, penicilina-estrteptomicina (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA), 50µg/mL de ácido ascórbico e 10mM de β-glicerofosfato (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA) durante três dias. Após esse período, o meio de cultura foi removido, a camada de células foi lavada com PBS e as células fixadas com tampão PBS contendo 4% de paraformaldeído durante 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com tampão PBS contendo 2% SFB. O bloqueio dos sítios antigênicos inespecíficos foi realizado com PBS contendo 0,1% Triton-X e 1% BSA durante 1 hora à TA. As células foram lavadas seis vezes em tampão PBS 2% SFB. O anticorpo anti-osteopontina conjugado ao fluorocromo PE diluído 1:100 em PBS 1% BSA foi adicionado ao poço e incubado durante 1 hora à TA. As células foram lavadas seis vezes PBS. Para a coloração dos núcleos, adicionou-se 1µM de 4',6-diamino-2-fenildiol (DAPI) durante 5 minutos e, em seguida, o poço foi lavado uma vez com PBS. As células foram analisadas imediatamente em microscópio de fluorescência modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão). A leitura da fluorescência do DAPI foi realizada com o filtro UV-2EC, cujo espectro de excitação é de 325 a 375nm e o de emissão entre 435 e 485nm. Em seguida, foi realizada a aquisição da fluorescência PE em filtro Y-2E/C, cujo espectro de excitação é de 540 a 580nm e o de emissão, entre 600 e 660nm.

3.32 Ensaio de proliferação das células LSK

Para a realização dos ensaios de proliferação, as células LSK, obtidas por *cell sorter*, na concentração 1 x 10^5 células, foram ressuspensas em PBS 0,1% SFB pré-aquecido contendo 1µM de CFSE conjugado ao fluorocromo *far red* (Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) durante 20 minutos a 37º C ao abrigo da luz. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de PBS gelado contendo

3% SFB. As células foram lavadas desta forma por três vezes a 1500 rpm durante 5 minutos. Uma alíquota de 20.000 células foi ressuspensa em 500µL de PBS e adquirida em FACS Accuri C6® (Accuri Cytometers Inc., Ann Arbor, Michigan, EUA) para verificação de que as células incorporaram o fluorocromo CFSE. O corante citoplasmático CFSE *5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidylester* é um permeabilizador de membrana que se difunde livremente dentro da célula. A permeabilização celular é realizada pelas cadeias laterais de acetato que são clivadas por esterases intracelulares. O produto formado emite fluorescência detectada por citômetro utilizando-se laser de 640nm e filtro 670LP *long pass*. Durante a divisão celular, as células marcadas com este fluorocromo, ao se dividirem, distribuem esse marcador para as células filhas. Com isso, as células que passaram por vários ciclos de divisão celular perdem progressivamente a fluorescência, o que é observado pelo decaimento da mesma.

3.33 Estabelecimento de cocultura de MC3T3 e LSK

Um total de $1x10^5$ células MC3T3 foi distribuído em placas de 24 poços e cultivado em meio α-MEM contendo ácido ascórbico, β-glicerofosfato e dexametasona. Após três dias de cultura, essas células apresentam confluência de 80%. Sobre esta camada celular, foram adicionadas 10.000 células LSK obtidas por *cell sorter* e marcadas com o fluorocromo CFSE conforme descrito no item 3.32 A manutenção da cocultura foi realizada utilizando-se 50% de meio de indução osteogênico e 50% de meio StemSpan® (Stem Cell Technology) suplementados com 2mM de glutamina, 12,5% SFB, e coquetel de citocinas contendo 150ng/mL de fator de células-tronco (SCF) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 30ng/mL de interleucina-3 (IL-3) (Sigma-Aldrich®, St.Louis, EUA) e 30ng/mL de interleucina-6 (IL-6) (Sigma-Aldrich, St.Louis, EUA). O meio de cultura foi trocado a cada três dias. As células foram incubadas ao abrigo da luz em estufa de CO_2 durante sete dias a 37º C. Após este período, os poços foram lavados com solução tampão HBSS 0,1% EDTA para remoção das células. As células foram centrifugaras a 1.400rpm durante 6 minutos e ressuspensas em PBS para aquisição em citômetro de fluxo FACS Accuri C6®

(Accuri Cytometers Inc., Ann Arbor, Michigan, EUA). As análises dos resultados foram realizadas no FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA).

3.34 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste Shapiro-Wilk para verificação de normalidade na distribuição das amostras, sendo as comparações estatísticas paramétricas realizadas por teste-T e as comparações não-paramétricas realizadas por teste de Mann-Whitney. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças estatisticamente significativas foi de $p < 0,050$. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 4® (GraphPad Software Inc, San Diego, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Determinação da concentração proteica das rações

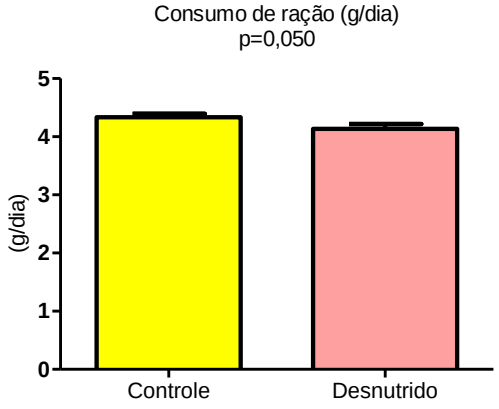
A concentração proteica das rações de crescimento, controle e hipoproteica foram determinadas pelo método micro-Kjedahl. As concentrações médias de proteína dos lotes de ração de crescimento, controle e hipoproteica foram 18,35% ± 0,74 (n=8), 12,88% ± 0,59 (n=13) e 2,60% ± 0,17 (n=13), respectivamente, sendo que n indica o número de lotes de ração analisados nos experimentos.

4.2 Análise do estado nutricional

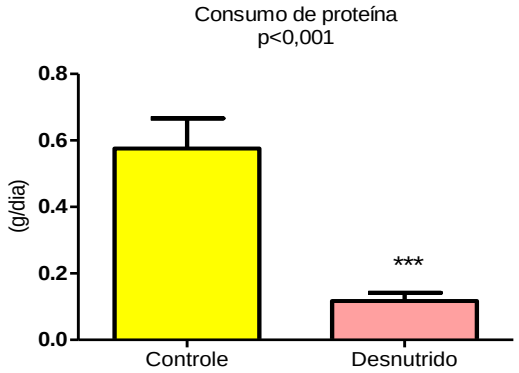
4.2.1 Consumo de ração e água

O consumo diário de ração entre os grupos foi o mesmo (**Figura 8A**). Entretanto, o consumo de proteína do grupo desnutrido foi significativamente menor quando comparado ao grupo controle, pois a ração hipoproteica possui apenas 2% de proteína (**Figura 8B**). Em relação ao consumo de água, o grupo desnutrido apresentou ingestão média de 4,42mL (4,05 – 4,81) enquanto o consumo médio do grupo controle foi de 2,35mL (2,11 – 2,61) (**Figura 8C**).

A



B



C

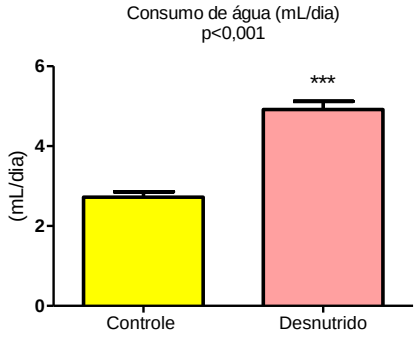
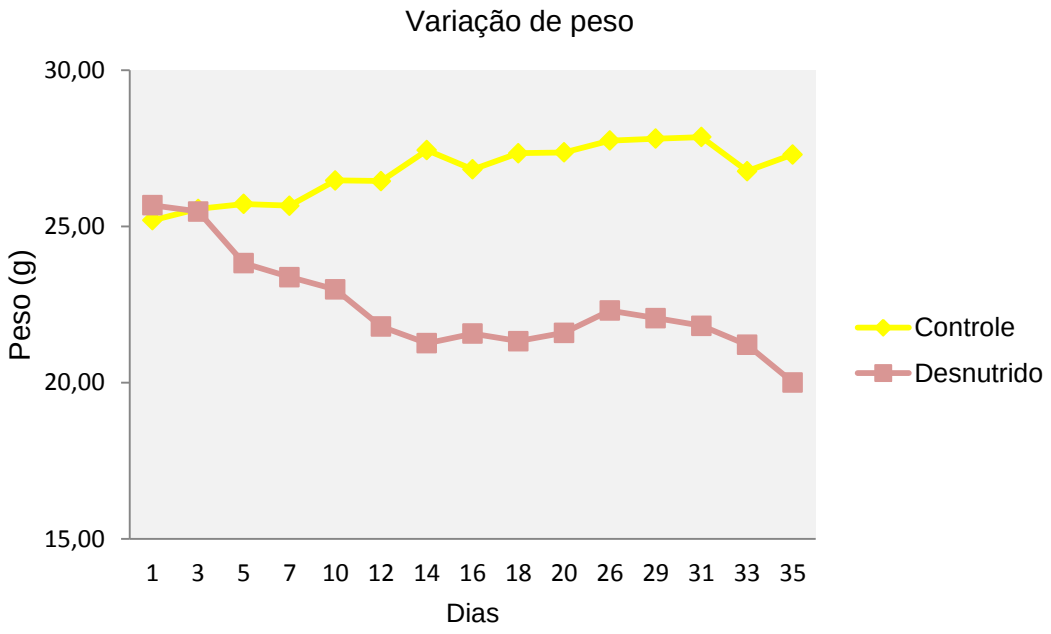


Figura 8 – Análise do consumo de: **(A)** ração, **(B)** proteína e **(C)** água nos grupos controle (n=20) e desnutridos (n=20). Os resultados estão expressos em média ± DP. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística por teste t.

4.2.2. Peso corporal

Observou-se que os animais que receberam ração hipoproteica apresentaram perda significativa de peso -24,02g ± 7,32g (média ± desvio padrão), enquanto os animais do grupo controle apresentaram ganho de peso de 12,98g ± 2,60g (média ± desvio padrão) durante o mesmo período (**Figuras 9A e 9B**).

A



B

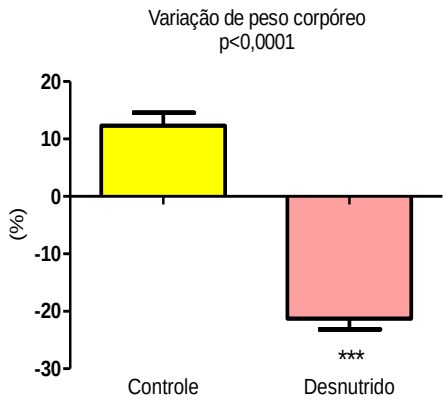


Figura 9 - **(A)** Variação do peso corporal. **(B)** Porcentagem da variação do peso corporal realizada durante o período de 5 semanas de indução a desnutrição, peso avaliado a cada 48 horas. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. Grupo controle (n=20) e grupo desnutrido (n=20). O n indica o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística por teste t.

4.2.3 Determinação da concentração de proteínas totais e albumina

Observou-se que os animais desnutridos apresentaram diminuição significativa da concentração de proteínas totais e albumina séricas quando comparados ao grupo controle (**Figuras 10A e 10B**).

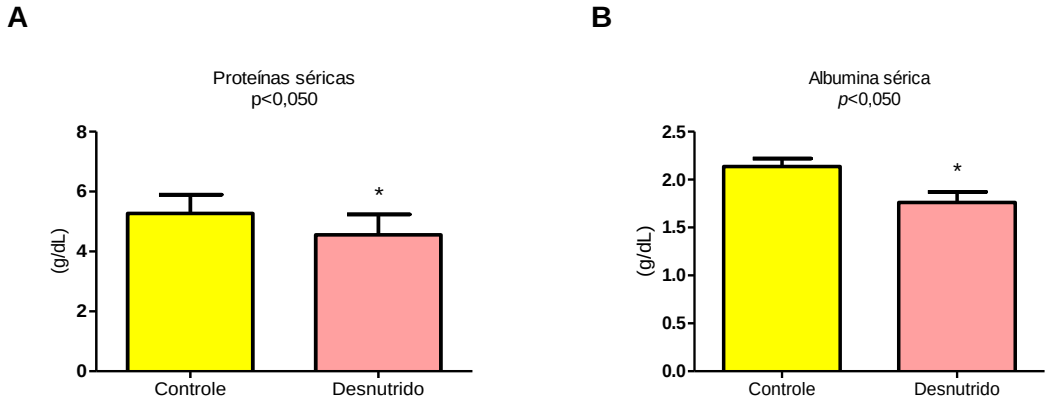


Figura 10 - **(A)** Valores das concentrações séricas das proteínas totais (g/dL) e **(B)** albumina (g/dL), dos animais do grupo controle (n=12) e dos animais do grupo desnutrido (n=13). O n indica o número de animais utilizados no experimento. Valores expressos em média ± desvio padrão. Análise estatística por teste t.

4.3 Análise do hemograma

A análise do perfil eritrocitário revelou que os animais desnutridos apresentaram redução significativa do número de hemácias, nos valores de hematócrito e na concentração de hemoglobina quando comparados aos animais do grupo controle. A porcentagem de reticulócitos também foi significativamente menor nos animais desnutridos indicando que a medula óssea está hipoproliferativa (**Tabela 15**). Em relação à série leucocitária, evidenciou-se leucopenia com redução dos valores absolutos de linfócitos. Não foram encontrados basófilos. Em relação ao número de plaquetas os animais desnutridos apresentaram número significativamente menor das mesmas quando comparados aos animais controles (**Tabela 16**).

Tabela 15 - Valores da série eritrocitária em animais controle e desnutridos

Parâmetros	Controle (n=8)	Desnutrido (n=14)	*p valor*
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	9,35 (9,00 – 10,36)	7,80 (5,80 – 8,78)	< 0,001
Hemoglobina (g/dL)	13,9 (13,4 – 15,3)	11,4 (8,5 – 12,7)	< 0,001
Hematócrito (%)	42,6 (41,5 – 45,8)	34,1 (26,2 – 38,5)	< 0,001
VCM (fL)	46 (44 – 46)	44 (44 – 45)	0,055
HCM (pg)	15 (14 – 15)	14 (14 – 15)	0,066
CHCM (%)	32 (32 – 33)	33 (32 – 34)	0,637
Reticulócitos (%)	6,8 (6,2 – 7,4)	3,4 (3,1 – 3,9)	< 0,001

Os parâmetros analisados foram número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e porcentagem de reticulócitos. Valores expressos em mediana e intervalos interquartílicos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística por teste de Mann-Whitney.

Tabela 16 - Valores da série leucocitária em animais controle e desnutridos

Parâmetros	Controle (n=8)	Desnutrido (n=14)	*p valor*
Leucócitos ($/mm^3$)	2.000 (1.300 – 2.850)	650 (300 – 950)	< 0,050
Neutrófilos segmentados ($/mm^3$)	205 (139 – 487)	192 (114 – 232)	0,393
Linfócitos ($/mm^3$)	1.820 (1154 – 2283)	693 (377 – 963)	< 0,050
Monócitos ($/mm^3$)	15 (0 – 45)	8 (0 – 11)	0,1116
Eosinófilos ($/mm^3$)	15 (0 – 44)	1,5 (0 – 9)	0,217
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	747 (676 – 830)	629 (500 – 685)	< 0,050

Valores expressos em mediana e intervalos interquartílicos. Análise estatística por teste de Mann-Whitney. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

4.4 Células totais da medula óssea e mielograma

Verificou-se redução significativa da celularidade da medula óssea dos animais do grupo desnutrido em relação aos animais grupo controle (**Figura 11**), indicando um quadro de hipoplasia medular.

A análise morfológica diferencial das células da MO demonstrou redução significativa do número de blastos e células das linhagens granulocítica, linfocitária, eritroide e plaquetária nos camundongos desnutridos (**Tabela 17**).

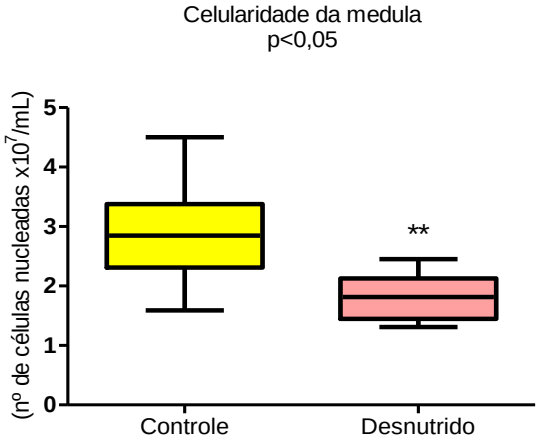


Figura 11 – Valores do número total de células da medula óssea dos animais do grupo controle (n=5) e dos animais do grupo desnutrido (n=10). O n indica o número de animais utilizados no experimento. Valores expressos em mediana e intervalos interquartílicos. Análise estatística por teste de Mann- Whitney.

Tabela 17 - Valores absolutos das populações celulares presentes na medula óssea

Célula	**Controle (n=5) (10^6/mL)**	**Desnutrido (n=5) (10^6/mL)**	***p* valor**
Blastos	0,78 (0,56 – 1,32)	0,17 (0,09 – 0,44)	<0,050
Neutrófilos imaturos	0,78 (0,56 – 1,32)	0,17 (0,11 – 0,44)	<0,050
Neutrófilos em anel	2,06 (1,59 – 2,54)	0,83 (0,34 – 1,14)	<0,010
Neutrófilos segmentados	6,73 (6,44 – 8,40)	4,69 (2,36 – 6,42)	<0,050
Eosinófilos	0,67 (0,57 – 0,88)	0,58 (0,21 – 1,33)	0,8413
Linfócitos	2,69 (1,39 – 4,47)	1,38 (1,24 – 2,58)	<0,050
Monócitos/macrófagos	0,23 (0,10 – 0,33)	0,04 (0,02 – 0,11)	<0,050
Eritroblastos imaturos	0,78 (0,72 – 1,41)	0,47 (0,26 – 0,58)	<0,050
Eritroblastos	6,65 (5,06 – 8,05)	4,97 (3,99 – 6,28)	0,1508
Plasmócitos	0,01 (0,01 – 0,02)	0,01 (0,01 – 0,06)	1,000
Linhagem megacariocítica	0,49 (0,19 – 0,55)	0,11 (0,09 – 0,13)	<0,010

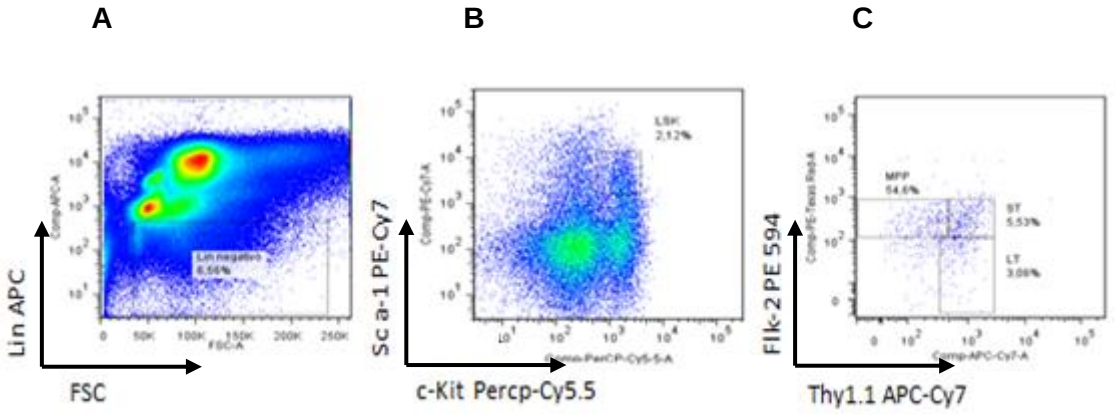
Valores do número de blastos, neutrófilos imaturos (promielócito, mielócito e metamielócito), neutrófilos em anel, neutrófilos segmentados, linfócitos, monócitos, macrófagos, eritroblastos imaturos (proeritroblasto e eritroblasto basófilo), eritroblastos (policromáticos e ortocromáticos), plasmócitos e linhagem megacariocítica dos animais do grupo controle (n=5) e desnutrido (n=5). Resultados expressos em mediana e intervalos interquartílicos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística por teste de Mann- Whitney.

4.5 Quantificação das células células-tronco hemopoéticas (CTH)

A utilização da estratégia de seleção das populações de CTH em células-tronco hemopoéticas de longa duração (LT-CTH), células-tronco de curta duração (CT-CTH) e progenitores multipotentes (PMP) foi realizada por citometria de fluxo a partir da seleção da população de células que não expressavam marcadores hemopoéticos, todos conjugados ao fluorocromo APC. A partir das células Lin^- foram selecionadas as células que expressavam os antígenos c-Kit e Sca-1. Esta população também denominada LSK contém as subpopulações LT-CTH (Lin^-/c-Kit^+/Sca-1^+/Flk-2^-/CD90.1^{fraco}), CT-CTH (Lin^-/c-Kit^+/Sca-1^+/Flk-2^+/CD90.1^{fraco}) e PMP (Lin^-/c-Kit^+/Sca-1^+/Flk-2^+/CD90.1^-) (**Figura 12**).

Verificou-se menor porcentagem de células LSK, LT-CTH, CT-CTH e PMP no grupo desnutrido em comparação ao grupo controle (**Figura 13**).

Grupo controle



Grupo desnutrido

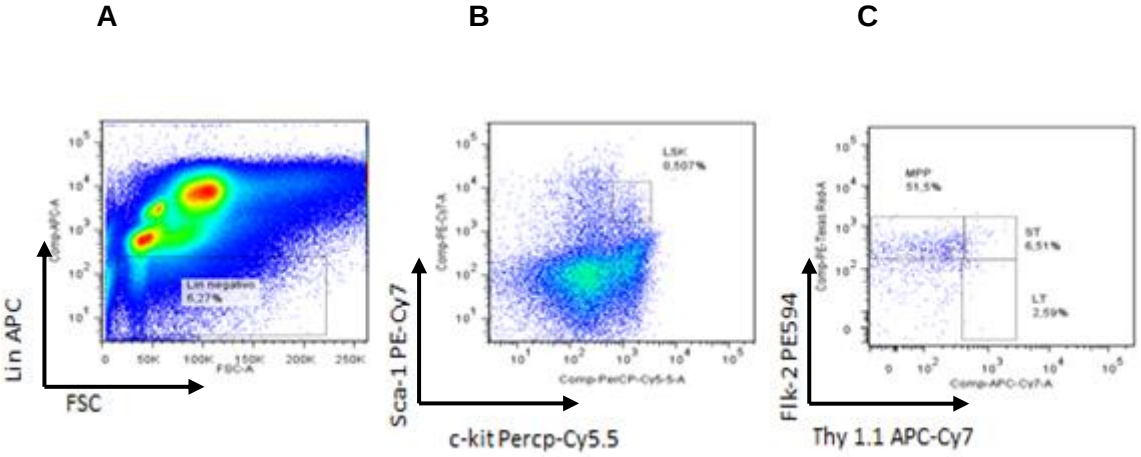


Figura 12 – Estratégia de seleção das populações de LT-CTH, CT-CTH e PMP da medula óssea de camundongos controle e desnutrido. A partir do gráfico (A) foi selecionada a população que não expressa marcadores hemopoéticos denominada Lin-. Em (B) foi selecionada a população celular duplamente positiva para c-Kit e Sca-1 denominada LSK. Em (C) foram determinadas as populações celulares de LT-CTH (Flk-2^{-}/CD90.1^{fraco}), CT-CTH (Flk-2^{+}/CD90.1^{fraco}) e PMP (Flk-2^{+}/CD90.1^{-}). Aquisição realizada em FACSAria III® (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) e análise da população total adquirida em programa FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA). Resultados representativos de um ensaio com 4 animais do grupo controle e 4 animais do grupo desnutrido. Célula-tronco de longa duração (LT-CTH), célula-tronco de curta duração (CT-CTH), progenitores multipotentes (PMP) e células que não expressam marcadores da linhagem hemopoética e expressam Sca-1 e c-Kit (LSK).

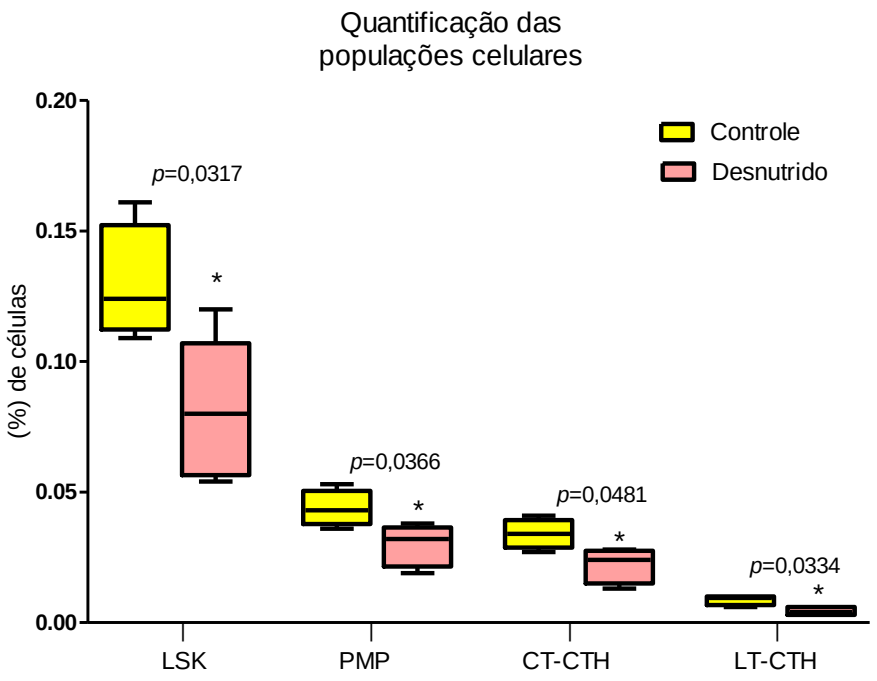


Figura 13 - Gráficos da porcentagem de células LSK, PMP, CT-CTH e LT-CTH obtidas por imunofenotipagem das células da medula óssea dos animais dos grupos controle (n=4) e desnutrido (n=5). Análise estatística por teste de Mann-Whitney; n indica o número de animais utilizados no experimento. Célula-tronco de longa duração (LT-CTH), célula-tronco de curta duração (CT-CTH), progenitores multipotentes (PMP) e células que não expressam marcadores da linhagem hemopoética e expressam Sca-1 e c-Kit (LSK).

4.6 Avaliação do ciclo celular das células-tronco hemopoéticas (CTH) por citometria de fluxo

A análise dos resultados obtidos pelos ensaios de citometria de fluxo indicou que a DP interferiu na dinâmica de progressão do ciclo celular. Houve aumento significativo da porcentagem de células LSK e LT-CTH em G0/G1 do ciclo celular (sendo que em G0 estão as células quiescentes) nos animais desnutridos quando comparados aos animais controle (**Figuras 14A e 14C**). De modo inverso, observamos aumento da porcentagem de células nas fases mais tardias do ciclo celular (S/G2/M). A análise destas fases nas células ST-CTH (p=0,0743) e PMP (p=0,1069) não revelou diferença estatística significativa (**Figuras 14 B e 14D**).

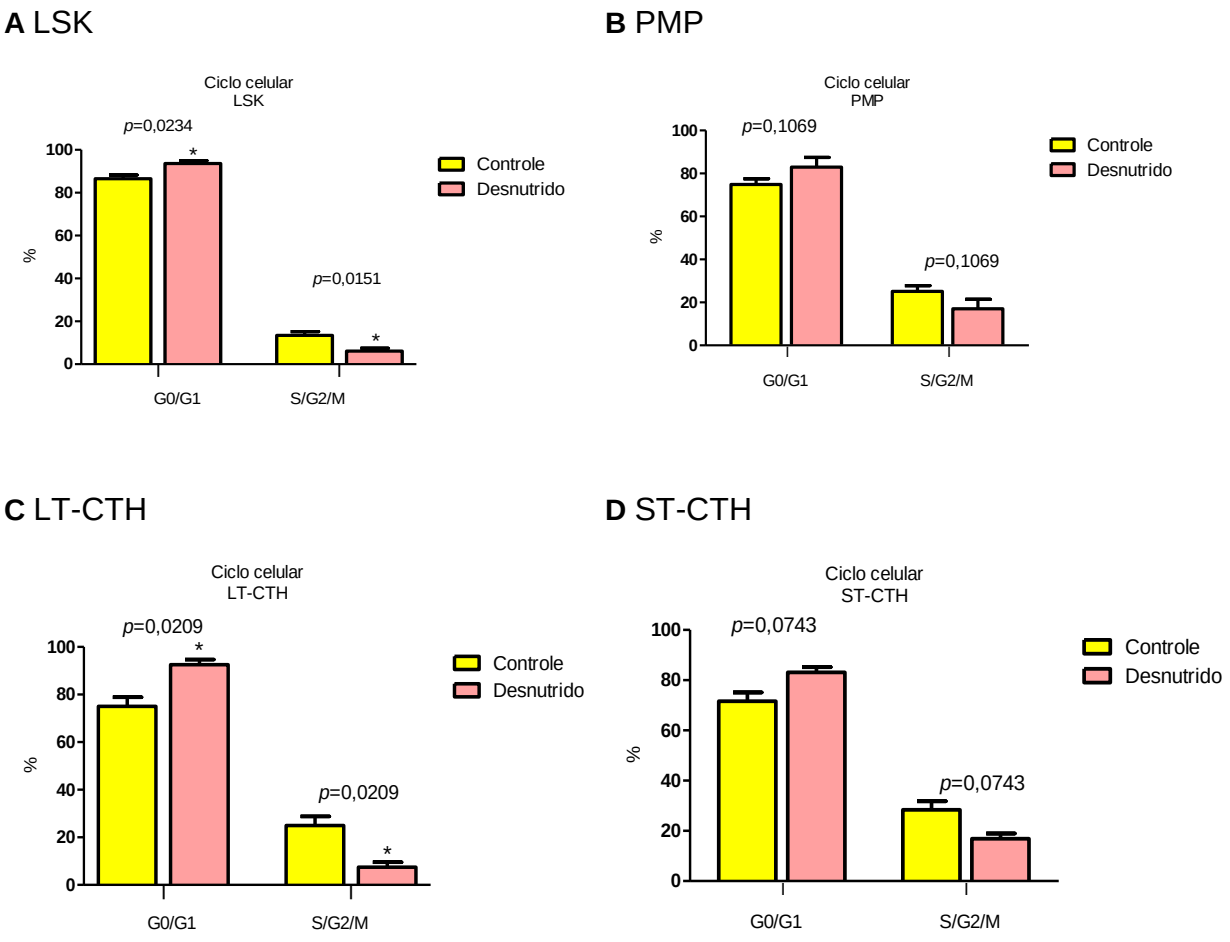


Figura 14: Gráficos das porcentagens de células (**A**) LSK, (**B**) LT-CTH, (**C**) CT-CTH e (**D**) PMP nas fases G0/G1 e S/G2M do ciclo celular nos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=5). As fases do ciclo celular foram quantificadas pelo uso do marcador de DNA Sytox Green® (Carlsbad, Califórnia, EUA), Análise estatística por teste t. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Célula-tronco de longa duração (LT-CTH), célula-tronco de curta duração (CT-CTH), progenitores multipotentes (PMP) e células que não expressam marcadores da linhagem hemopoética e expressam Sca-1 e c-Kit (LSK).

4.7 Avaliação da expressão proteica de CD44, Cxcr4, Notch-1 e Tie-2 em células-tronco hemopoéticas da medula óssea por citometria de fluxo

Em relação aos receptores presentes nas CTH CD44, Notch, Cxcr4 e Tie-2 foram analisadas as populações celulares LSK e LT-CTH. Observou-se que as populações LSK e LT dos animais desnutridos apresentaram diminuição significativa da intensidade de fluorescência para o receptor CD44 que é o ligante de OPN produzida pelos osteoblastos e de ácido hialurônico produzido pelas células

estromais da MO. Não foram observadas alterações na expressão dos receptores Notch-1, Cxcr4 e Tie-2 (**Figura 15**).

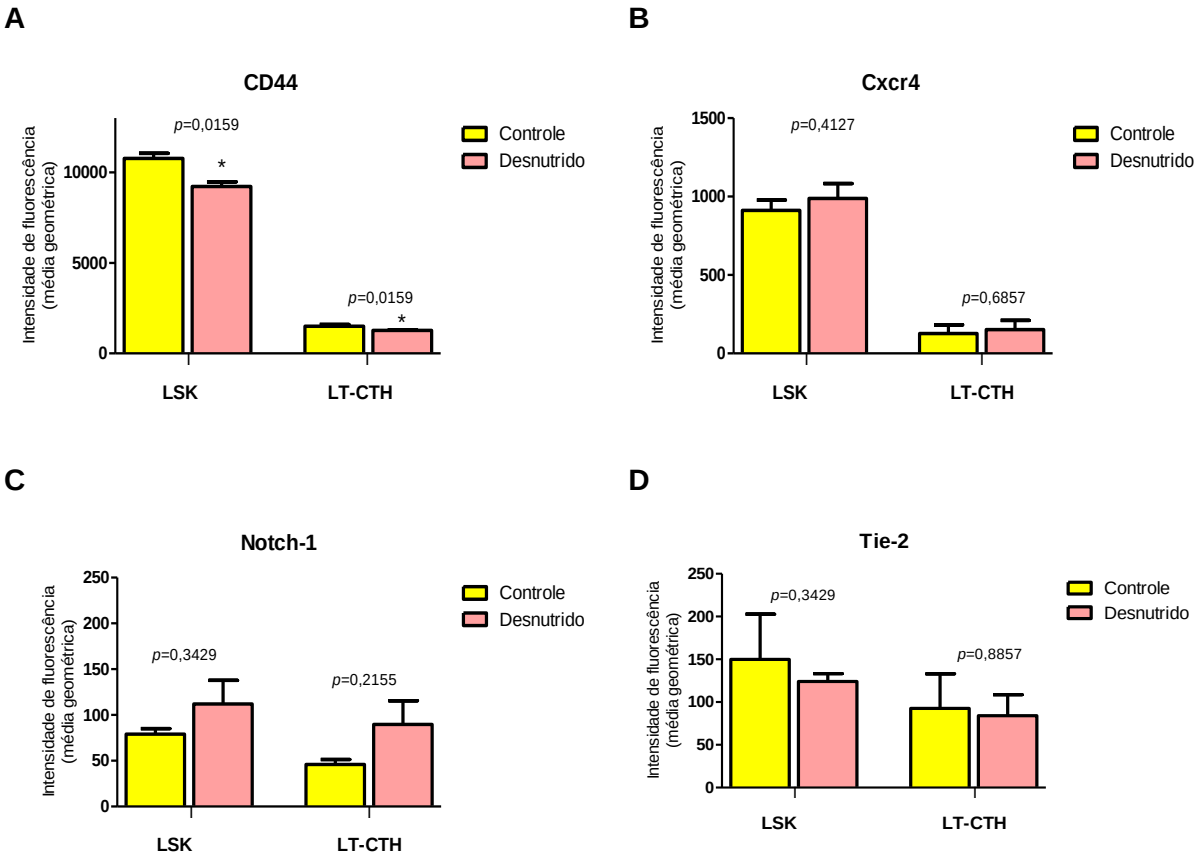


Figura 15 - Gráficos das intensidades de fluorescência expressas pelos receptores CD44, Notch-1, Cxcr4 e Tie-2 nas células LSK e LT-CTH da medula óssea dos grupos controle (n=4) e desnutrido (n=5). Análise estatística por teste de Mann-Whittney. O n indica o número de animais utilizados nos experimentos. Células que não expressam marcadores da linhagem hemopoética e expressam Sca-1 e c-Kit (LSK) e célula-tronco de longa duração (LT-CTH).

4.8 Isolamento das células-tronco hemopoéticas de longa duração (LT-CTH) da medula óssea

Previamente ao *sorting* foi realizada a seleção da população de interesse. Primeiramente foi realizada a exclusão de células agrupadas (*doublets*) utilizando-se os parâmetros FSC-A x FSC-H. Em seguida, foi selecionada a população celular que não expressa marcadores hemopoéticos (Lin^-). A partir desta população foram selecionadas as células duplamente positivas para c-Kit e Sca-1, denominada população LSK. E finalmente, a partir da população LSK foram criadas duas novas

janelas eletrônicas. Para caracterizar as células LT-CTH consideramos as células fracamente positivas paraThy1.1 e negativas para Flk-2 (**Figura 16**). As células LT-CTH isoladas foram recolhidas e utilizadas para avaliação da expressão gênica conforme descrito no item 4.11.

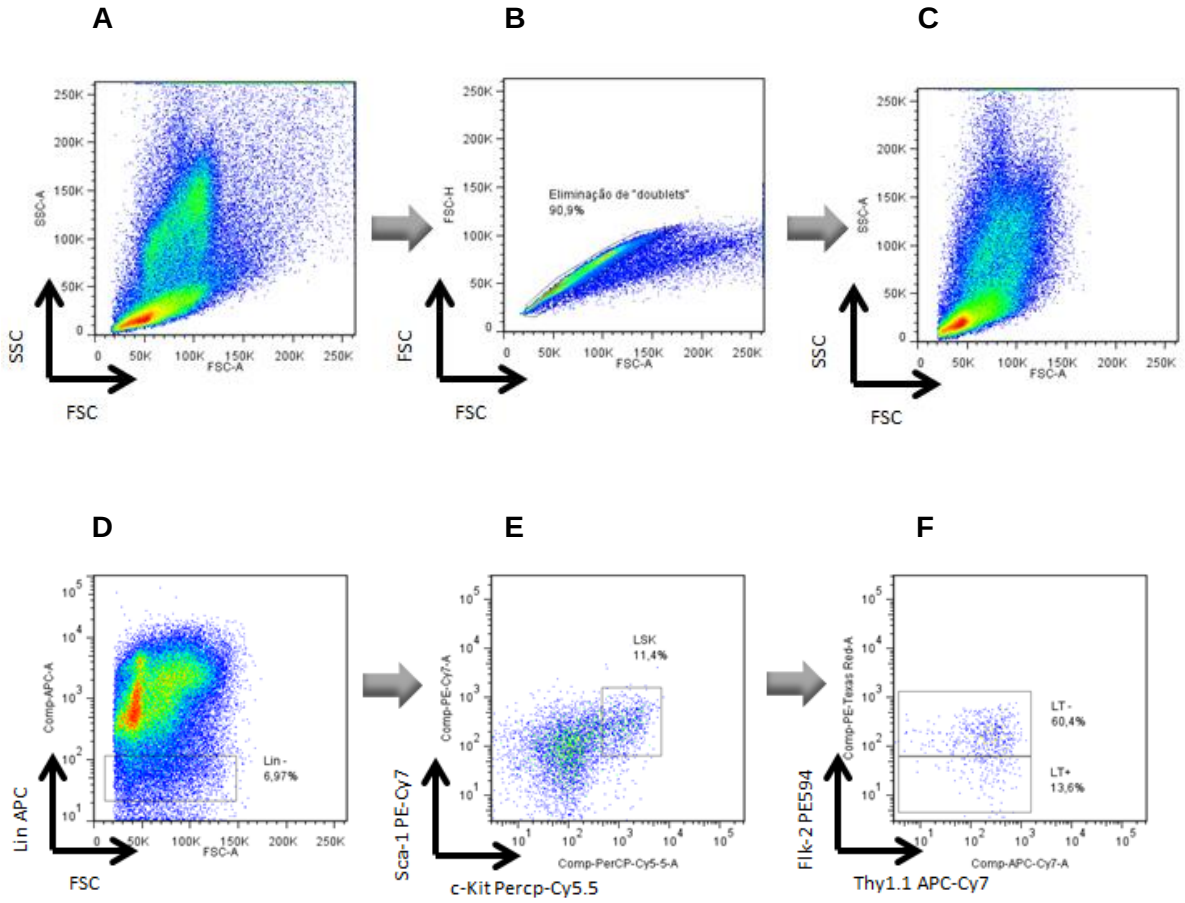
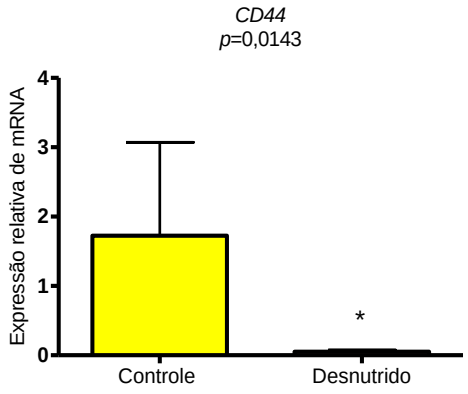


Figura 16 - Gráficos *dot plots* representativos da estratégica de seleção da população LT-CTH. **(A)** FSC x SSC. **(B)** Eliminação de *doublets*. **(C)** FSC x SSC após eliminação de *doublets*. **(D)** Seleção da população Lin-. **(E)** Seleção da população LSK. **(F)** Seleção das populações LT+ e LT-. Gráficos representativos de (n=5) animais controles e (n=5) animais desnutridos. Aquisições realizadas em FACS Aria III® (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) e análise da população total adquirida em programa FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA). Células que não expressam marcadores da linhagem hemopoética e expressam Sca-1 e c-Kit (LSK) e célula-tronco de longa duração (LT-CTH).

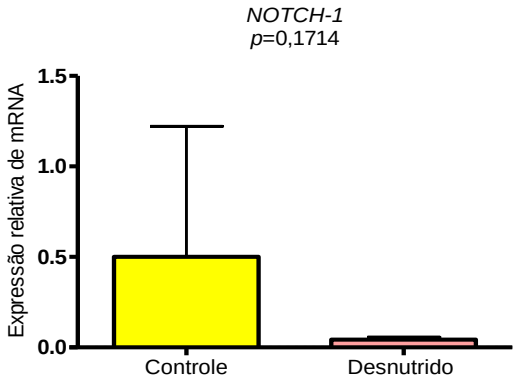
4.9 Avaliação da expressão gênica de CD44, Cxcr4 (*CXCR4*) e Notch-1 (*NOTCH-1*) nas células-tronco hemopoéticas de longa duração (LT-CTH) da medula óssea, ex vivo, por PCR em tempo real.

Foram avaliadas as expressões dos genes *CD44*, *CXCR4* e *NOTCH-1* nas células LT-CTH. Observamos menor expressão de *CD44* nas células LT-CTH dos animais desnutridos o que corrobora o nosso dado da menor expressão proteica observada pela citometria de fluxo (**Figura 15**). A expressão gênica de *NOTCH-1* também se mostrou diminuída nos animais desnutridos, entretanto, não foi estatisticamente significativa. Em relação à expressão gênica de *CXCR4* não verificamos diferença significativa entre os grupos (**Figura 17**).

A



B



C

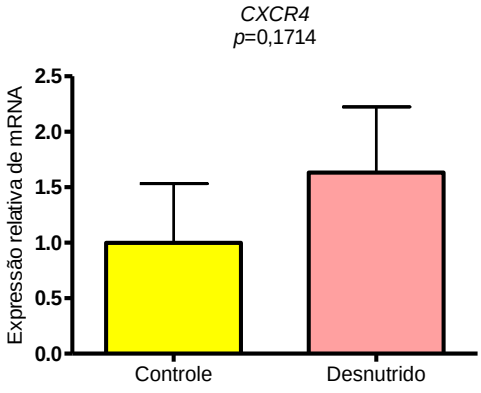


Figura 17 – Resultados da expressão gênica nas células LT-CTH, *ex vivo*, por PCR em tempo real. (**A**) expressão de *CD44*, (**B**) expressão de *NOTCH-1* e **(C**) expressão de *CXCR4* dos grupos controle (n=4) e desnutrido (n=4). Análise estatística por teste de Mann-Whitney; n indica o número de animais utilizados no experimento. Célula-tronco de longa duração (LT-CTH).

4.10 Dosagem de cálcio e fósforo

Não foram observadas diferenças significativas nas concentrações séricas de fósforo e cálcio entre os grupos controle e desnutrido. A concentração de cálcio nos animais controle foi de 7,99g/dL ± 0,25 e nos animais desnutridos foi de 7,42 g/dL ± 0,53. A concentração de fósforo nos animais controle foi de 6,13g/dL ± 0,43 e para os animais desnutridos foi 5,92g/dL ± 0,43 (**Figura 18**).

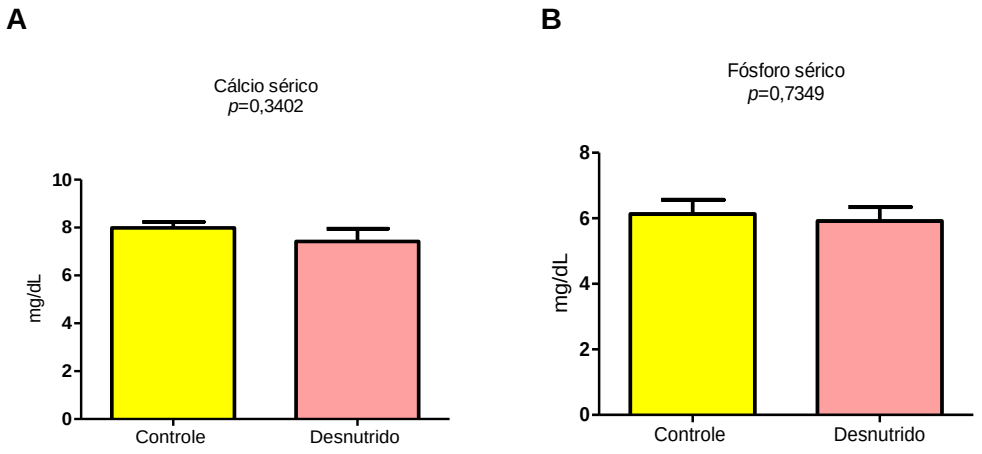


Figura 18 - **(A)** Valores das concentrações séricas de cálcio (mg/dL) e **(B)** fósforo (mg/dL) de camundongos do grupo controle (n=20) e do grupo desnutrido (n=20). O n indica o número de animais utilizados no experimento. Valores expressos em média ± SEM. Análise estatística por teste t.

4.11 Dosagem de paratormônio (PTH)

Não foram encontradas diferenças significativas nos resultados da concentração plasmática de PTH entre os grupos controle e desnutrido. A concentração de PTH no grupo controle foi de 98,07pg/mL (79,79-124,70) e de 91,99 pg/mL (80,24-117,10) para os animais do grupo desnutrido (**Figura 19**).

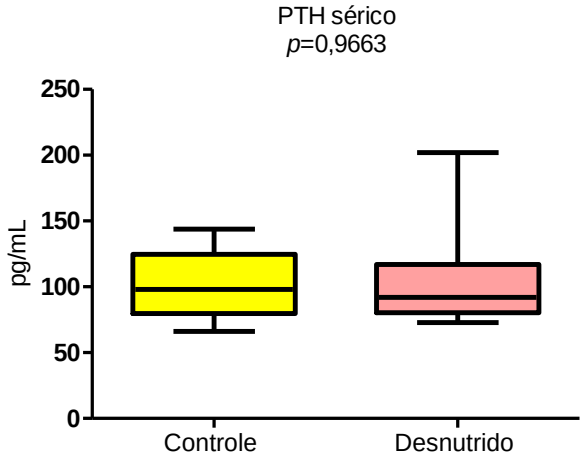


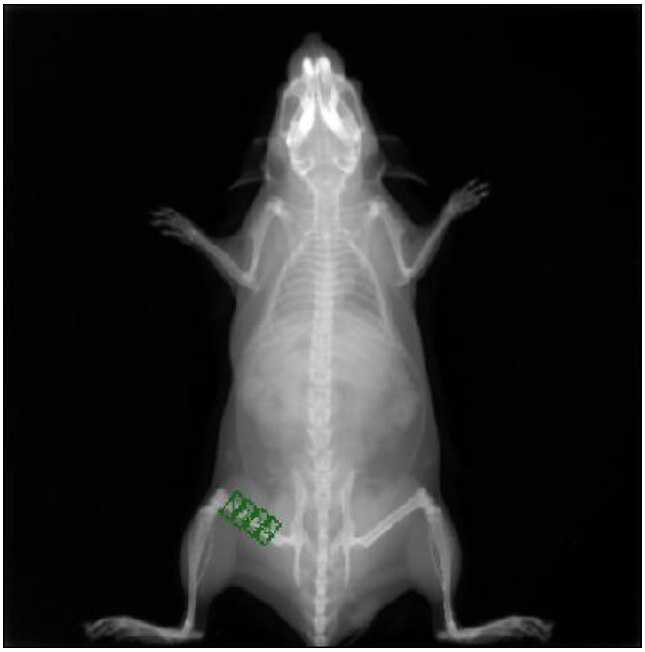
Figura 19 - Valores das concentrações séricas de PTH (pg/dL) dos animais do grupo controle (n=7) e do grupo desnutrido (n=12). O n indica o número de animais utilizados no experimento. Valores expressos em mediana e intervalo interquatílico. Análise estatística por teste de Mann-Whitney.

4.12 Avaliação da densidade mineral óssea do fêmur

As imagens de raios-X dos animais controle e desnutridos, obtidas como os mesmos parâmetros de aquisição, estão representadas na **Figura 20**. O equipamento utiliza o princípio de atenuação de feixes de raios-X que atravessam estruturas de diferentes densidades e são captados por detectores sensíveis à radiação. Assim, estruturas densas como o osso, com graus de atenuação extremos contrastam-se com estruturas como a medula óssea na cavidade dos ossos.

A análise das imagens foi realizada utilizando-se programa de análise de DMO. As análises das regiões 1, 2, 3 e 4 a partir da epífise distal em direção a epífise proximal dos animais dos grupos controle (n=8) e desnutrido (n=11) revelou diminuição da densidade óssea das regiões 1, 2, 3 e 4 dos animais desnutridos quando comparadas aos animais do grupo controle, conforme mostra a **Figura 21**.

A



B

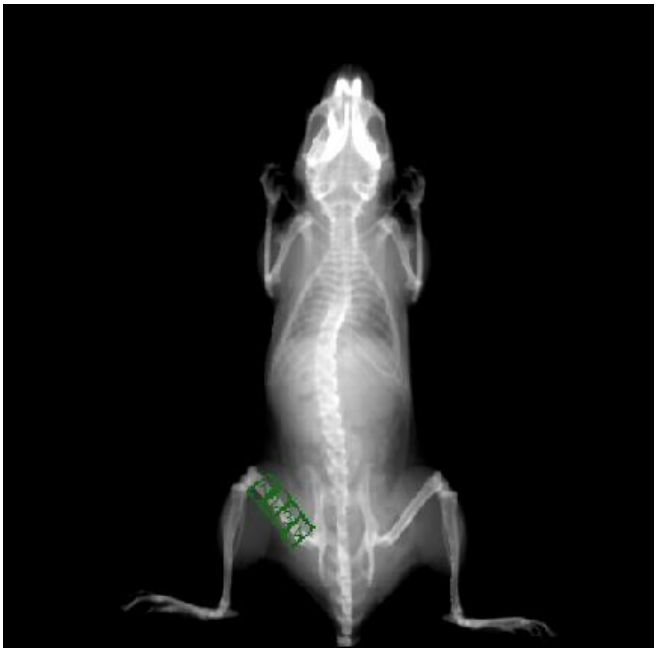


Figura 20 - Imagens de raios-X dos animais. **(A)** controle e **(B)** desnutrido. Imagens representativas de um grupo de 8 animais controle e 10 desnutridos. Em verde estão delimitadas as quatro regiões de interesse. Imagens obtidas no equipamento MS FX® (Carestream Health, Toronto, Canadá)

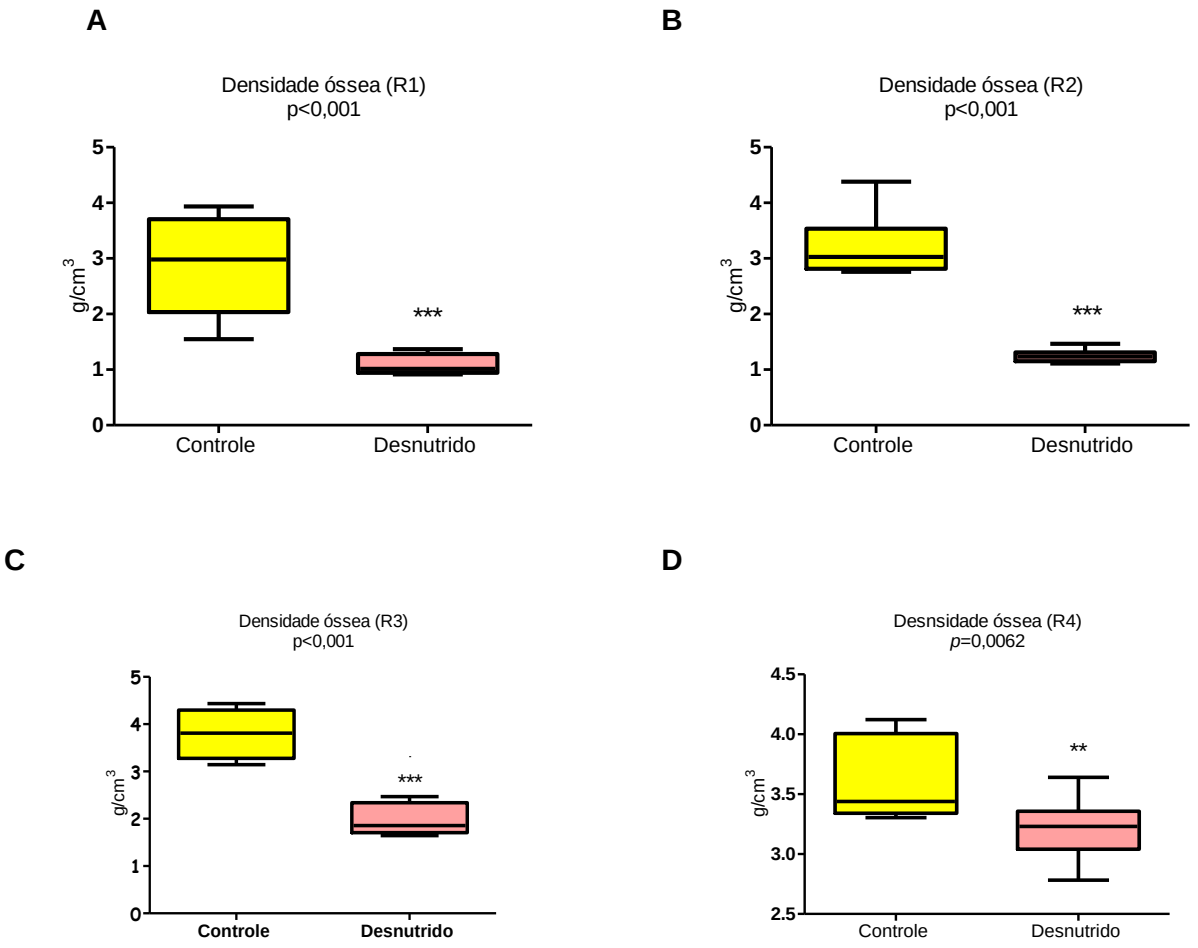


Figura 21 - Gráficos dos valores de densidade óssea expressos em g/cm^3, das regiões femorais **(A)** R1, **(B)** R2, **(C)** R3 e **(D)** R4 dos animais do grupo controle (n=8) e desnutrido (n=10). Valores expressos em mediana e intervalos interquartílicos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística por teste Mann-Whitney.

4.13 Avaliação da densidade medular do fêmur

Em relação à densidade da medula óssea observou-se diminuição da densidade medular nas regiões R3 e R4 dos animais desnutridos em comparação aos animais do grupo controle, conforme **figura 22**.

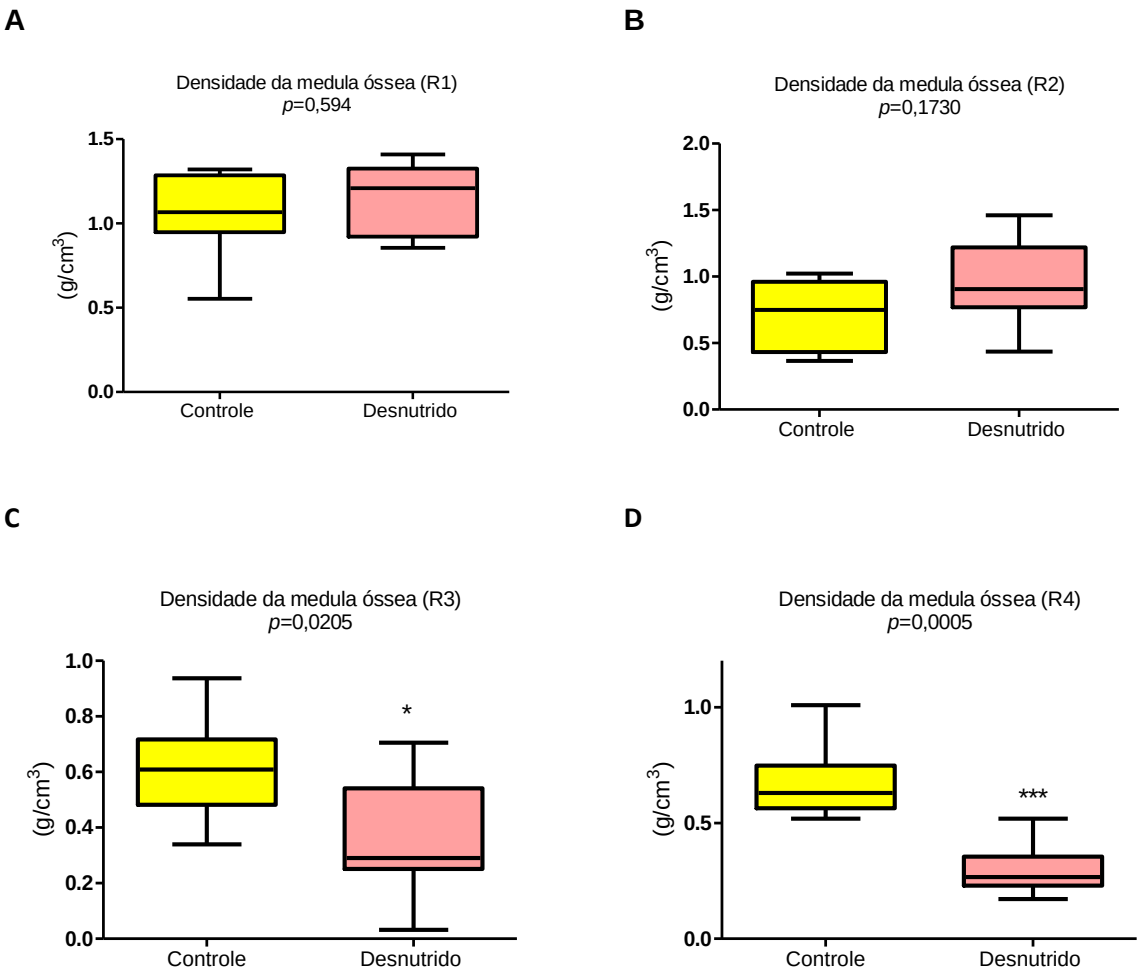


Figura 22 - Gráficos dos valores da densidade da medula óssea expressos em g/cm^3, das regiões femorais **(A)** R1, **(B)** R2, **(C)** R3 e **(D)** R4 dos animais do grupo controle (n=8) e desnutrido (n=10). Valores expressos em mediana e intervalos interquartílicos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística por teste Mann-Whitney.

4.14 Avaliação do diâmetro da cortical do fêmur

O diâmetro da região cortical do femur foi calculado a partir da diferença entre a medida do diâmetro externo e interno expressos pelo programa de análise da densidade óssea. Não foram observadas diferenças no diâmetro da cortical das quatro regiões analisadas nos grupos controle e desnutrido (**Tabela 18**).

Tabela 18 - Valores do diâmetro da cortical do fêmur em animais controle e desnutridos

Diâmetro da cortical	Controle (n=8)	Desnutrido (n=10)	p valor
R1 (cm)	0,043 (0,033 – 0,050)	0,045 (0,033 – 0,049)	0,965
R2 (cm)	0,041(0,032 – 0,050)	0,044 (0,038 – 0,047)	0,965
R3 (cm)	0,038 (0,032 – 0,042)	0,043 (0,037 – 0,046)	0,277
R4 (cm)	0,041 (0,036 – 0,044)	0,041 (0,032 – 0,044)	0,562

Valores do diâmetro da cortical das regiões R1, R2, R3 e R4 dos animais do grupo controle (n=8) e desnutrido (n=10) expressos em mediana e intervalo interquartílico. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística por teste Mann-Whitney.

4.15 Análise morfométrica das regiões cortical e trabecular do fêmur

A análise microtomográfica da região cortical dos fêmures dos animais desnutridos demonstrou diminuição significativa dos parâmetros T.Ar (área média das seções transversais da amostra), T.Pm (perímetro do perósteo) e B.Pm (perímetro do endósteo) em relação ao grupo controle. Entretanto, não houve diferença nos valores de B.Ar (área média do tecido ósseo das seções transversais da amostra), conforme tabela 16. Os parâmetros citados estão relacionados com a resistência óssea e a ocorrência de fraturas, sendo que a diminuição do perímetro ósseo e a diminuição da área óssea estão associados ao maior risco de fraturas (ALELE et al., 2011).

Em relação à análise da região trabecular (**Figura 23**), a razão BV/TV (volume ósseo/ volume total) é utilizada para caracterizar a quantidade de massa óssea e representa o teor mineral da amostra que neste caso foi significativamente menor nos animais desnutridos 1,404 (0,924 – 2,133) quando comparada aos animais controles 4,815 (3,847 – 6,028).

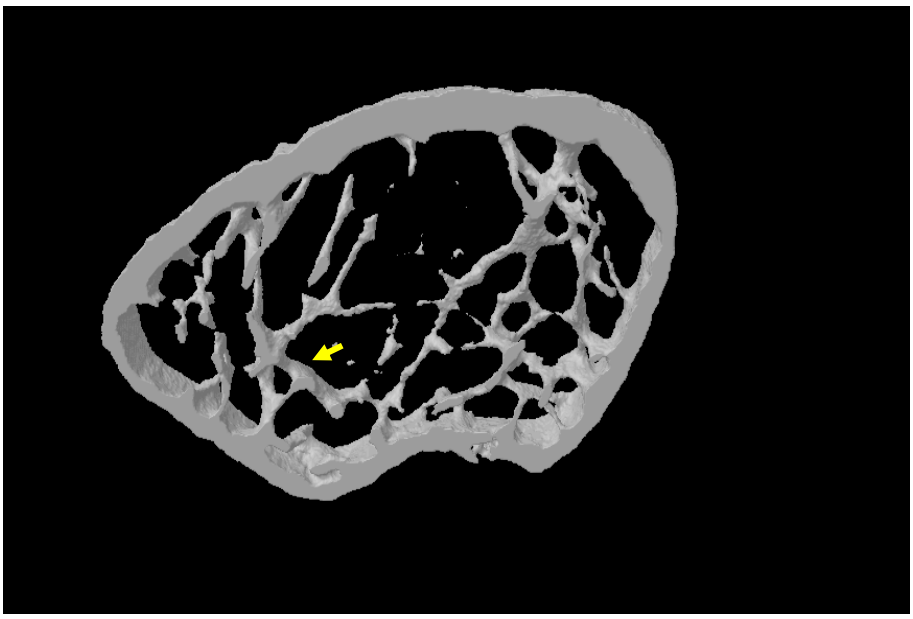
O número de trabéculas (Tb.N) é dado pelo inverso da distância entre o eixo médio das trabéculas e encontra-se menor nos animais desnutridos 0,297 (1/mm) (0,10 – 0,429) quando comparados aos dos animais controles 0,925 (1/mm) (0,755 – 1,134). A diminuição do número de trabéculas está presente em animais osteoporóticos (CESAR et al., 2013).

Também se verificou prevalência de trabéculas ósseas em formato de hastes nos fêmures dos animais desnutridos, resultado obtido pela análise do parâmetro SMI de 2,782 (2,694 – 2,873) em comparação aos fêmures dos animais controles 2,443 (2,361 – 2,528). O SMI envolve a medição da convexidade da superfície óssea. Este parâmetro é importante para se avaliar a degradação do osso trabecular, que se caracteriza pela transição da arquitetura do tipo placa para o tipo haste, com valores mais elevados para animais osteoporóticos. Em relação à distância entre as trabéculas, observou-se aumento da distância entre as mesmas nos fêmures dos animais desnutridos e este parâmetro encontra-se elevado em animais osteoporóticos (CESAR et al., 2013).

A espessura das trabéculas (Tb.Th) é calculada utilizando-se esferas cujo diâmetro deve preencher a estrutura trabecular e encontra-se elevada em animais osteoporóticos, embora os animais desnutridos tenham apresentado valores diminuídos deste parâmetro, não houve diferença significativa entre os grupos.

As trabéculas ósseas encontram-se preferencialmente orientadas segundo a direção das tensões máximas aplicadas, o que origina uma distribuição anisotrópica da resistência e rigidez do osso, ou seja, estas propriedades variam com a direção considerada. O grau de anisotropia (DA) que quantifica a irregularidade da geometria das trabéculas geralmente tende a ter valor próximo a 1 nos casos de osteoporose, indicando completa anisotropia e quando DA é igual a 0 significa completa isotropia (CESAR et al., 2013). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos controle e desnutrido, conforme observado na **Tabela 19**, sugerindo que a variação de carga nos locais avaliados não comprometeu a orientação das trabéculas.

A



B

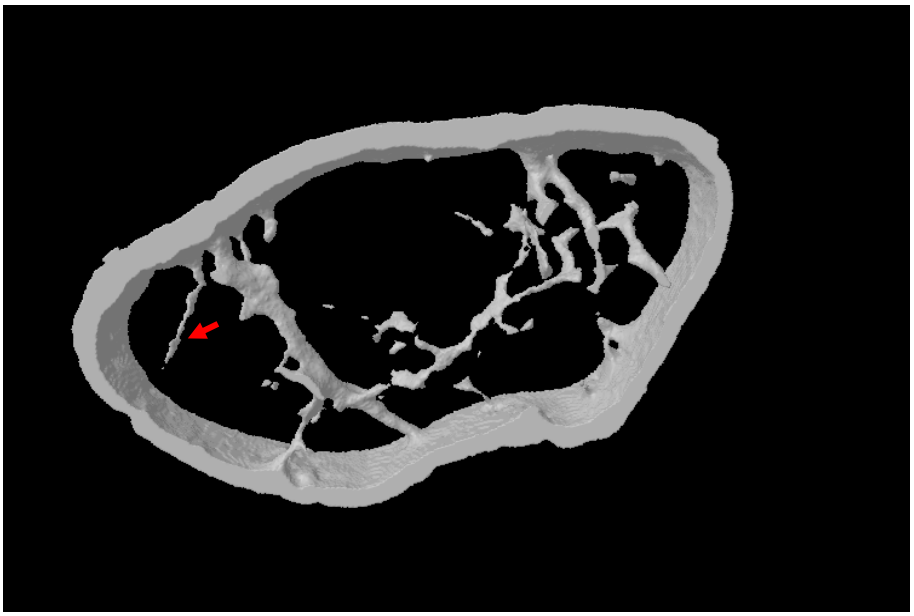


Figura 23 - Imagens representativas das regiões trabeculares do fêmur dos animais obtidas no µCT modelo 1172® (Skyscan, Aartselaar, Bélgica), indicando diminuição do número de trabéculas no animal desnutrido. **(A)** animal controle e **(B)** animal desnutrido. Seta amarela indica trabécula em formato de placa e seta vermelha indica trabécula em formato de haste.

Tabela 19 - Avaliação dos parâmetros ósseos das regiões cortical e trabecular do fêmur

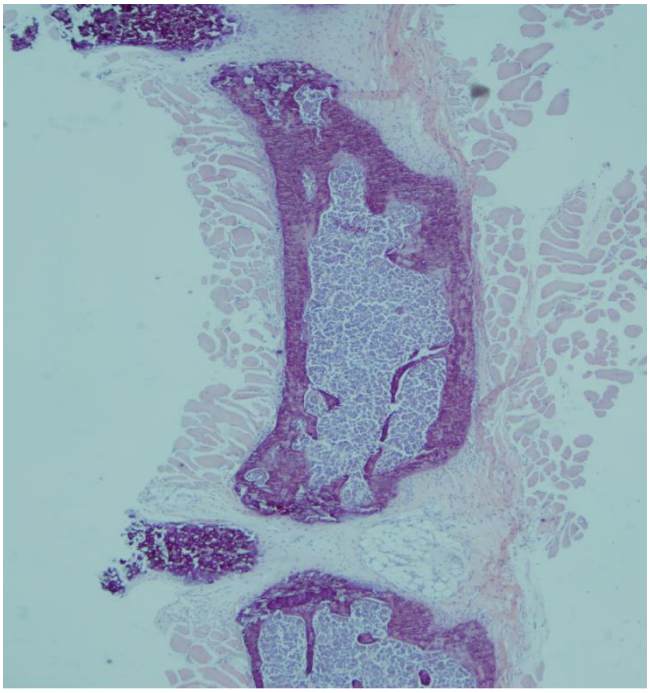
Parâmetro	Controle (n=8)	Desnutrido (n=8)	*p* valor
Cortical			
B.Pm (mm)	0,015 (0,012 – 0,015)	0,012 (0,011 – 0,013)	<0,050
T.Pm (mm)	0,014 (0,012 – 0,015)	0,011 (0,011 – 0,012)	0,066
B.Ar (mm^2)	1,041 (0,801 – 1,080)	0,741 (0,647 – 0,841)	<0,050
T.Ar (mm^2)	1,050 (0,811 – 1,093)	0,746 (0,653 – 0,819)	<0,050
Trabecular			
BV/TV	4,480 (4,048 – 6,098)	1,550 (0,852 – 1,960)	<0,001
Tb.Th (µm)	50,546 (49,183 – 54,630)	47,385 (44,759 – 51,680)	0,130
Tb.N (1/mm)	0,895 (0,802 – 1,080)	0,320 (0,190 – 0,435)	<0,001
Tb.S (µm)	404,1 (324,5 – 440,7)	480,2 (425,8 – 620,8)	<0,050
SMI	2,410 (2,375 – 2,530)	2,750 (2,690 – 2,880)	<0,001
DA	0,74 (0,70 – 0,78)	0,77 (0,72 – 0,85)	0,5271

Os parâmetros analisados na região cortical foram: perímetro do endósteo (B.Pm), perímetro do periósteo (T.Pm), área média do tecido ósseo das seções transversais (B.Ar), área média das seções transversais da amostra (T.Ar). Os parâmetros analisados na região trabecular foram: volume ósseo/volume total da amostra (BV/TV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N), espessura trabecular (Tb.S), índice de modelo estrutural) e grau de anisotropia (DA). Valores expressos em mediana e intervalos interquartílicos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Avaliação estatística por teste de Mann-Whitney.

4.16 Avaliação histológica de fêmures e esternos de animais controle e desnutrido corados com hematoxilina eosina (HE)

A coloração com HE permitiu avaliar a celularidade da MO, a presença de sinusoides sanguíneos e a distribuição das diferentes populações celulares que compõe e tecido mieloide. O corte histológico do esterno do animal desnutrido corado em HE não evidenciou hipoplasia medular, conforme observado nas **Figuras 24** e **25**, embora a avaliação quantitativa da celularidade medular tenha demonstrado que a MO de animais desnutridos estava significativamente reduzida (**Figura 11**).

A



B

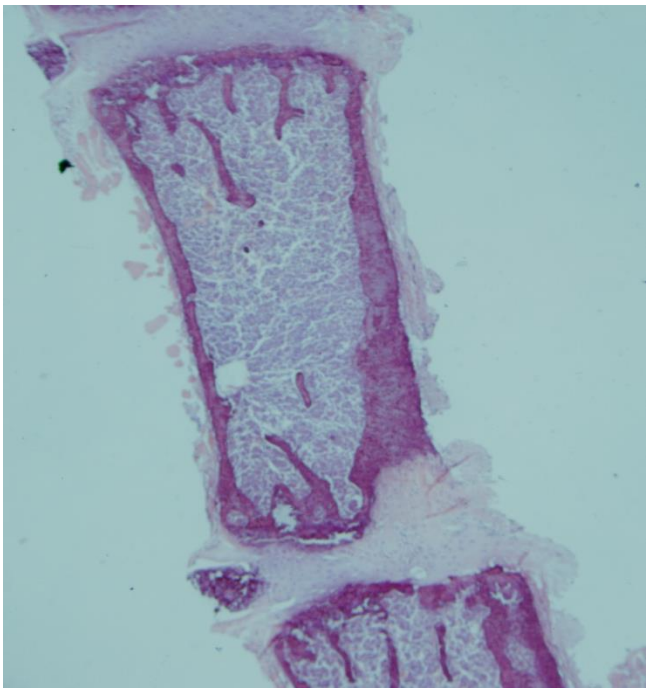
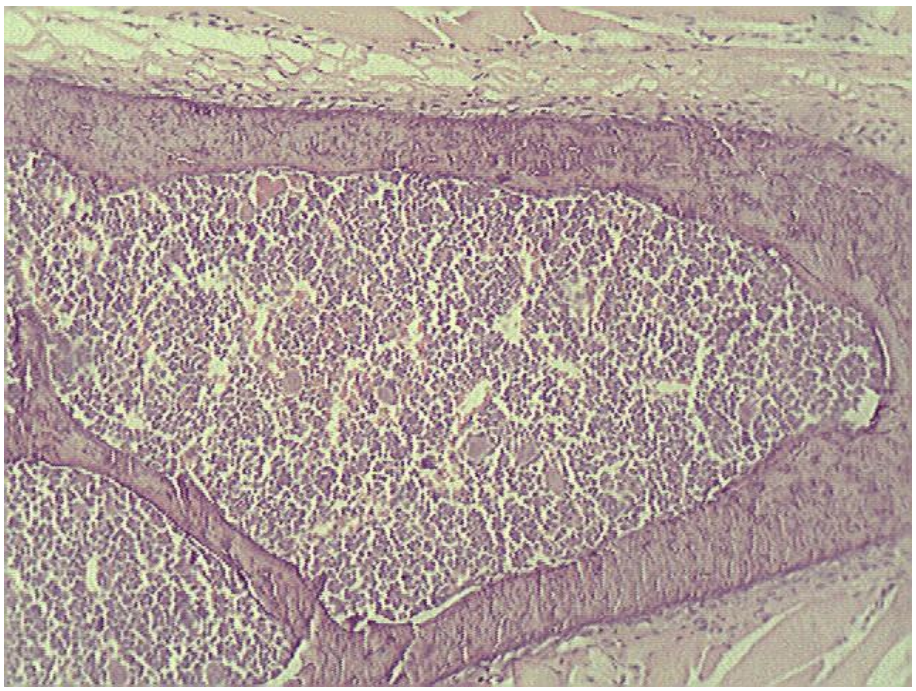


Figura 24 - Fotomicrografias de cortes histológicos longitudinais de esternos corados com HE. **(A)** corte do esterno de camundongo controle. **(B)** corte do esterno de camundongo desnutrido. Regiões entre as incisuras III e IV do corpo do esterno conforme descrição do item 5.9. Aumento de 4x. Fotomicrografia representativa de um experimento com n de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo desnutrido. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

A



B

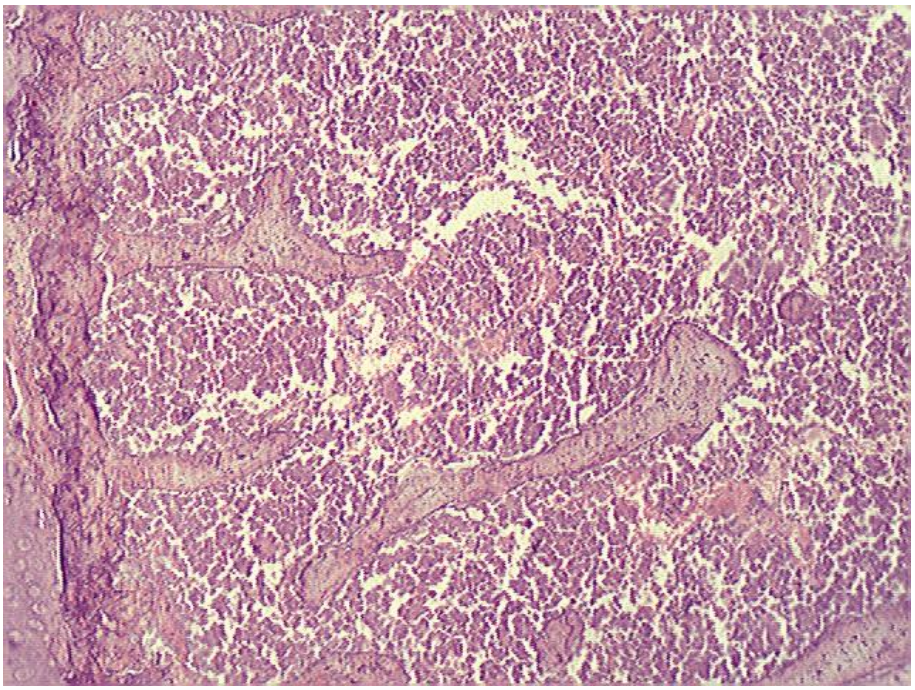
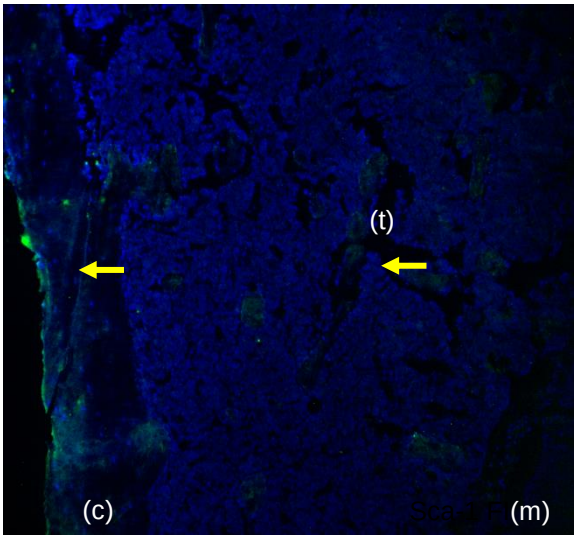


Figura 25 - Fotomicrografias de cortes histológicos longitudinais de medula óssea esternal corados com HE. **(A)** corte do esterno de camundongo controle e **(B)** corte do esterno de camundongo desnutrido. Aumento de 10x. Fotomicrografia representativa de um experimento com n de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo desnutrido. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

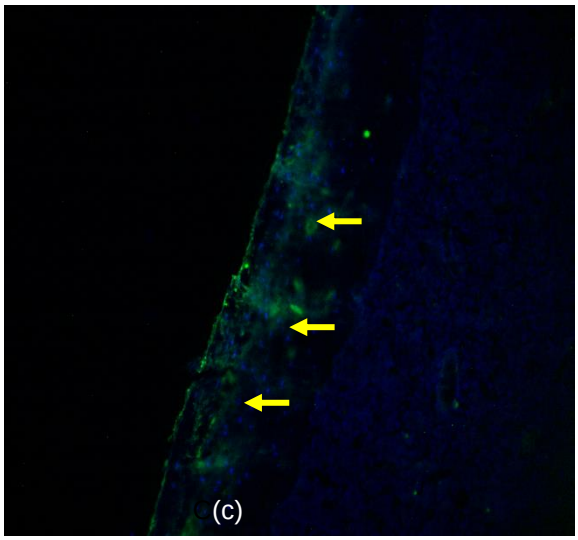
4.17 Detecção, por imunofluorescência, da osteopontina (OPN) em cortes histológicos de fêmur

A marcação para OPN (seta amarela) foi positiva para a região cortical e trabecular do fêmur do camundongo desnutrido. E nos animais do grupo controle, houve mínima marcação na cortical e ausência de marcação nas regiões trabeculares, conforme observado na **Figura 26**.

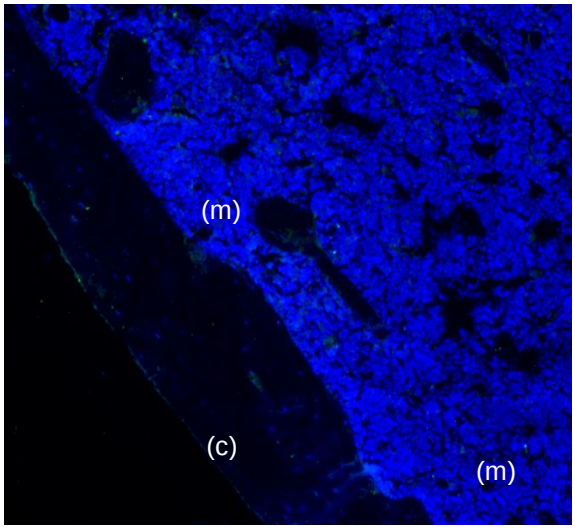
A Controle



B Desnutrido



C Controle



D Desnutrido

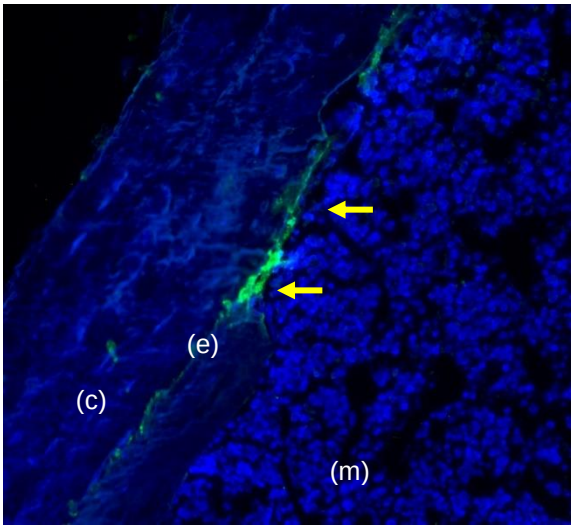


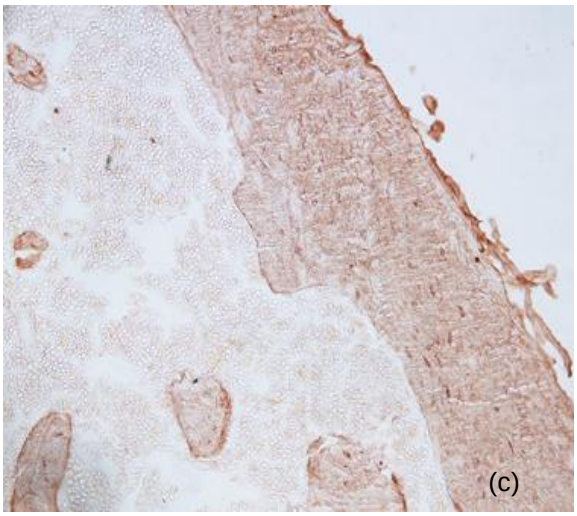
Figura 26 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando as regiões; (c) cortical, (e) endósteo, (t) trabecular e (m) medular, marcadas por imunofluorescência para osteopontina (verde) e DAPI (azul). **(A e C)** marcação de osteopontina (seta amarela) em camundongo controle. **(C e D)** marcação de osteopontina (seta amarela) em camundongo desnutrido. Resultados representativos de três experimentos com n de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo desnutrido. **(A e B)** Aumento de 10x. **(C e D)** Aumento de 20x. Imagens obtidas com aplicação de filtros UV-2EC para leitura do DAPI e Y-2EC para leitura do DyLight 550 em microscópio de fluorescência modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

4.18 Detecção, no fêmur, por imuno-histoquímica do colágeno tipo I, osteocalcina e osteonectina

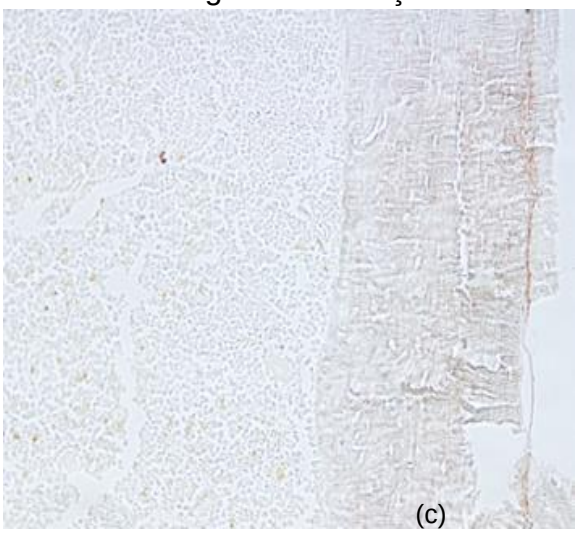
A positividade da marcação para colágeno tipo I foi maior para a região cortical (**Figura 27B**) e trabéculas (**Figura 28B**) nos cortes histológicos do fêmur do camundongo controle do que nas respectivas regiões dos cortes hitológicos dos fêmures dos animais desnutridos (**Figuras 27D e 28D**). Não se observou, conforme o previsto, a marcação nos controles negativos (**Figuras 27A, 27C, 28A e 28C**).

A Controle negativo da reação

B Grupo controle



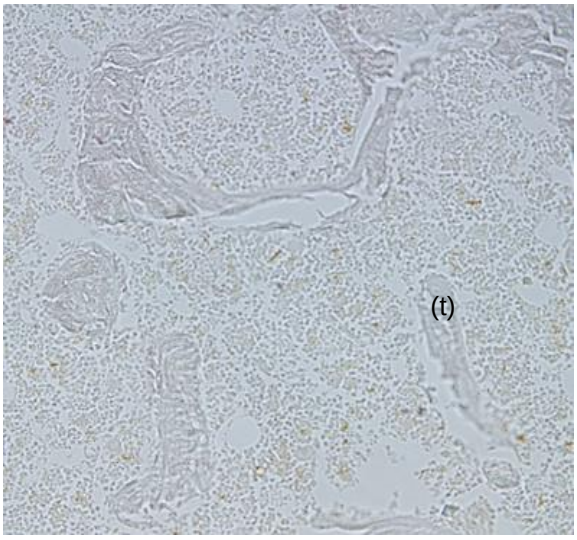
C Controle negativo da reação



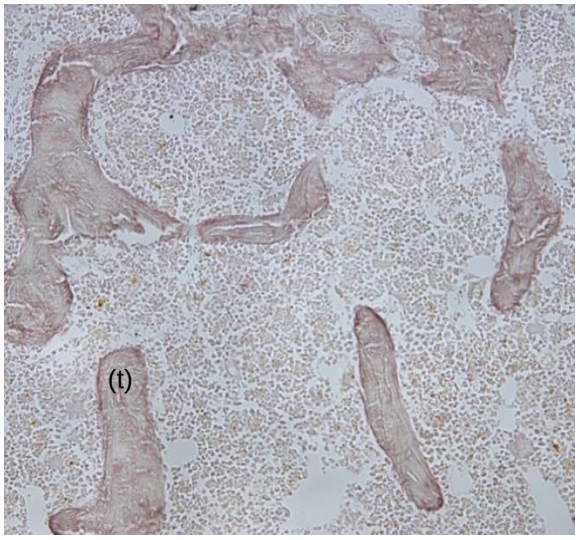
D Grupo desnutrido

Figura 27 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando regiões (c) cortical e (t) trabecular marcada por imuno-histoquímica para colágeno tipo I que se cora na cor castanha. **(A)** controle negativo da reação dos cortes histológicos do fêmur do animal controle **(B)** corte histológico do animal controle **(C)** controle negativo da reação do corte histológico do fêmur do animal desnutrido **(D)** desnutrido. Resultados representativos de um experimento com n de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo desnutrido. Aumento de 20x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

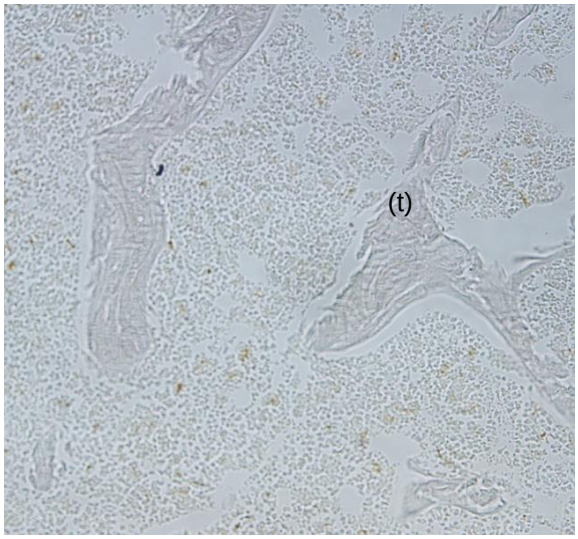
A Controle negativo da reação



B Grupo controle



C Controle negativo da reação



D Grupo desnutrido

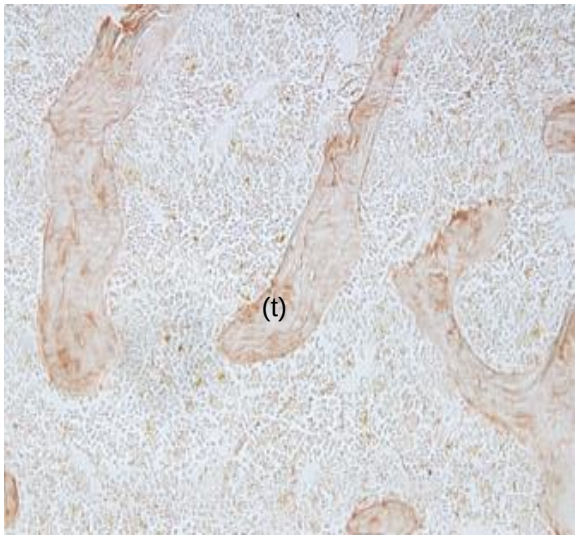
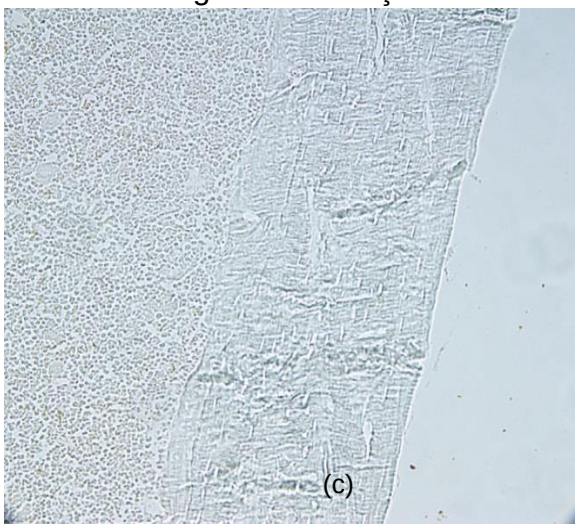


Figura 28 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando região (t) trabecular marcada por imuno-histoquímica para colágeno tipo I que se cora na cor castanha. **(A)** controle negativo da reação do corte histológico do fêmur do animal controle. **(B)** corte histológico do fêmur do animal controle **(C)** controle negativo da reação do corte histológico do fêmur do animal desnutrido **(D)** corte histológico do fêmur do animal desnutrido. Resultados representativos de um experimento com n de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo desnutrido. Aumento de 20x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

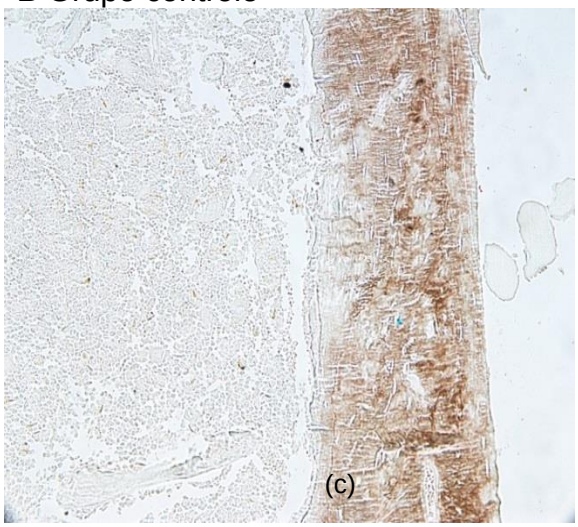
As marcações para ON (**Figura 29**) e OC (**Figura 31**) apresentaram maior positividade na região cortical dos fêmures dos animais controle em relação à positividade encontrada nos cortes histológicos da região cortical dos fêmures dos animais desnutridos. As regiões trabeculares foram discretamente positivas para ON, sem diferenças entre animais controle e desnutridos (**Figura 30**). Não foram

observadas diferenças de marcações para OC nas trabéculas dos fêmures animais controle e desnutridos (**Figura 32**).

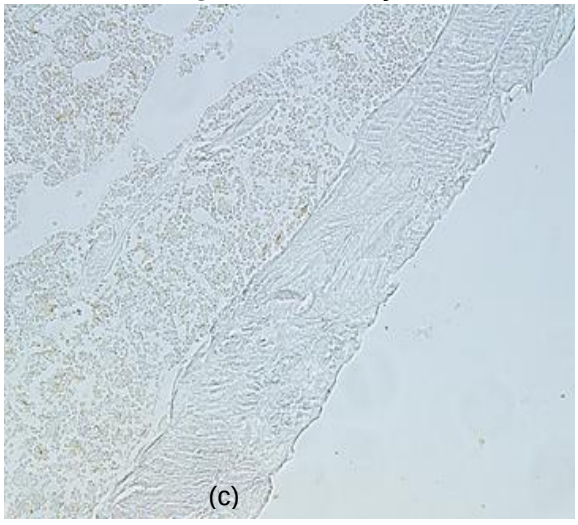
A Controle negativo da reação



B Grupo controle



C Controle negativo da reação



D Grupo desnutrido

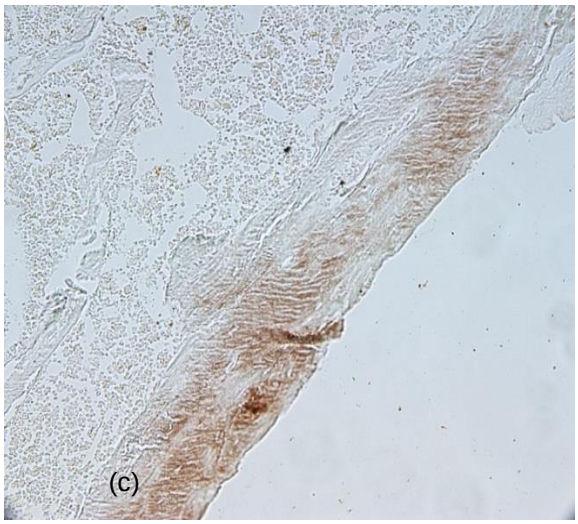
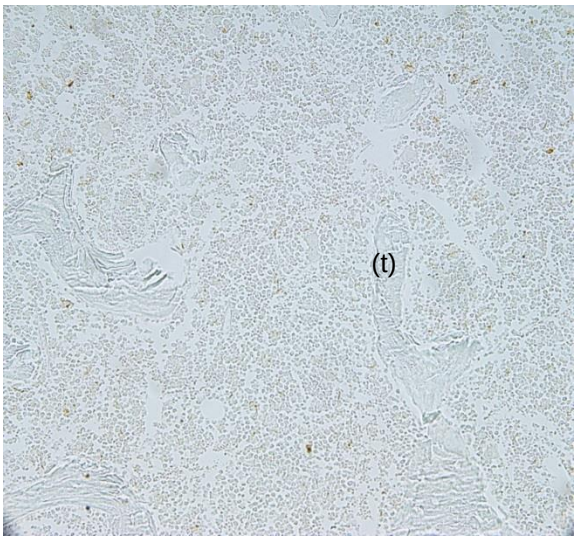
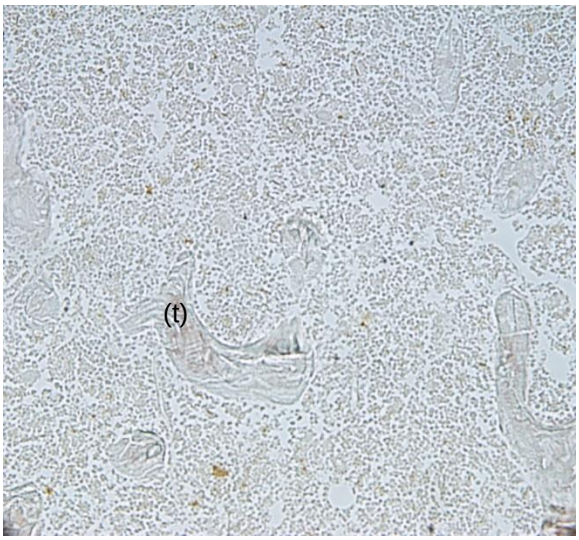


Figura 29 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando região cortical (c) marcada por imuno-histoquímica para osteonectina corada em castanho. **(A)** corte histológico do fêmur da reação do controle negativo do animal controle. **(B)** corte histológico do fêmur do animal controle **(C)** corte histológico do fêmur da reação do controle negativo do animal desnutrido **(D)** corte histológico do fêmur do animal desnutrido. Resultados representativos de um experimento com n de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo desnutrido. Aumento de 20x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

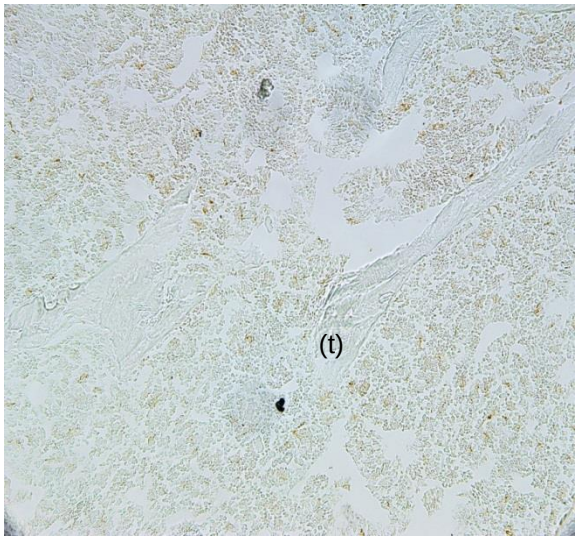
A Controle negativo da reação



B Grupo controle



C Controle negativo da reação



D Grupo desnutrido

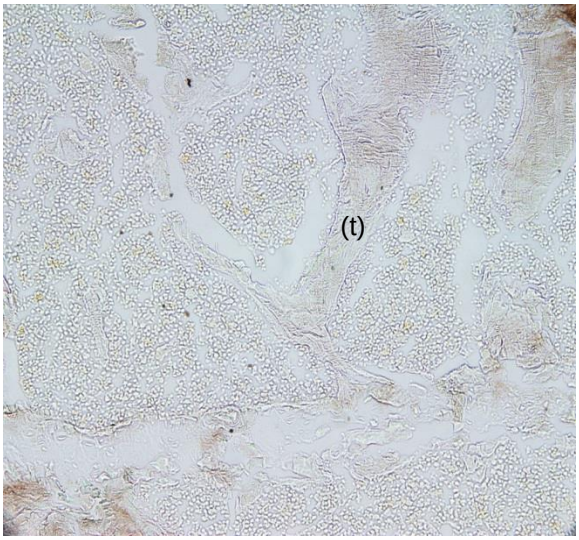
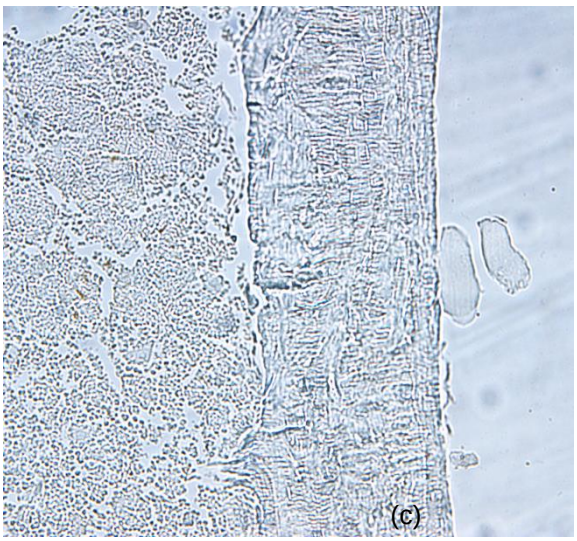
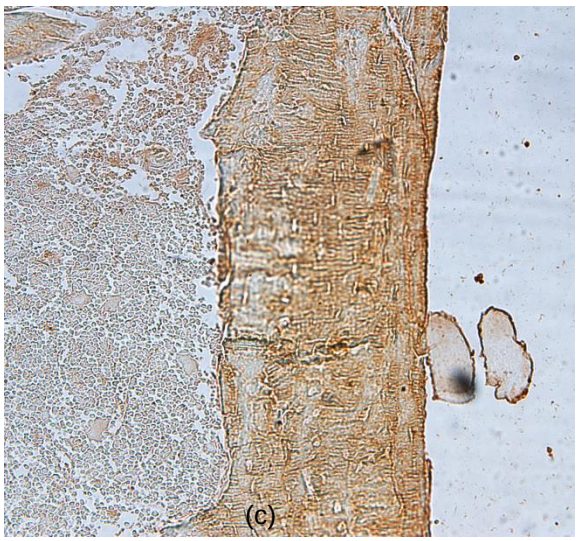


Figura 30 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando região trabecular (t) marcada por imuno-histoquímica para osteonectina corada na cor castanha. Discreta positividade nas trabéculas. **(A)** corte histológico do fêmur da reação do controle negativo do animal controle. **(B)** corte histológico do fêmur do animal controle **(C)** corte histológico do fêmur da reação do controle negativo do animal desnutrido **(D)** corte histológico do fêmur do animal desnutrido. Resultados representativos de 3 ensaios realizados. Aumento de 20x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

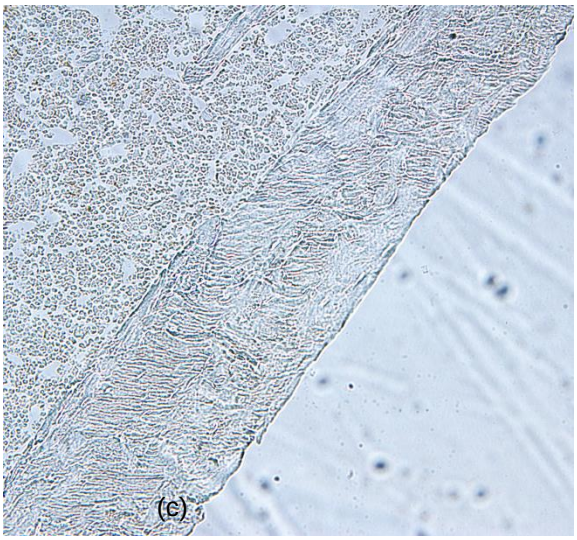
A Controle negativo da reação



B Grupo controle



C Controle negativo da reação



D Grupo desnutrido

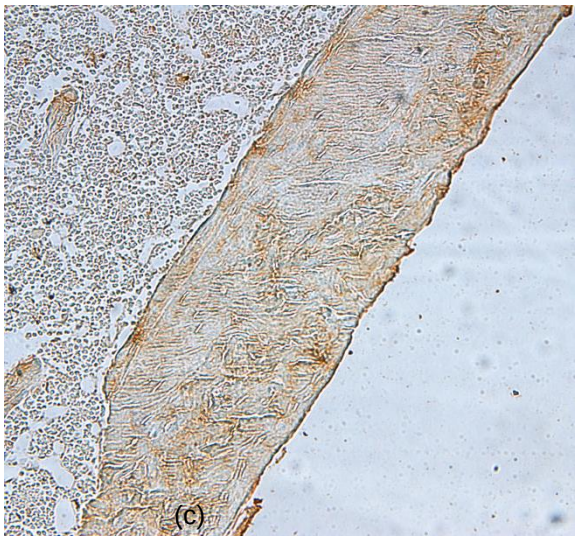
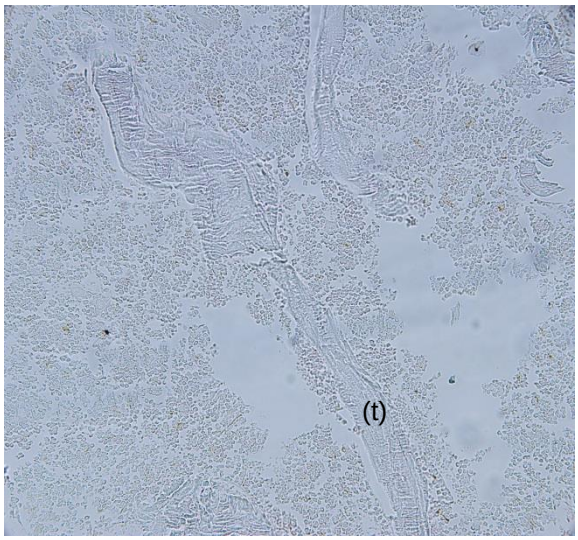
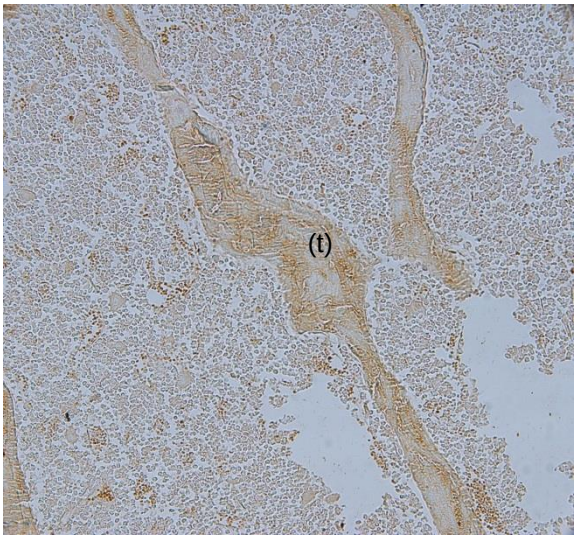


Figura 31 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmur evidenciando região cortical marcada por imuno-histoquímica para osteocalcina corada na cor castanha. **(A)** corte histológico do fêmur do controle negativo do animal controle. **(B)** corte histológico do fêmur do animal controle **(C)** corte histológico do fêmur da reação do controle negativo do animal desnutrido **(D)** corte histológico do fêmur do animal desnutrido. Resultados representativos de um experimento com n de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo desnutrido. Aumento de 20x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

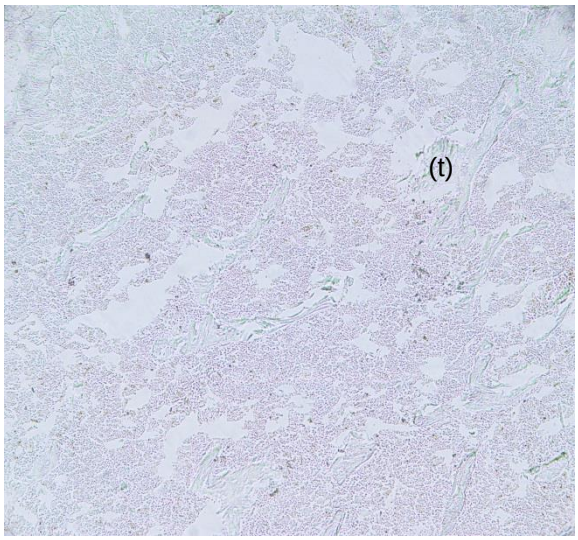
A Controle negativo da reação



B Grupo controle



C Controle negativo da reação



D Grupo desnutrido

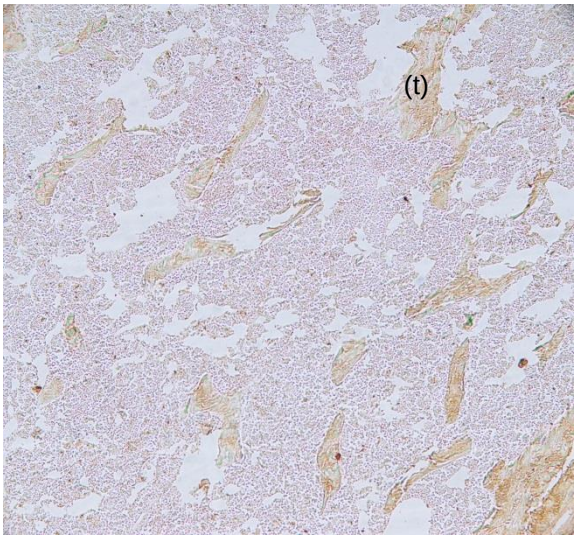
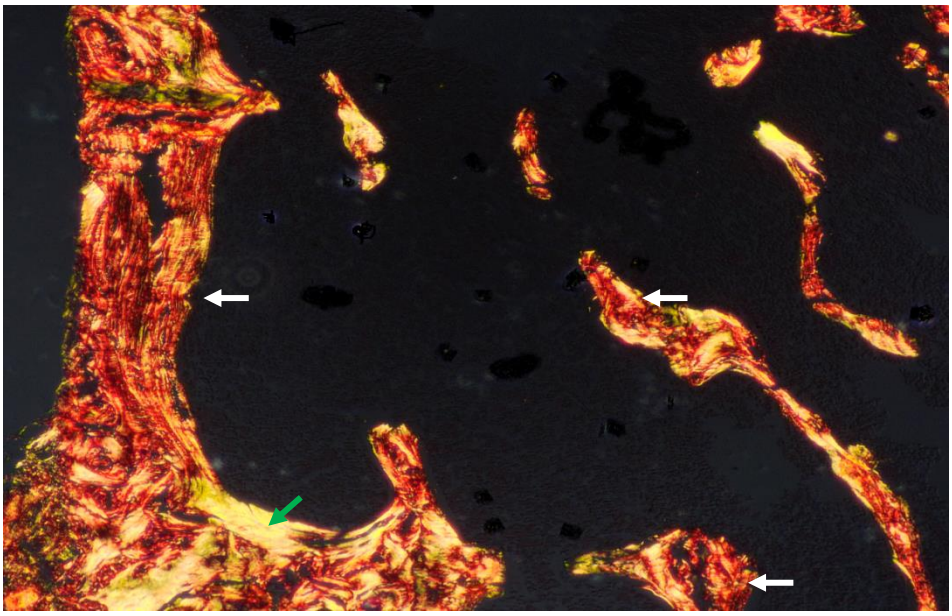


Figura 32 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando região trabecular marcada por imuno-histoquímica para osteocalcina corada em castanho. **(A)** corte histológico do fêmur da reação do controle negativo do animal controle **(B)** corte histológico do fêmur do animal controle **(C)** corte histológico do fêmur da reação do controle negativo do animal desnutrido **(D)** corte histológico do fêmur do animal desnutrido. Resultados representativos de um experimento com n de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo desnutrido. Aumento de 20x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

4.19 Avaliação do colágeno da medula óssea por Picrossírius sob luz polarizada

Cortes de fêmures corados pelo método de Picrossírius e observados em microscópio de luz polarizada mostram modificação na constituição das regiões corticais e trabeculares. Em cortes histológicos dos fêmures dos animais do grupo controle observou-se, na polarização, intensa birrefringência vermelha evidenciando fibras de colágeno tipo I (maduro) (**Figura 33 A**, setas brancas) e, áreas de remodelamento ósseo nas regiões de contorno do endósteo, coradas em vermelho mais claro (**Figura 33 A**, seta verde). Já nos cortes histológicos dos fêmures dos camundongos desnutridos identificou-se falha na distribuição das fibras colágenas e presença de fibras tipo III (imaturo) (**Figura 33 B**, seta branca) que se apresentam em feixes finos, com fraca birrefringência cor amarelo esverdeado (**Figura 33 B**, setas amarelas).

A Controle



B Desnutrido

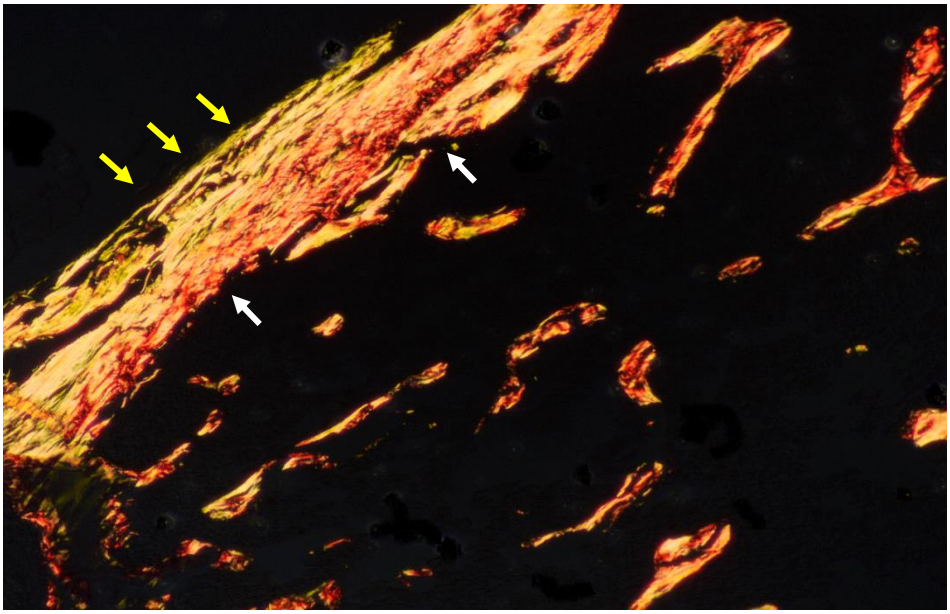


Figura 33 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmur **(A)** corte histológico do fêmur do animal controle. Contorno endosteal preservado com linhas de modelamento ósseo (seta verde) e predomínio de colágeno tipo I (seta branca). **(B)** corte histológico do fêumur do animal desnutrido. Presença de fibras de colágeno tipo III (setas amarelas) e desorganização das fibras de colágeno tipo I (setas brancas). Coloração Picrossírius. Resultados representativos de um experimento com n de 3 animais do grupo controle e 3 animais do grupo desnutrido. Aumento de 10x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse E600® (Nikon, Tóquio, Japão).

4.20 Quantificação de osteclastos em cortes histológicos de fêmur

Os osteoclastos são células multinucleadas e apresentam coloração vermelha quando positivas para a reação citoquímica de TRAP (**Figura 34**).

A região trabecular do fêmur do animal desnutrido apresentou maior número de osteoclastos 8 (5,75 – 10,75)/mm^2 em relação ao fêmur do animal controle 2 (1 – 2,75)/mm^2. Na região cortical, observou-se, no corte histológico do fêmur do animal desnutrido, maior número de osteoclastos 7,5 (5,25 – 8)/mm^2 em relação aos valores encontrados nos cortes histológicos do animal controle 3 (1,25 – 4,75)/mm^2 (**Figura 35**).

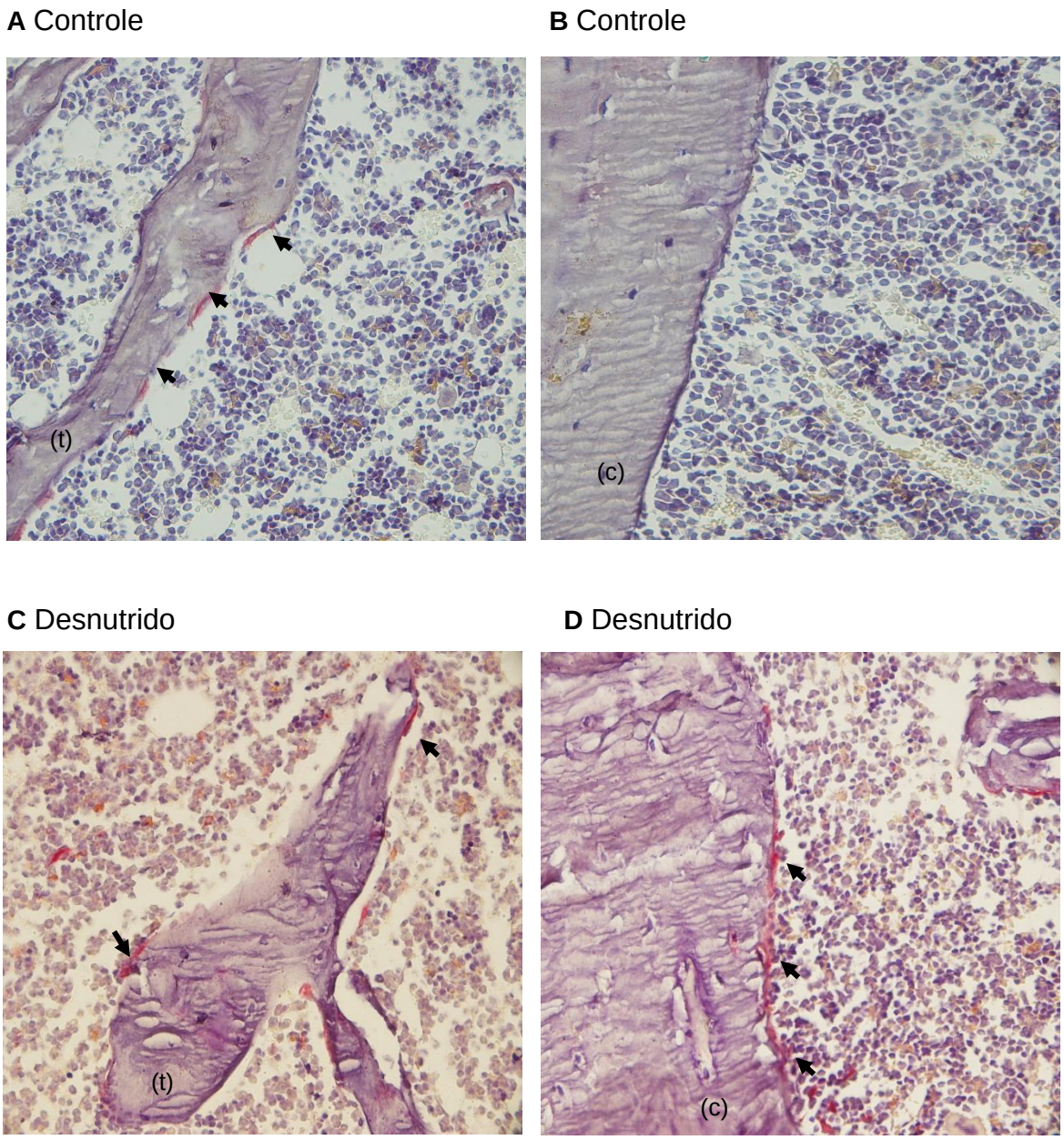


Figura 34 - Fotomicrografias de cortes histológicos de fêmures evidenciando osteoclastos (setas pretas) presentes nas regiões; cortical (c) e trabecular (t); corados pela reação citoquímica de TRAP. **(A)** corte histológico da região trabecular do fêmur do animal controle **(B)** corte histológico da região cortical do fêmur do animal controle **(C)** corte histológico da região trabecular do fêmur do animal desnutrido **(D)** corte histológico da região cortical do fêmur do animal desnutrido. Aumento de 40x. Resultados representativos de um ensaio realizados com 4 animais do grupo controle e 4 animais do grupo desnutrido. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

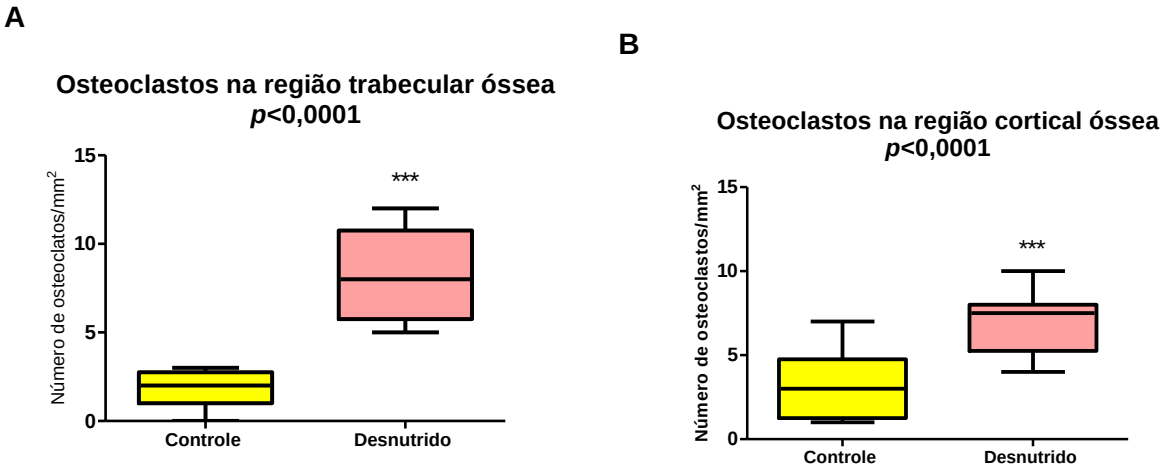


Figura 35 – Número de osteoclastos presentes nos cortes histológicos de fêmures de animais controle (n=4) e desnutrido (n=4) nas regiões **(A)** região trabecular dos cortes histológicos do fêmur **(B)** região cortical dos cortes histológicos do fêmur. Valores expressos em mediana e intervalos interquartílicos. O n indica o número de animais utilizad no experimento. Análise estatística por teste de Mann-Whitney.

4.21 Isolamento dos osteoblastos

Quanto ao isolamento dos osteoblastos da região endosteal do fêmur, a morfologia das células removidas apresentou morfologia correspondente a de osteoblastos: células de aspecto cuboide, núcleo polarizado e citoplasma evidentemente basofílico, conforme observado nas preparações obtidas por citocentrifugação e coradas por May-Grunwald-Giemsa modificado por Rosenfeld (**Figura 36**). Observou-se, pela análise dos citocentrifugados, que em ambas as remoções os osteoblastos estavam presentes.

A análise do corte histológico longitudinal do fêmur corado com H.E. feito após os citados tratamentos com colagenase confirmou a remoção das células endosteais, conforme mostra a **Figura 37**.

A Primeira remoção **B** Segunda remoção

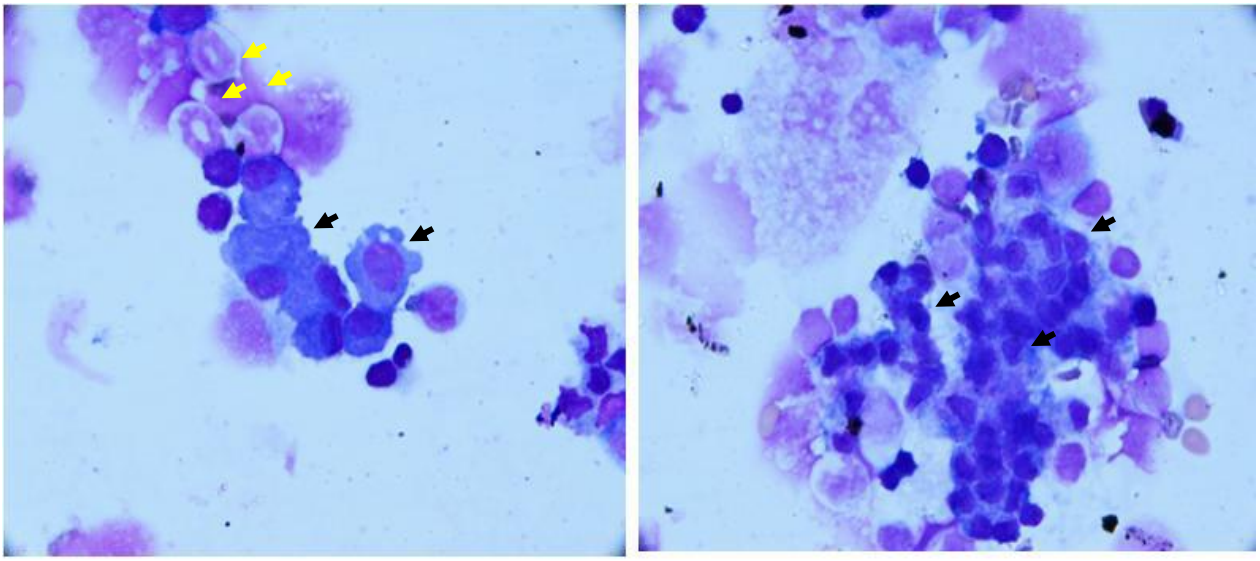
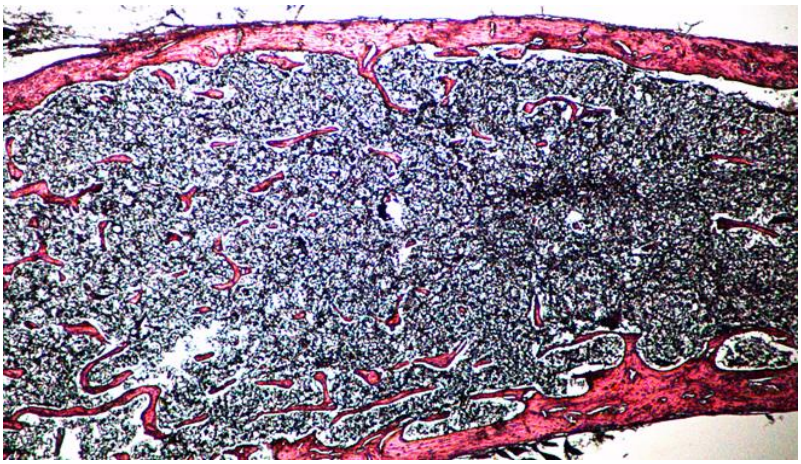
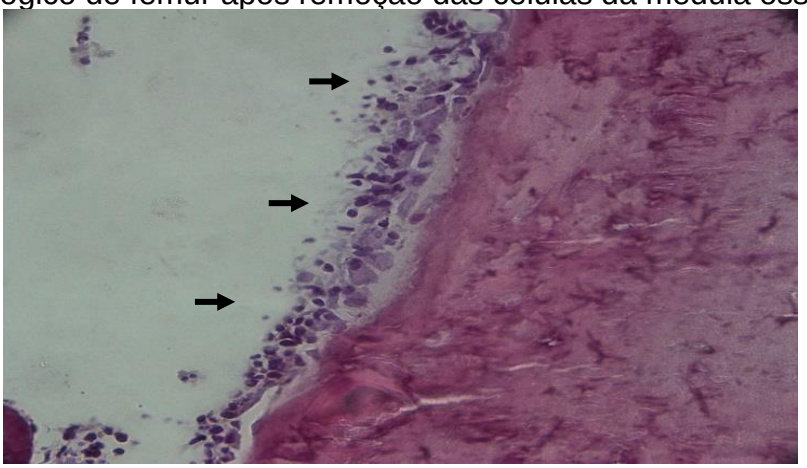


Figura 36 – Fotomicrografias dos citocentrifugados das suspensões celulares removidas da região endosteal da medula óssea por tratamento com colagenase e posteriormente isoladas por imunodepleção magnética. As preparações foram coradas com corante May-Grunwald-Giemsa modificado por Rosenfeld. **(A)** primeira remoção após tratamento com colagenase 0,2% durante 30 minutos. Pode-se observar células com características osteoblásticas (setas pretas), mas também várias células hemopoéticas (setas amarelas). **(B)** segunda remoção após tratamento com colagenase 0,2% durante 60 minutos. Nessa imagem podemos verificar o predomínio de células com características de osteoblastos (setas pretas). Resultados representativos de 2 ensaios realizados com animais do grupo controle. Aumento de 100x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

A Corte histológico de fêmur sem tratamento com colagenase para remoção das células



B Corte histológico de fêmur após remoção das células da medula óssea



C Corte histológico de fêmur após o segundo tratamento com colagenase 0,2%

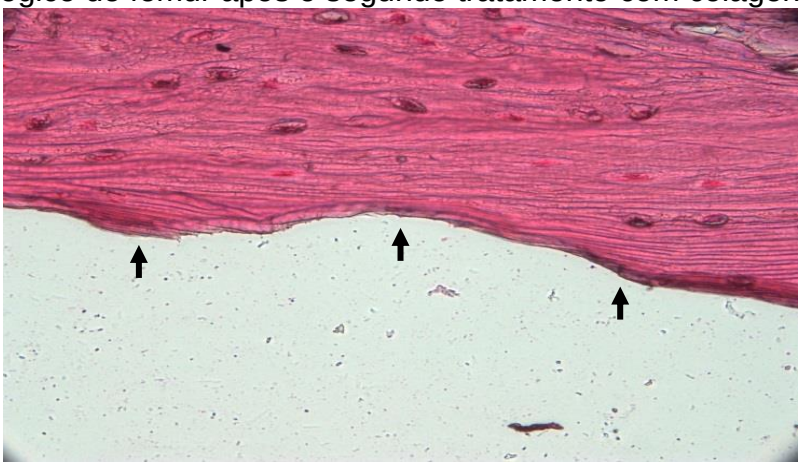
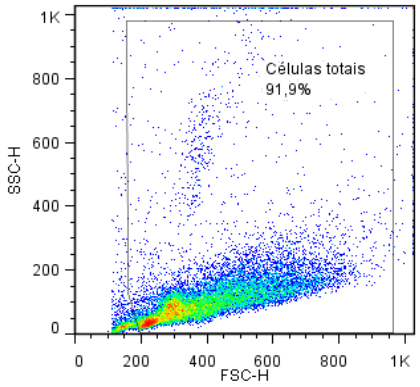


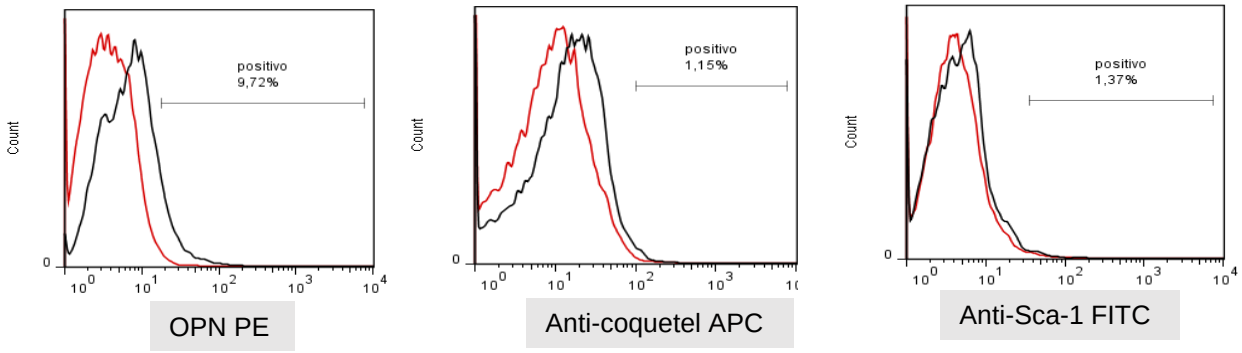
Figura 37 - Fotomicrografias de cortes longitudinais de fêmures corados com H.E. **(A)** antes do tratamento com colagenase 0,2%. **(B)** após remoção da medula óssea, indicando presença das células endosteais (setas pretas) **(C)** após remoção da medula óssea e tratamento com colagenase 0,2% para remoção das células endosteais (setas pretas). Aumento de 60x. Resultados representativos de 1 ensaio realizado com animais do grupo controle. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

4.22 Caracterização imunofenotípica dos osteoblastos

A imunofenotipagem das células isoladas conforme do item 3.24 demonstrou a presença de células positivas para OPN nos animais do grupo controle e do grupo desnutrido, com maior número de células positivas para OPN no grupo desnutrido. Verificou-se que o método de remoção das células hemopoéticas permitiu a passagem de até 5% das células positivas para o coquetel de anticorpos: CD5, CD45R (B220), CD11b, anti-Gr-1 (Ly-6G/C), anti 7-4 e Ter-119. Quanto à remoção das células Sca-1 também se verificou que cerca de 2% das células isoladas expressavam este marcador (**Figuras 38 e 39**).



A Controle



B Desnutrido

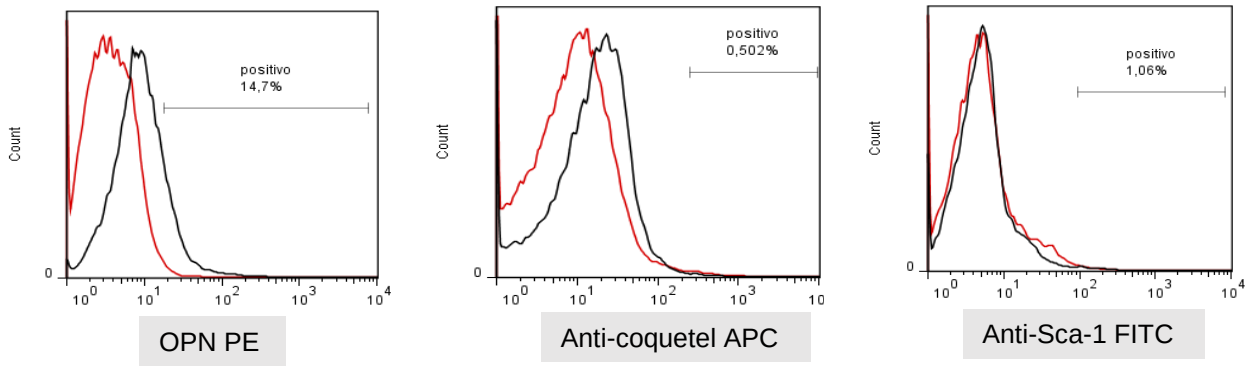


Figura 38 - Imunofenotipagem por citometria de fluxo da população celular obtida após tratamento com colagenase. Aquisição de 20.000 eventos realizada em FACSCalibur® (BD) e Análise da população total adquirida em programa FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA). Análise realizada na região selecionada na dispersão **(A)** dispersão do (FSC) tamanho x (SSC) complexidade celular. **(B)** animal controle. **(C)** animal desnutrido. Linha preta: anticorpos OPN PE, anti-coquetel hemopoético (CD5, CD45R, CD11b, anti-Gr-1, 7-4 e Ter-119) APC e Sca-1 FITC. Linha vermelha controles isotípicos. Resultados representativos de um experimento com n de 4 animais do grupo controle e 4 animais do grupo desnutrido.

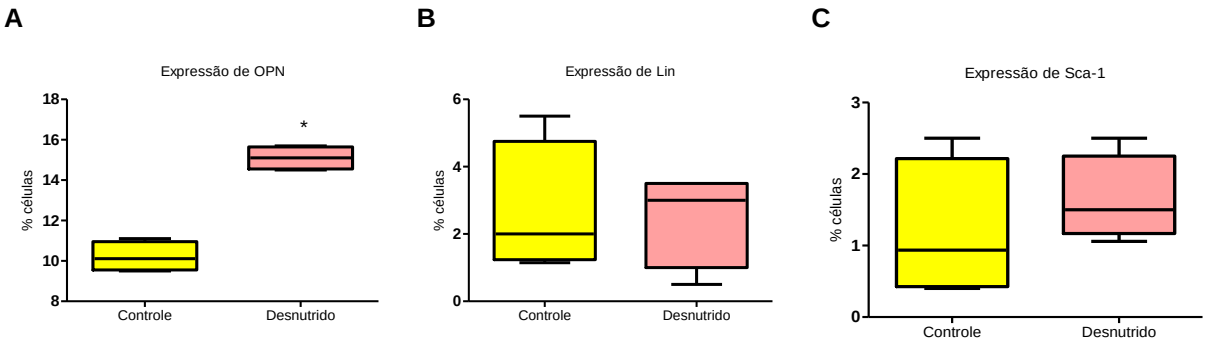
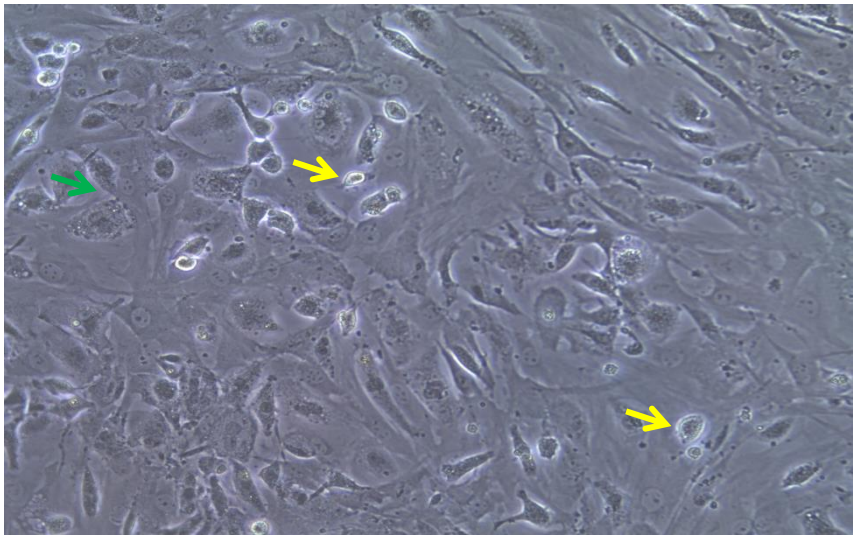


Figura 39 – Porcentagem de células positivas para os marcadores (A) OPN, (B) linhagem hematológica e (C) Sca-1 presentes na suspensão celular obtida após o tratamento do fêmur com colagenase 0,2%. Valores expressos em mediana e intervalos interquartílicos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística por teste de Mann-Whitney.

4.23 Cultura dos osteoblastos

Após uma semana de cultura em meio α-MEM contendo 10% de SFB, verificou-se maior confluência na placa contendo as células isoladas do fêmur dos animais do grupo controle (**Figura 40 A**). Observou-se presença de raras células da linhagem hemopoética (arredondadas e mais refringentes) (seta amarela), no sobrenadante das culturas de células obtidas dos animais controle e desnutridos. As células aderidas apresentaram aspecto poligonal e projeções citoplasmáticas (seta verde).

A Controle



B Desnutrido

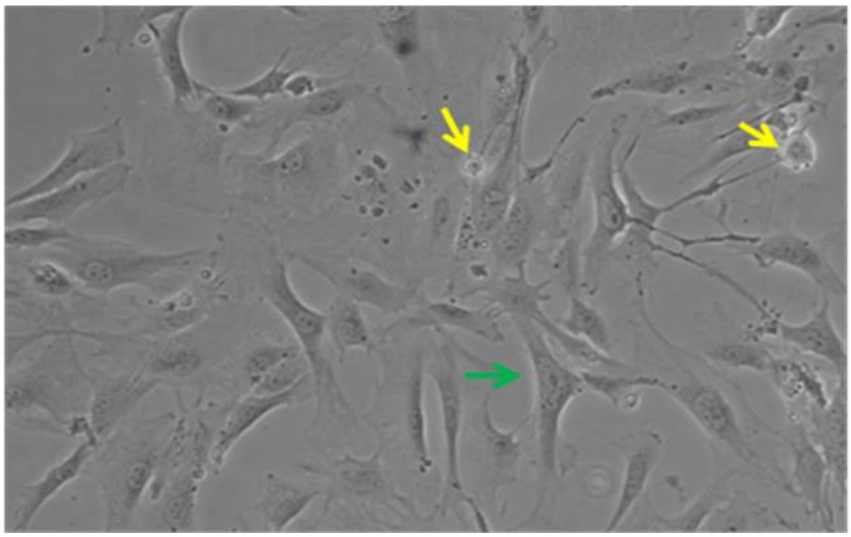


Figura 40 - Fotomicrografias dos osteoblastos células isoladas da região endosteal após uma semana de cultura em meio α-MEM contendo 10% SFB. Aumento de 20x. Raras células hemopoéticas (setas amarelas) e predomínio de células aderidas com aspecto poligonal (seta preta). Aumento de 100x. Imagens obtidas em microscópio invertido modelo Eclipse TS100® (Nikon, Tóquio, Japão).

4.24 Avaliação da fosfatase alcalina em células de cultura

Após uma semana de cultura apenas em meio α-MEM suplementado com 10% SFB seguida de uma semana com meio de indução osteogênica foi ralizada a coloração citoquímica para a fosfatase alcalina. A marcação para fosfatase alcalina foi maior nas células do grupo controle em comparação ao grupo desnutrido (**Figura 41**).

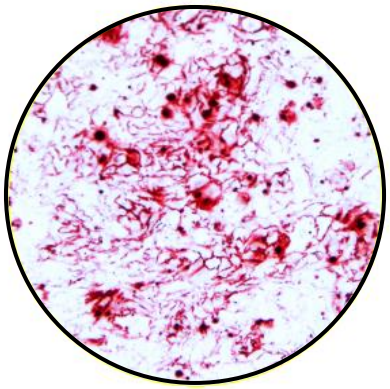
A Células de animais controle **B** Células de animais desnutridos

Figura 41 - Fotomicrografia de células osteoblásticas, oriundas de animais do grupo controle, cultivadas após uma semana na presença de meio de indução e submetidas a reação citoquimica da fosfatase alcalina. As células positivas para a reação coram-se em preto (seta amarela). **(A)** células de cultura de animal controle **(B)** células de cultura de animal desnutrido. Resultados representativos de 3 ensaios realizados com animais do grupo controle. Aumento de 10x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

4.25 Caracterização do potencial de mineralização dos osteoblastos de animais controle e desnutrido

A cultura de osteoblastos provenientes de animais controle produziram uma matriz mais densa e com distribuição mais homogênea em relação à cultura de osteoblastos de animais desnutridos. Observou-se menor quantidade de pontos de mineralização evidenciados pelo vermelho de alizarina nas células dos animais desnutridos cultivadas com meio de indução osteogênica, conforme mostra a **figura 42**. A quantificação mostrou que a formação de matriz mineralizada foi maior nas células do grupo controle em comparação ao grupo desnutrido (**Figura 43**).

A Células de animais controle



B Células de animais desnutridos

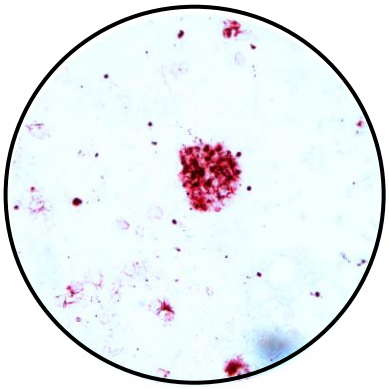


Figura 42 - Deposição de cálcio pelos osteoblastos evidenciado pela coloração com vermelho de alizarina dos osteoblastos após uma semana de cultura em meio de indução osteogênica. (A) animal controle e (B) animal desnutrido. Resultados representativos de 3 ensaios realizados com animais do grupo controle. Aumento de 10x. Imagens obtidas em microscópio Nikon modelo Eclipse 80i.

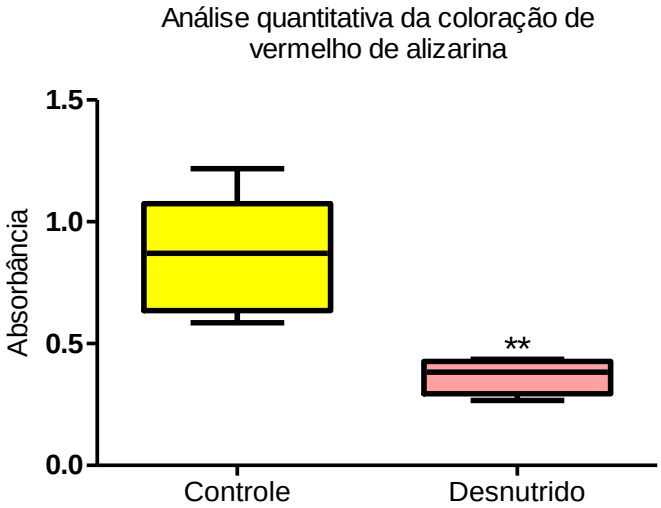


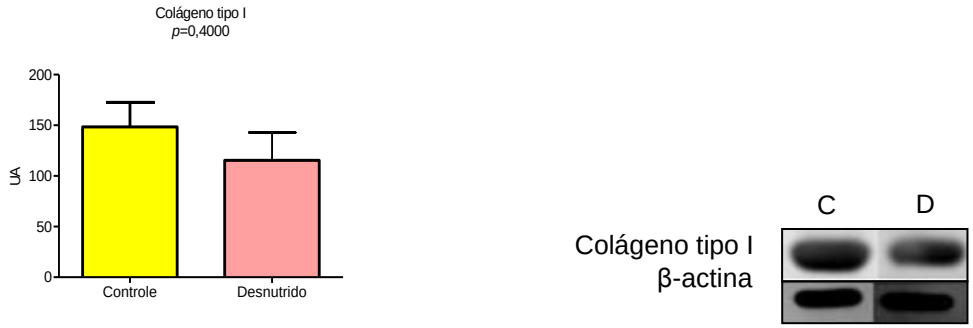
Figura 43 - Análise quantitativa da coloração com vermelho de alizarina dos osteoblastos após uma semana de cultura em meio de indução osteogênica dos animais do grupo controle (n=6) e desnutrido (n=6). Valores expressos em mediana e intervalos interquartílicos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. Análise estatística por teste de Mann-Whitney.

4.26 Quantificação das proteínas colágeno tipo I, osteopontina (OPN), osterix, Runx2, osteoprotegerina (OPG) e RANK-L nos osteoblastos, *ex vivo*, por *Western blotting*

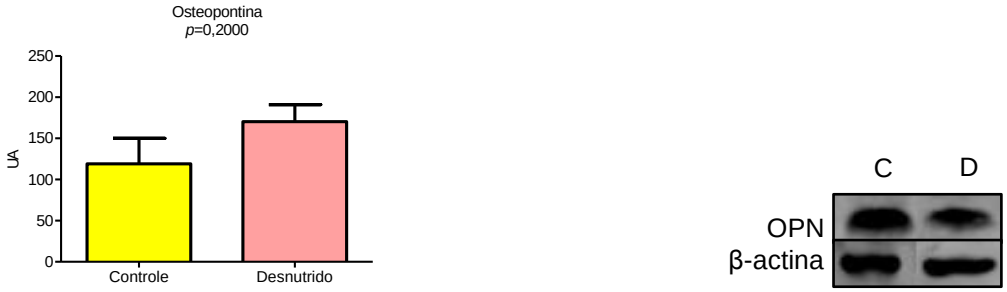
Osterix é uma proteína predominantemente expressa em pré-osteoblastos e osteoblastos imaturos e Runx2, colágeno tipo 1 e osteopontina são predominantemente expressos em osteoblastos maduros. A desnutrição afetou de forma significativa a expressão de osterix.

Em relação às analises de OPG e RANKL observou-se que os animais que receberam ração hipoproteica apresentaram menor expressão de OPG, porém o mesmo não ocorreu com o RANKL. Observamos também que esses animais apresentaram diminuição da relação OPG/RANKL (**Figura 44**).

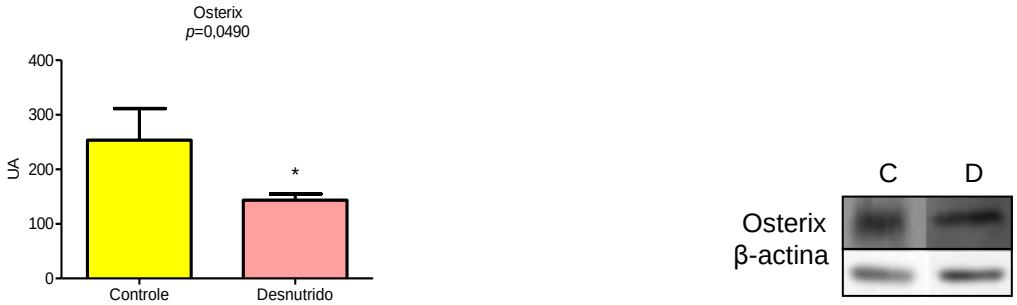
A



B



C



D

E

F

G

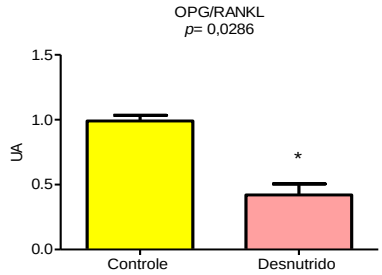
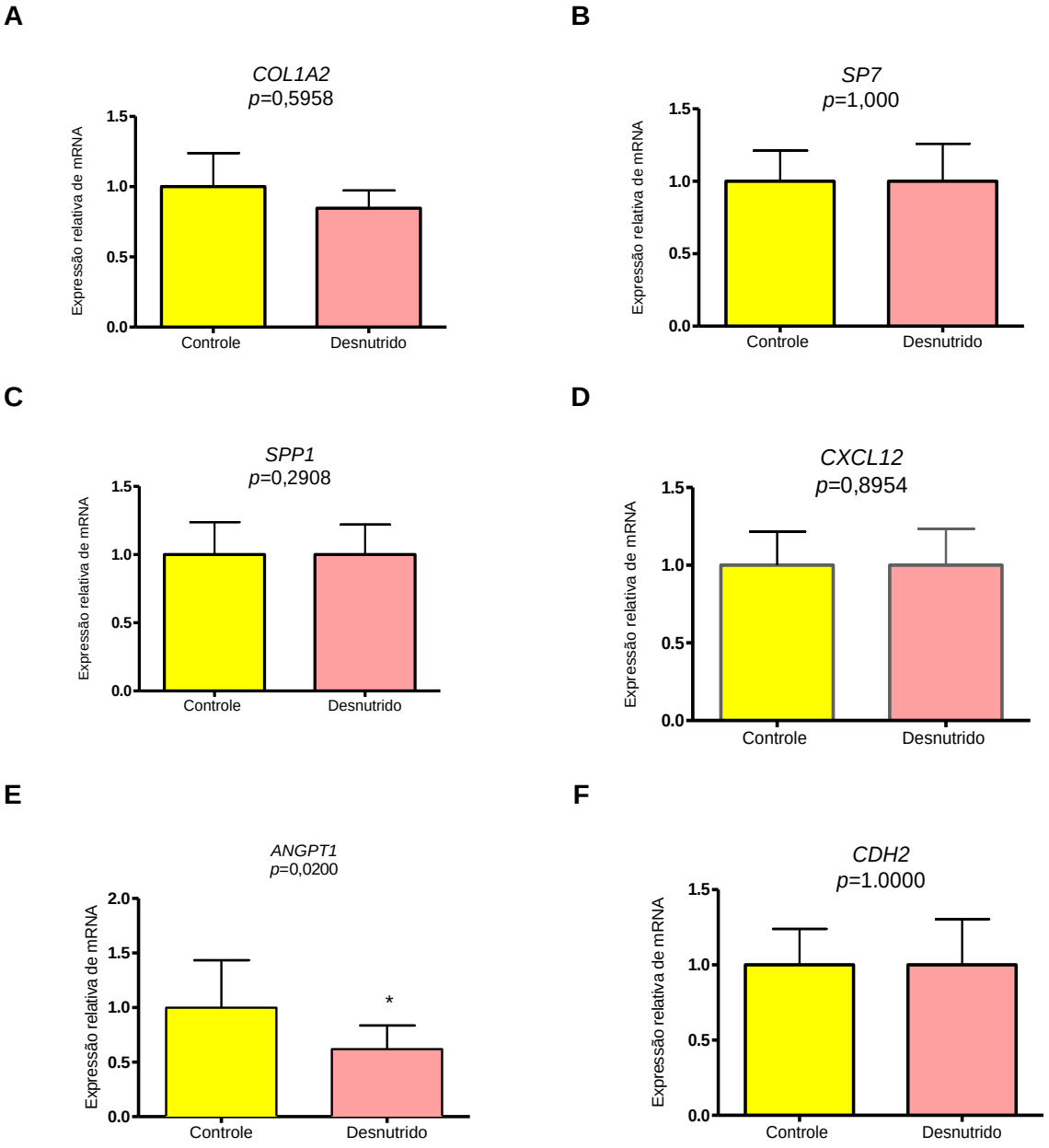


Figura 44 - Gráficos da expressão de **(A)** colágeno tipo 1, **(B)** osteopontina (OPN), **(C)** osterix, **(D)** Runx-2, **(E)** osteoprotegerina (OPG), **(F)** RANKL e **(G)** relação OPG/RANKL nos osteoblastos, *ex vivo*, obtidos após tratamento femoral com colagenase e depleção celular imuno-magnética de animais dos grupos controle (n=4) e desnutrido (n=4) Valores expressos em média ± SEM de unidades arbitrárias. Análise estatística por teste de Mann-Whitney.

4.27 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real de colágeno tipo 1 (COLA1A2), osterix (SP7), Cxcl12 (CXCL12), angiopoetina (ANGPT1), osteopontina (SPP1), jagged (JAG2) e N-caderina (CDH2).

Observou-se diferença significativa apenas na expressão gênica de angiopoetina (*ANGPT1*) nos osteoblastos dos animais desnutridos (**Figura 45**).



G

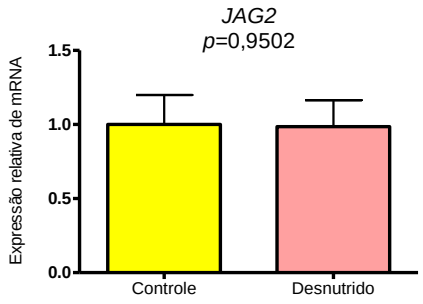


Figura 45 - Resultados da expressão gênica nos osteoblastos. **(A)** expressão de *COL1A2* dos grupos controle (n=12) e desnutrido (n=12) **(B)** expressão de SP7 dos grupos controle (n=14) e desnutrido (n=14) **(C)** expressão de *SPP1* dos grupos controle (n=11) e desnutrido (n=13) **(D)** expressão de *CXCL12* dos grupos controle (n=14) e desnutrido (n=13) **(E)** expressão de ANG dos grupos controle (n=17) e desnutrido (n=17), **(F)** expressão de *CDH2* dos grupos controle (n=14) e desnutrido (n=14) e **(G)** expressão de *JAG2* dos grupos controle (n=14) e desnutrido (n=14).

4.28 Avaliação das concentrações de M-CSF em lavado de medula óssea e em sobrenadante de cultura de osteoblastos

Não foram observadas diferenças nos valores das concentrações de M-CSF do lavado de medula óssea dos animais do grupo controle e desnutrido. A concentração de M-CSF para o grupo controle foi de 15,35 pg/mL (10,30-18,00) e 22,20 pg/mL (16,40-33,55) para o grupo desnutrido (**Figura 46**).

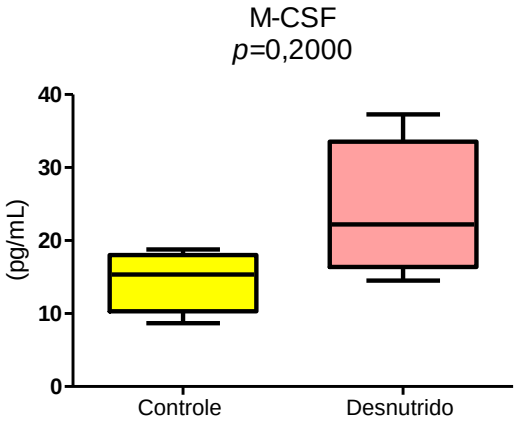


Figura 46 - Concentração de M-CSF (pg/mL) em lavado de medula óssea de animais do grupo controle (n=4) e desnutrido (n=4). Valores expressos em mediana e intervalo interquatílico. Análise estatística por teste de Mann-Whitney.

4.29 Detecção, por imunofluorescência, da osteopontina (OPN) em cultura de células MC3T3-E1

A fim de melhor elucidarmos a participação da ligação OPN-CD44 na proliferação das células LSK optamos por realizar a cocultura destas células sobre células MC3T3-E1 (linhagem clonal de células pré-osteoblásticas derivadas da calvaria de ratos recém-nascidos). As células MC3T3-E1 foram cultivadas na presença de meio de indução osteogênica contendo 50µg/mL de ácido ascórbico e 10mM de β-glicerosfostato (conforme descrito no item 3.31) durante 3 dias. Durante este período observamos que já havia expressão de OPN conforme verificado pela reação de imunofluorescência (**Figura 47**).

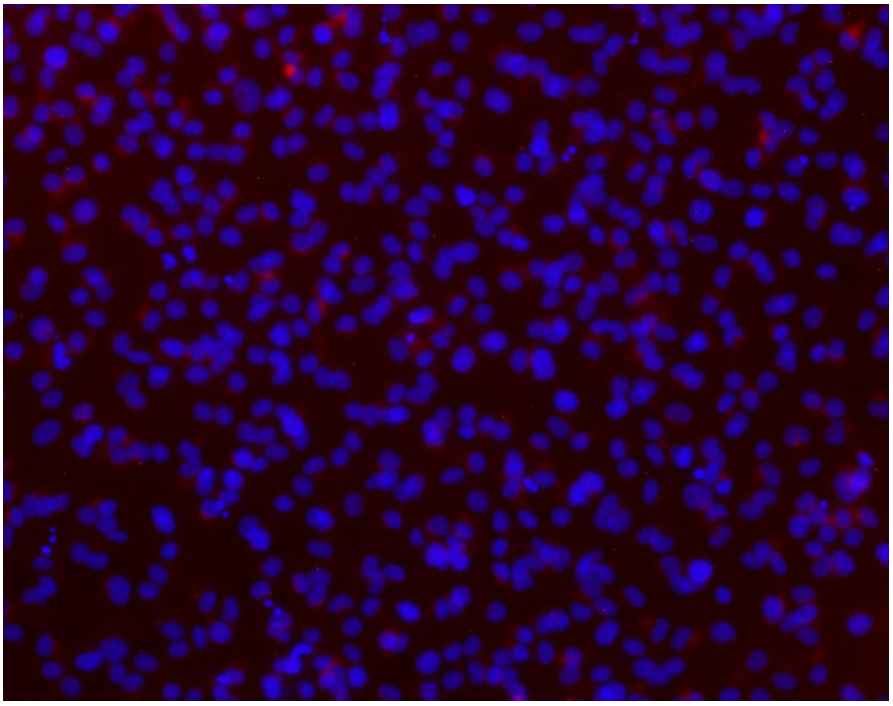
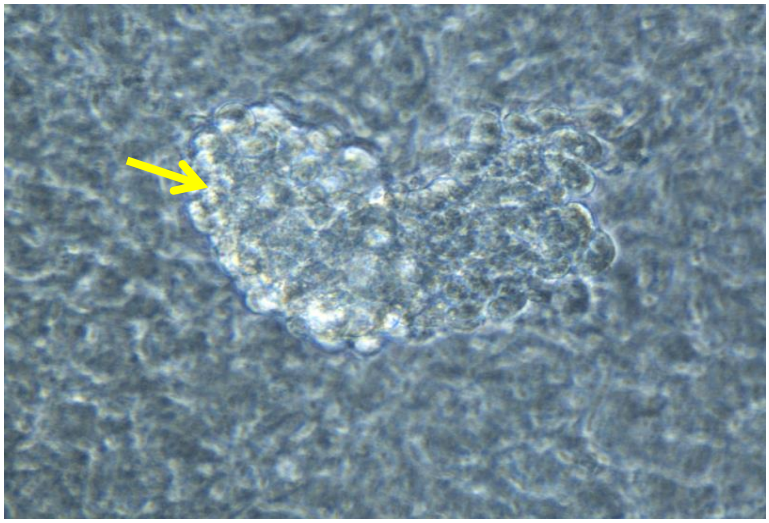


Figura 47 - Fotomicrografia de cultura de células MC3T3-E1 marcadas por imunofluorescência para osteopontina (vermelho) e DAPI (azul). Resultados representativos de 2 experimentos independentes. Aumento de 10x. Imagem obtida com aplicação de filtros UV-2EC para leitura do DAPI e UV-2E/C para leitura do PE em microscópio de fluorescência modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

4.30 Ensaio de cocultura de células LSK e MC3T3-E1

As células LSK isoladas por *FACS sorting* conforme descrito no item 3.12.1 oriundas da medula óssea de camundongos do grupo controle e desnutrido foram cultivadas sobre monocamada de células MC3T3-E1 durante sete dias (conforme descrito no item 3.33). As células LSK apresentaram-se distribuídas em conglomerados (áreas de *cobblestone*) de aspecto homogêneo e maior tamanho no grupo controle quando comparado ao grupo desnutrido (**Figura 48**).

A LSK controle



B LSK desnutrido

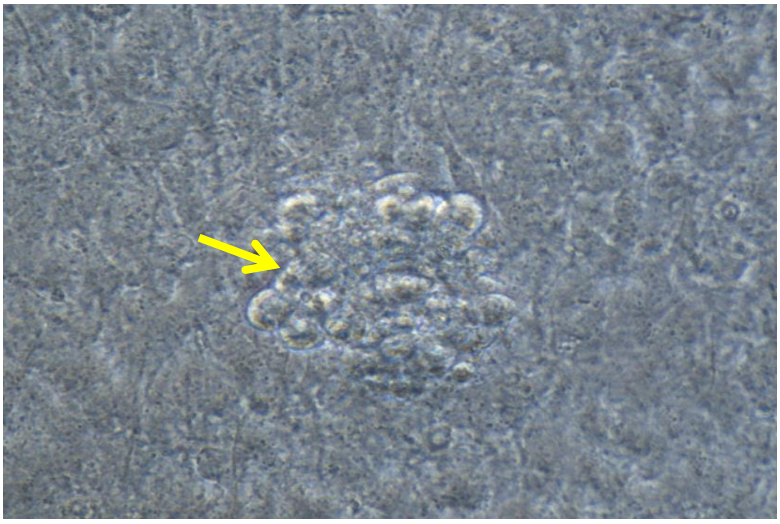


Figura 48 – Fotomicrografias de cocultura de células MC3T3-E1 e células (LSK) após sete dias de cultivo *ex vivo* em meio (StemSpan® + 2mM glutamina + 12,5%SFB + 150ng/mL de SCF + 30ng/mL IL-3 + 30ng/mL IL-6. A seta amarela evidencia as áreas de *cobblestone* (que são áreas de hemopoese) (**A**) células LSK de animal controle (**B**) células LSK de animal desnutrido. Aumento de 20x. Imagens obtidas em microscópio modelo Eclipse 80i® (Nikon, Tóquio, Japão).

4.31 Ensaio de proliferação das células LSK em sistema de cocultura

Para a análise da proliferação celular, as células LSK isoladas por *FACS sorting* foram previamente marcadas com CFSE, uma molécula que tem a propriedade de se associar à proteínas citoplasmáticas e se distribuir às células filhas de forma similar, o que possibilita a detecção da presença de proliferação, em função da queda de fluorescência, ou seja, as células que passam por vários ciclo de divisão celular perdem sua fluorescência e são detectadas pela emissão de um pico de fluorescência mais a esquerda do gráfico. Verificamos que as células LSK ds animais controle e desnutridos incorporaram o fluorocromo CFSE conforme demonstrado nos histogramas da **Figura 49**.

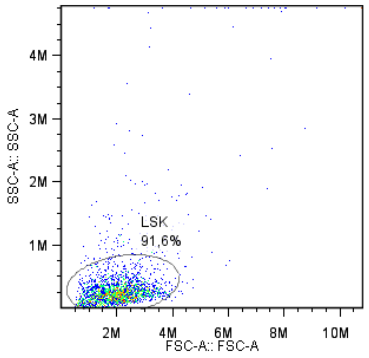
Avaliamos a proliferação das células LSK em sistema de cocultura com MC3T3-E1. Também pré-incubamos as células LSK com anti-CD44 para inibirmos a ligação do CD44 com a osteopontina expressa pelas células MC3T3-E1.

Após sete dias em sistema de cocultura com células MC3T3-E1, o decaimento da fluorescência do CFSE incorporado às células LSK foi calculado automaticamente por deconvolução dos picos dos histogramas (**Figura 50**).

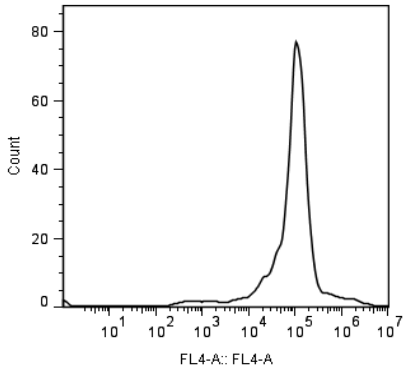
Oservamos que a proliferação das células LSK dos animais desnutridos originou uma geração celular a menos em comparação à proliferação das células dos animais do grupo controle (**Figura 50A e B**).

O bloqueio de CD44 das células LSK dos animais do grupo controle diminuiu a proliferação destas células em três gerações quando comparadas as células LSK do grupo controle que não tiveram o CD44 bloqueado (**Figura 50A e C**). Entretanto, o bloqueio de CD44 das células LSK dos animais desnutridos não afetou o número de gerações celulares produzidas em comparação às células sem bloqueio (**Figura 50B e D**).

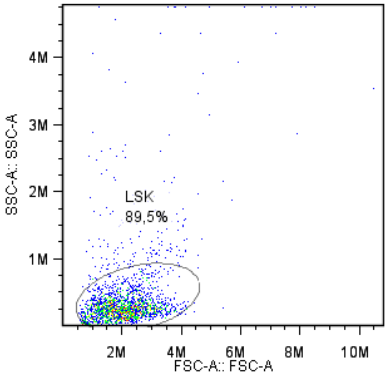
A Controle



B Controle



C Desnutrido



D Desnutrido

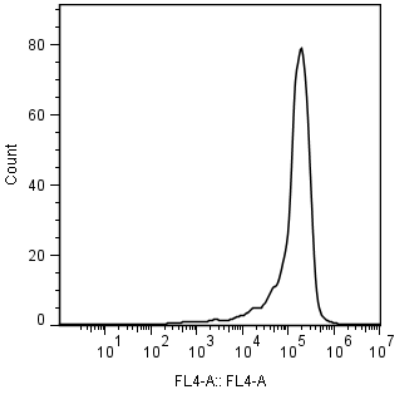


Figura 49 – Análise da incorporação do substrato fluorescente (CFSE) pelas células LSK. Aquisição de 10.000 eventos realizada em FACSAccuri C6® (Accuri Cytometers Inc., Ann Arbor, Michigan, EUA) e análise em programa FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA). **(A)** seleção das células LSK de animal controle, **(B)** histograma correspondente a emissão de fluorescência de CFSE pelas células LSK de animal controle, **(C)** seleção das células LSK de animal desnutrido e **(D)** histograma correspondente a emissão de fluorescência de CFSE pelas células LSK de animal controle. Resultados representativos de um ensaio com 2 animais do grupo controle e 2 animais do grupo desnutrido.

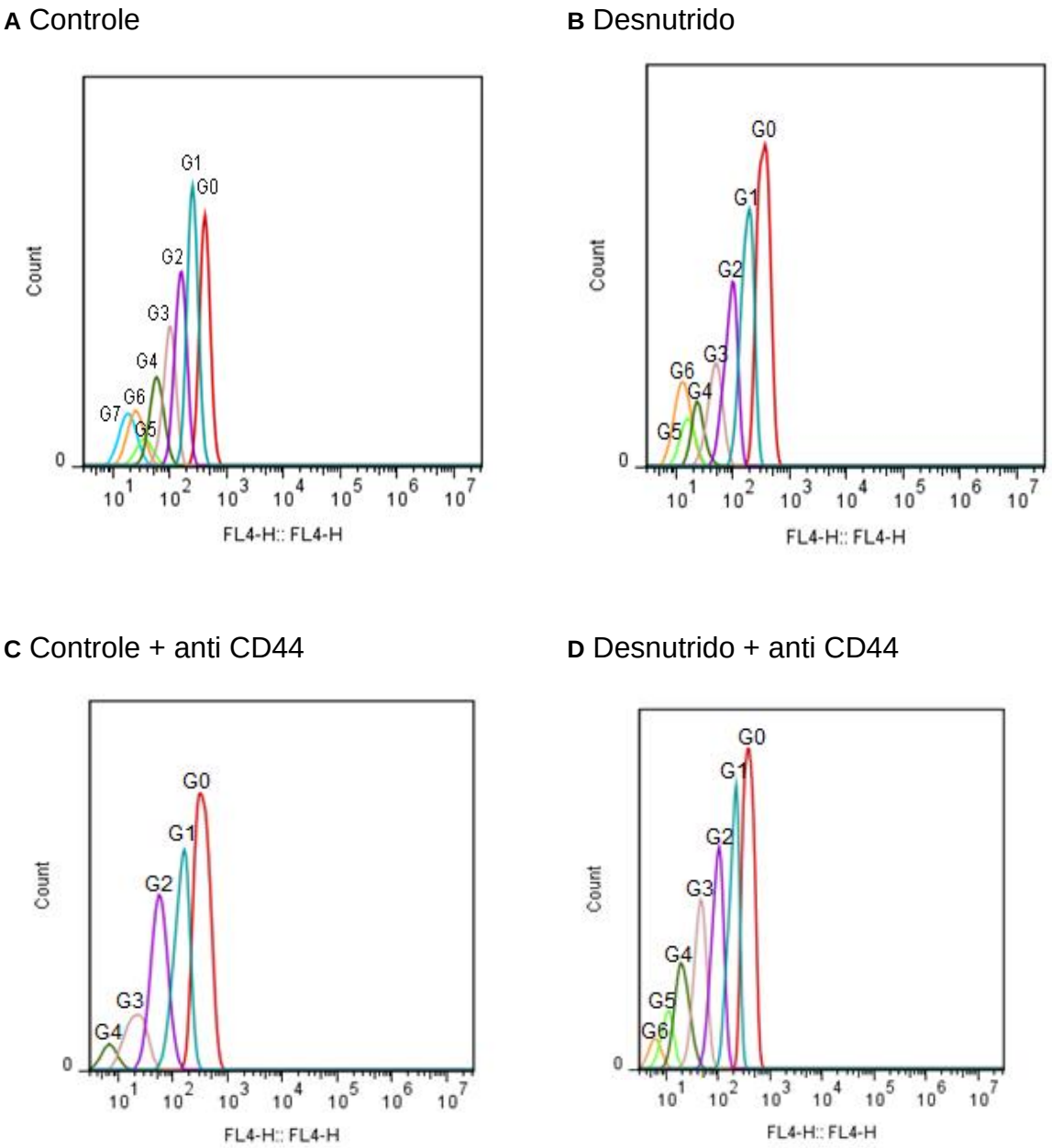


Figura 50 - Histogramas das sucessivas gerações de células LSK em cocultura com células MC3T3-E1. A quantidade do substrato fluorescente (CFSE) intracelular decai progressivamente a cada divisão celular, permitindo avaliar o número de divisões e a fração de células respondedoras após sete dias de cocultura das células LSK sobre monocamada de células MC3T3-E1. Aquisição de 10.000 eventos realizada em FACSAccuri C6® (Accuri Cytometers Inc., Ann Arbor, Michigan, EUA) e análise automática em programa FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA). **(A)** células LSK de animal controle, **(B)** células LSK de animal desnutrido, **(C)** células LSK de animal controle pré-incubadas com anti-CD44 e **(D)** células LSK de animal controle pré-incubadas com anti-CD44. Resultados representativos de um ensaio com 4 animais do grupo controle e 4 animais do grupo desnutrido.

Em síntese, os resultados do presente trabalho indicaram que a desnutrição proteica:

● promoveu pancitopenia periféria;

● reduziu o número de células totais da medula óssea e das linhagens granulocítica, linfoide, eritroide e megacariocítica;

● diminuiu o número de células-tronco na medula óssea: LT-CTH e CT-CTH e do número de células progenitoras multipotentes;

● promoveu a parada do ciclo celular das células-tronco de longa duração (LT-CTH) com aumento da porcentagem de células em fase G0/G1;

● diminuiu a expressão proteica e gênica de CD44 nas células-tronco de longa duração (LT-CTH);

● diminuiu a densidade mineral óssea (DMO) do fêmur dos camundongos;

● comprometeu a microarquitetura óssea induzindo alterações na região cortical (diminuição do perímetro do endósteo e diminuição da área) e trabecular (diminuição da relação BV/TV, diminuição do número de trabéculas, aumento da distância entre as trabéculas e predomínio de trabéculas no formato de hastes) do fêmur;

● diminuiu o depósito de colágeno tipo I, osteonectina e ostecalcina na cortical do fêmur;

● alterou a organização do colágeno tipo I na cortical do fêmur com consequente predomínio de colágeno tipo III;

● aumentou a expressão de osteopontina (OPN) nos osteoblastos isolados *ex vivo*;

● diminuiu a expressão proteica de osterix e osteoprotegerina (OPG) nos osteoblastos isolados *ex vivo*;

● diminuiu a expressão gênica de angiopoetina (*ANGPT1*) nos osteoblastos isolados *ex vivo*;

● diminuiu a proliferação das células-tronco que não expressam marcadores da linhagem hemopoética e expressam Sca-1 e c-Kit (LSK) quando incubadas em sistema de cocultura de osteoblastos (MC3T3-E1).

5 DISCUSSÃO

5.1 Aspectos nutricionais

A desnutrição ainda é considerada um problema de saúde pública em vários países em desenvolvimento. No Brasil, atualmente esse não é considerado um problema de saúde pública em virtude da redução contínua dos casos de desnutrição no país, mas que permanece em bolsões de pobreza em várias regiões brasileiras, especialmente nas regiões Norte e Nordeste e na periferia das cidades. Inversamente, nas últimas três décadas verifica-se no Brasil uma transição entre desnutrição e sobrepeso/obesidade (CONDE e MONTEIRO, 2014). Entretanto, há 795 milhões de desnutridos ao redor do globo e a queda do número de desnutridos no nosso país não ocorre de maneira demograficamente uniforme (FAO, 2015) (SAWAYA et al., 2009). A desnutrição afeta o funcionamento de vários sistemas, incluindo o sanguíneo. O tecido sanguíneo apresenta alta taxa de renovação e requer grande aporte de proteínas e micronutrientes e, consequentemente, a carência proteica compromete quanti e qualitativamente a produção das células sanguíneas (BORELLI et al., 1995; BORELLI et al, 1998; BORELLI et al., 2007).

O estudo da interação da CTH com o nicho endosteal na desnutrição possibilita compreendermos a contribuição das alterações ósseas para a hemopoese. E, em uma visão mais ampla, o entendimento da influência da desnutrição no processo de hemopoese é importante para compreensão dos mecanismos que provocam as citopenias periféricas observadas (BORELLI et al., 2007; BORELLI et al., 2009).

Em nosso modelo experimental foram utilizados camundongos machos evitando-se assim flutuações endócrinas do ciclo estral das fêmeas as quais alteram a mobilização celular e qualidade óssea (SAMPLE et al., 2012). As várias espécies murinas demonstram notável diferença de massa óssea sendo questionável a comparação do padrão de perda óssea em relação a humanos. Optamos pela espécie C57BL/6J por ser esta utilizada em vários estudos sobre a densidade e arquitetura óssea, pois demonstram similaridade ao padrão observado em humanos em relação à idade (HALLORAN et al., 2002) e, também, por ser a espécie mais

utilizada em estudos envolvendo a célula-tronco hemopoética (VAN OS et al., 2007). Em relação à idade dos animais optamos por recém-desmamados com idade de 21 dias que receberam ração de crescimento formulada de acordo com as recomendações da AIN93 até atingirem 60 dias de vida para início da adaptação às condições experimentais. Desta forma, utilizamos ração preparada em nosso laboratório o que nos permitiu controle maior das condições nutricionais dos animais que foram utilizados nos experimentos, fornecendo ração contendo 17% de proteínas, vitaminas e sais minerais, além disso, possibilitou a fabricação de *pellets* no mesmo formato das rações controle e hipoproteica. O início da adaptação ocorreu aos 60 dias de vida. Nesta idade, os camundongos são considerados adultos jovens e apresentam maturidade dos órgãos linfo-hemopoéticos (HOLSAPPLE et al., 2003). Em relação à maturidade óssea, nesta idade apresentam alta relação de volume ósseo/volume total (BV/TV) do osso esponjoso, maior número de trabéculas ósseas e menor distância entre trabéculas quando comparados a animais com 12 meses de idade (HALLORAN et al., 2002).

Os resultados da avaliação do perfil nutricional demonstraram que após 5 semanas de desnutrição, os animais desnutridos perderam o peso corpóreo esperado e o grupo controle ganhou peso. Halloran e colaboradores demonstraram o ganho de 100% de peso no período do nascimento até 12 meses de idade com estabilização do peso até os 24 meses em camundongos C57BL/6J alimentados com ração comercial (HALLORAN et al., 2002). No modelo de desnutrição empregado, apesar dos animais desnutridos terem consumido quantidade menor de ração, não houve diferença significativa de consumo entre os grupos, o que caracteriza um quadro de desnutrição proteica e não proteica energética uma vez que, em função da redução da disponibilidade de proteínas na ração hipoproteica (2,77% de proteína enquanto que a ração controle teve, em média, 13,27% de proteína). Portanto, os animais desnutridos consumiram quantidade significativamente menor de proteína o que resultou em perda de peso que, nas duas primeiras semanas foi mais abrupta, mostrando tendência em se manter diminuída por duas semanas e voltou a diminuir na última semana.

A musculatura esquelética é o principal compartimento corporal de proteínas e na diminuição aguda de consumo das mesmas, o organismo, preferencialmente, realiza catabolismo das proteínas musculares para a manutenção das concentrações séricas normais de aminoácidos necessários às funções vitais. Com

a persistência da privação proteica ocorrem adaptações metabólicas, de diferentes intensidades, desencadeadas e mantidas pela ação de vários hormônios, como insulina e cortisol. Em resposta às baixas concentrações de aminoácidos, as concentrações de insulina diminuem (NAKAJIMA et al., 2014, ORGERON et al., 2014). Em contrapartida, a diminuição na ingestão de proteínas induz ao estresse e causa aumento das concentrações na ação catabólica do cortisol. O aumento da relação cortisol:insulina provoca diminuição da síntese do fator de crescimento insulina símile tipo 1 (IGF-1) conforme demonstrado pelo nosso grupo (NAKAJIMA et al., 2014). Como consequência, o indivíduo manifesta fraqueza, caquexia, retardo do crescimento, não conseguindo adaptar-se à deficiência proteica que é acompanhada por perda da massa muscular, diminuição da resposta imune e debilidade geral. As alterações anatômicas podem ser generalizadas, como hipoplasia e atrofia dos tecidos e, consequente diminuição do tamanho corporal. A baixa ingestão de proteínas não induz de maneira indiscriminada à diminuição da síntese proteica e a resposta fisiológica à DP é regulada pelo sistema endócrino que direciona a utilização de substratos e energia.

No presente trabalho encontramos redução da concentração de proteínas totais e albumina séricas nos animais desnutridos. Clinicamente, a albumina é um marcador de desnutrição. É a proteína mais abundante em circulação e perfaz cerca de 70% da pressão osmótico-coloidal do plasma. Em condições normais a albumina migra através das paredes dos vasos para o compartimento extracelular, entretanto, a maior parte retorna ao compartimento intravascular pelo sistema linfático. A síntese hepática desta proteína encontra-se prejudicada quando há diminuição da ingestão de proteínas, sendo que a redução da síntese depende do tempo em que foi mantida a oferta insuficiente.

A avaliação bioquímica do estado nutricional pode detectar precocemente o comprometimento nutricional antes mesmo de modificações antropométricas (JEEJEEBHOY, 2000). A determinação da concentração sérica de albumina é um parâmetro que permite monitorar o estado proteico visceral. Entretanto, algumas considerações devem ser mencionadas quanto às características de alguns marcadores bioquímicos. A albumina é um indicador pouco sensível de desnutrição, pois a reserva corporal é grande e essa proteína possui uma meia-vida longa (20 dias). Também é importante ressaltar que outros fatores não nutricionais, como estresse, traumatismos e cirurgias podem afetar as concentrações séricas de

albumina (FANALI et al., 2012). Uma alternativa ao uso da albumina é a determinação da pré-albumina, uma proteína que tem meia vida de dois dias (SHENKIN, 2006).

Vários parâmetros bioquímicos têm sido utilizados em estudos da avaliação do estado nutricional. Estudo que avaliou o risco de morte em crianças de Uganda, severamente desnutridas, antes e após suplementação nutricional, demonstrou aumento sérico de cetonas, indicando lipólise ativa e oxidação de ácidos graxos; diminuição das concentrações de albumina, insulina, IGF-1, adiponectina e leptina. Paralelamente encontraram concentrações elevadas de grelina, cortisol, interleucina-6 e do peptídeo YY. A diminuição da leptina foi o biomarcador de maior risco para mortalidade associada à desnutrição grave (FREEMARK, 2015).

5.2 Aspectos hematológicos

Em relação aos parâmetros hematológicos do sangue periférico, os animais do grupo desnutrido apresentaram diminuição do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, do hematócrito e do número de reticulócitos. A redução do número de reticulócitos associado à redução de hemácias e hemoglobina evidencia um quadro de hipoproliferação medular da série eritroide. Também observamos redução do número de leucócitos totais, de linfócitos e plaquetas. A hipoproliferação medular foi confirmada pela contagem das células da medula óssea. Encontramos diminuição significativa do número de blastos, células da série granulocítica, linfocitária, eritrócitos imaturos e linhagem megacariocítica. Estes resultados estão de acordo com dados anteriores do grupo para o quadro de desnutrição, uma vez que o tecido hemopoético apresenta alta taxa de proliferação e renovação celular e requer elevado aporte de proteínas, vitaminas e sais minerais (BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000; BORELLI et al., 2007; XAVIER et al. 2007; FOCK et al., 2010).

A dieta hipoproteica resultou em diminuição do número de células nucleadas na medula óssea, entretanto, não detectamos, nesses grupos analisados, evidente hipoplasia medular nos esternos e fêmures dos animais desnutridos na avaliação

dos cortes histológicos. Avaliações histológicas de esternos em camundongos Swiss realizadas em estudos anteriores do nosso grupo evidenciaram a presença de hipoplasia e presença aumentada de adipócitos, em animais que apresentaram perda de peso acima de 35% do peso inicial do experimento, indicando que possivelmente haja diferença de resposta medular entre as espécies estudadas (XAVIER et al., 2007), ou ainda, que para hipoplasias discretas, o exame histológico não tenha sensibilidade uma vez que a faixa considerada normocelular para medula óssea é de 25 a 75% de células hemopoéticas (FARHI et al., 2004). Corroborando os resultados quantitativos do número reduzido de células na medula óssea dos animais desnutridos. A avaliação realizada neste trabalho utilizando raios-X, evidenciou, nos mesmos, diminuição da densidade medular na região proximal do fêmur, indicativo da menor quantidade de células nesta região.

Em relação à quantificação das células-tronco hemopoéticas (CTH), por citometria de fluxo, confirmamos nossa hipótese de que havia menor número de CTH nos animais desnutridos. A estratégia de múltipla marcação celular com combinações de marcadores de superfície permitiu a quantificação das células-tronco de longa duração (LT-CTH), células-tronco de curta duração (CT-CTH) e progenitores multipotentes (PMP), uma vez que nenhuma delas possui um marcador exclusivo. As características que definem as células-tronco hemopoéticas são a capacidade de autorrenovação e pluripotência (SEITA e WEISSMAN, 2010). Como a maioria das células maduras tem um tempo de vida limitado, a capacidade das células-tronco hemopoéticas (CTH) tanto para substituir as células senescentes como para se perpetuar por meio da autorrenovação é fundamental para a manutenção da homeostase do tecido. O tamanho das populações de células progenitoras depende do equilíbrio entre a autorrenovação e diferenciação celular. Quando a taxa de autorrenovação é mais elevada do que o da diferenciação, a população de CTH se expande, ao passo que, quando a taxa de autorenovação é menor do que a taxa de diferenciação, a população diminui devido ao esgotamento do pool de CTH (ITO e SUDA, 2014). Em nosso trabalho observamos que a desnutrição diminui a autorrenovação das células-tronco de longa duração (LT-CTH) evidenciada pelo aumento do número de células em G0/G1 e diminuição nas fases S/G2/M. Entretanto, as células CT-CTH e progenitores multipotentes (PMP) não apresentaram diferenças significativas entre estas fases, o que aparentemente evidencia um comprometimento seletivo das células LT-CTH pela desnutrição. Este

resultado também reforça nossa hipótese de que há alterações no nicho endosteal uma vez que estas células se localizam preferencialmente nesta região.

A modificação do potencial proliferativo das LT-CTH pode ter ocorrido em consequência das alterações do nicho endosteal e/ou resultado direto da carência de aminoácidos promovido pela desnutrição. A maior parte das células-tronco da medula óssea está no estado quiescente. Em camundongos, as CTH se dividem em média uma vez a cada 32 dias, mas há subpopulações que se dividem apenas 5 vezes ao longo davida do animal, entretanto, estas células podem deixar o estado quiescente em caso de perda de células do sistema hemopoético (VAN DER WATH et al., 2009; WILSON et al., 2009). Uma questão ainda não elucidada é o tempo de duração de G0 entre os subtipos LT-CTH e CT-CTH. Também não está elucidado se os mecanismos que regularm o ciclo celular de ambas as populações celulares são distintos (EMA et al., 2014). De fato, as LT-CTH situadas no nicho endosteal apresentam algumas características distintas das CT-CTH sendo uma destas, o perfil metabólico. O endósteo tem baixa tensão de oxigênio e as células LT-CTH murinas situadas neste local têm menor quantidade de mitocôndrias, utilizam a via glicolítica como fonte principal de produção de energia ao invés de fosforilação mitocondrial oxidativa e ainda expressam maior quantidade do fator HIF-1α (fator induzido por hipóxia 1) (ELIASSON e JONSSON, 2010). Estudo com células-tronco e progenitoras humanas de fenótipo Lin-/CD34+/CD38+/CD90+ obtidas do sangue periférico após estimulação com G-CSF apresentaram o mesmo perfil metabólico que as células-tronco murinas (KOCABAS et al., 2015). Também foi interessante o fato destas células terem sido coletadas do sangue periférico e ainda assim, apresentarem o mesmo fenótipo metabólico do endósteo. Essa observação reponde a uma questão até então não demonstrada em camundongos, a de que, pelo menos este fenótipo metabólico, é intrínseco à célula e não dependente das características do nicho endosteal (KOCABAS et al., 2015).

Estudos do nosso grupo de pesquisa evidenciaram aumento de autofagia das células totais da medula óssea (BELTRAN, 2014). É possível que a diminuição das populações LT-CTH e CT-CTH ocorra por ativação da autofagia seguida de apoptose e essa hipótese é atualmente invetigada em nosso grupo de pesquisa. A autofagia é um processo de degradação lisossomal que ajusta a resposta celular à disponibilidade de nutrientes por degradar e reciclar conteúdos intracelulares não essenciais (CHEN et al., 2014). Este processo pode ser ativado pela privação de

nutrientes (SINGH e CUERVO, 2011), danos ao retículo endoplasmático (YORIMITSU e KLIONSKY, 2007), danos ao DNA (KATAYAMA et al., 2007) e por espécies reativas de oxigênio (CHEN et al., 2009). Estudos demonstraram que o aumento da quantidade de espécies reativas de oxigênio influencia na capacidade de autorrenovação em longo prazo das células-tronco (NAKA e HIRAO, 2011). Outros autores demonstraram que células-tronco Atm-/- (uma serina/treonina quinase envolvida em resposta a danos ao DNA) tinham elevada concetração instracelular de espécies reativas de oxigênio e ainda apresentavam reduzida propriedade de autorrenovação (ITO et al., 2004). Ito e colaboradores também demonstraram que as células-tronco de longa duração da medula óssea murina foram fortemente positivas para pimonidazole, um marcador de hipóxia, sugerindo que baixa concentração de espécies reativas de oxigênio contribui para a manutenção do potencial de autorrenovação das células-tronco da medula óssea. (ITO et al., 2006). Na autofagia também pode ocorrer degradação de mitocôndrias lesadas, o que previne a geração excessiva que espécies reativas de oxigênio que poderiam induzir danos ao DNA. A deleção condicional de Atg7 (gene essencial para a montagem do autofagossomo) das células-tronco hemopoéticas e progenitoras em camundongos resultou em anemia e linfopenia nos animais (MORTENSEN et al., 2010). Observou-se ainda que as células-tronco e progenitoras acumularam mitocôndrias danificadas, elevada concentração de superóxido, danos ao DNA e apoptose via ativação de caspase 3 (MORTENSEN et al., 2010).

De maneira sucinta, as proteínas que controlam o ciclo celular podem ser classificadas em 3 grupos principais: ciclinas, quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e inibidores de CDKs. Entre os inibidores de CDKs estão p27kip e p21waf1/cip1. A formação do complexo ciclina-CDK permite a progressão nas fases do ciclo celular. Dados do nosso grupo mostraram que ocorre parada do ciclo celular das células-tronco e progenitoras (correspondente ao fenótipo linhagem hemopoética negativa) em animais desnutridos com aumento de expressão dos inibidores de progressão do ciclo celular p27kip e p21waf1/cip1 (NAKAJIMA et al., 2014). A proliferação celular é dependente de vários fatores tais como disponibilidade de glicose e aminoácidos, bem como a presença de fatores de crescimento. Os aminoácidos são substratos da síntese proteica e também modulam a atividade das vias de sinalização que regulam este processo. A via do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)/AKT e mTOR (o alvo da rapamicina em

mamíferos) são duas vias que transmitem sinais de proliferação e sobrevivência das células. Estas vias são dependentes da disponibilidade de nutrientes e de fatores de crescimento que sinalizam a divisão celular. Na presença de um estímulo proliferativo Akt pode fosforilar p21waf1/cip1 localizado no citoplasma e inibe a atividade deste. Como resutlado, as CDKs ficam livres para promover a progressão do ciclo celular. Sabemos que a DP afeta a via mTOR/AkT com redução da forma fosforilada de mTOR e AkT com consequente ativação da autofagia (BELTRAN, 2014) das células totais da medula óssea. Além disso, entre as principais modulações exercidas por AkT estão a regulação negativa dos fatores que inibem a progressão do ciclo celular p27kip e p21waf1/cip1 (ZHOU et al., 2001).

É possível que as células-tronco de longa duração (LT-CTH) expressem reguladores negativos de Akt ou mTOR que não estejam expressos na CT-CTH ou nos progenitores multipotentes. Assim, as consequências da desnutrição afetariam mais intensamente as células LT-CTH com parada do ciclo celular nestas células. A presença ou ativação seletiva destes inibidores pode ser uma estratégia celular para limitar a diferenciação na carência de nutrientes. Essa hipótese tem como fundamento estudos com células-tronco e progenitoras da retina de larvas de Xenopus laevis na restrição nutricional. Na restrição nutricional as células-tronco da retina pararam de proliferar e os progenitores comprometidos se diferenciaram mais rapidamente. Os autores observaram que a restrição de nutrientes inibiu a proliferação e diferenciação de maneira dependente de mTOR apenas das células progenitoras e não nas células-tronco da retina (LOVE et al. 2014). Embora o ciclo celular das células em proliferação opera em conjunto com o controle da diferenciação, não está completamente elucidado como a diferenciação é afetada pela disponibilidade de nutrientes.

5.3 Aspectos ósseos

Em relação às dosagens bioquímicas de cálcio, fósforo e paratormônio (PTH) séricos, não observamos diferenças entre os grupos controle e desnutrido. Nossa hipótese inicial era de que a ingestão diminuída de proteínas provocasse diminuição

da absorção de cálcio e consequente diminuição sérica de cálcio. Em resposta a diminuição da calcemia, os camundongos aumentariam a produção de PTH. Grüdtner e colaboradores demonstraram que condições de hipoproteinemia levam a problemas de absorção em decorrência do edema de mucosa e deficiência em proteínas de transporte (GRÜDTNER et al., 1997).

A manutenção dos estoques corporais de cálcio ocorre por meio da ingestão alimentar e da absorção. A absorção de cálcio ocorre por transporte ativo (transcelular) dependente de 1,25 $(OH)_2D3$ e do receptor de vitamina D (VDR), principalmente no duodeno (no qual há expressão significativa de VDR) e em situações de baixa ingestão de cálcio. Quando há ingestão elevada de cálcio ocorre a difusão passiva (paracelular) ao longo de todo o intestino delgado, por meio das junções comunicantes localizadas entre as células epiteliais. Os mecanismos moleculares-chave da passagem de cálcio do lúmen para dentro das células dependem de canais apicais de cálcio (localizados na membrana da borda em escova), conhecidos como *transient receptor potential cátion channel, vanilloid family, members 6 and 5* (TRPV6 e TRPV5). Esses canais são regulados, direta ou indiretamente, pela vitamina D e pelo cálcio proveniente da alimentação, e são controlados por mecanismo de retroalimentação pelo cálcio intracelular. Intestinos e rins são os principais órgãos envolvidos no transporte de cálcio, contribuindo para a absorção do mesmo proveniente da alimentação e pela reabsorção tubular (BRONNER, 2009). Também seria possível que, mesmo sem haver alterações na calcemia, o menor consumo de proteínas, *per si*, pudesse diminuir a síntese de PTH, o que não verificamos. Em estudo com humanos, Campbell e colaboradores demonstraram que o consumo diminuído de proteínas durante duas semanas, sem alterações da ingestão de cálcio, não induziu aumento da concentração de PTH (CAMPBELL et al., 2004).

É possível que a menor ingestão de proteínas não tenha afetado a absorção intestinal de cálcio, o que por sua vez, manteve a homeostase da calcemia e não induziu ao aumento da síntese de PTH. Desta forma, a diminuição da densidade mineral óssea e as alterações da microarquitetura por nós encontradas nos animais do grupo desnutrido são decorrentes de outros mecanismos. Outra hipótese é a de que seria necessário um intervalo de tempo maior do que cinco semanas para promover diminuição na calcemia e aumento das concentrações séricas de PTH.

Também não observamos alterações nas concentrações séricas de fósforo. Seria de se esperar que estivesse diminuída em virtude da menor ingestão de proteínas. E, entretanto, vale ressaltar que a mistura mineral que os animais desnutridos receberam apresentava quantidade corrigida de fosfato e iguais em todos os outros minerais.

Em relação à análise da densidade mineral óssea, padronizamos os parâmetros de aquisição *in vivo* e os de análise, em diferentes regiões de interesse. A densidade mineral óssea foi determinada pela quantidade de conteúdo mineral por volume de osso. Os animais utilizados no estudo apresentavam diferença de, no máximo, 2 dias de idade, em função do número de animais fornecidos pelo biotério.

Observamos redução da densidade óssea em todas as regiões das corticais dos fêmures analisados. Entretanto, o programa de análise não permitiu avaliar a arquitetura trabecular. Assim, caracterizamos mais detalhadamente as regiões trabeculares para a determinação de parâmetros tais como número, espessura, distância e orientação das trabéculas utilizando microtomografia computadorizada. A diminuição da densidade óssea pode estar associada à baixa ingestão de proteínas. A proteína dietética desempenha papel importante na manutenção da densidade óssea e na massa muscular. A presença de proteínas é uma importante fonte de aminoácidos necessários para o desenvolvimento e manutenção da estrutura óssea. Entretanto, o efeito depende da quantidade e da fonte proteica (ROSSEN et POLLAK, 1999).

A ingestão de proteínas afeta a massa óssea por vários mecanismos: síntese de proteínas estruturais colagênicas e não colagênicas e aumento das concentrações de IGF-1. O hormônio de crescimento (GH) é o principal regulador fisiológico da produção hepática de IGF1. A concentração de IGF1 circulante está associada ao ganho de massa óssea e homeostase óssea. Indivíduos deficientes de GH possuem baixas concentrações séricas de IGF1 e menor massa óssea que os normais (HOLMES et al., 1994), e o declínio de IGF1 sérico parece estar associado à redução de massa óssea no envelhecimento (ROSEN e POLLAK, 1999). O hormônio IGF1 também é produzido no microambiente ósseo pelos osteoblastos corticais e trabeculares e, de fato, o maior reservatório de IGFs no organismo não é o fígado e sim os ossos. Dados do nosso grupo demonstram redução na concentração de IGF1 nesse modelo de desnutrição (NAKAJIMA et al., 2014).

A densidade mineral óssea se refere à quantidade de matéria mineral por centímetro cúbico de osso e permite a quantificação da massa óssea. Entretanto, é uma medida pontual, estática, que não avalia as alterações dinâmicas que ocorrem no tecido ósseo. A microarquitetura óssea é uma estrutura dinâmica, em constante mudança em resposta a vários fatores tais como demandas metabólicas, mecânicas, hormonais e inflamatórias. A arquitetura e a composição do osso são importantes, pois, ossos longos são mais resistentes às forças de tensão do que os ossos pequenos, mesmo que estes apresentem densidade mineral equivalente. A quantidade de trabéculas e o osso cortical de um determinado local também afeta a resistência óssea e que é afetada por diversos fatores, como idade, gênero e condições metabólicas. O osso trabecular é um material não homogêneo, consistindo em uma estrutura reticular porosa com uma área de superfície duas vezes superior ao osso compacto. Estas características conferem flexibilidade ao osso trabecular e resistência a impactos mecânicos. Por outro lado, o osso cortical confere rigidez. Locais que contém maior quantidade de osso trabecular são mais frequentemente associados a fraturas (BURGHARDT et al., 2011). Além disso, observamos, nos fêmures de animais desnutridos maior quantidade de trabéculas no formato de hastes em comparação aos animais controles, o que também evidencia maior susceptibilidade a fraturas (SHI et al., 2010) e caracteriza o quadro de osteoporose. A osteoporose é uma doença sistêmica do esqueleto caracterizada por diminuição da massa óssea e deterioração microarquitetural do tecido ósseo, com consequente aumento da fragilidade óssea e susceptibilidade à fratura. A diminuição do peso do animal também provoca diminuição das cargas sobre o esqueleto, desencadeando a reabsorção óssea (FROST, 1987). Observamos, ainda, aumento do número de osteoclastos nas regiões trabecular e cortical dos fêmures dos animais desnutridos. O aumento da reabsorção óssea na osteoporose está associado ao aumento do número e da atividade de osteoclastos (WOOD et al., 1992).

O envelhecimento provoca mudanças na microarquitetura trabecular com grande influência nas propriedades biomecânicas do osso. Estudos em voluntários humanos indicaram diminuição média de 27% do volume trabecular na região distal do rádio de mulheres e homens com idades de 20 a 90 anos. No entanto, as mulheres, em sua maioria, exibiram diminuição do número de trabéculas e consequente aumento na distância entre as mesmas. Já os homens mostraram

diminuição da espessura trabecular (KHOSLA et al., 2006). Além disso, a microarquitetura do osso trabecular influencia significativamente a resistência óssea, independentemente da densidade mineral óssea. Biópsias ósseas de pacientes com osteopenia com ou sem histórico prévio de fraturas, mostraram que apesar de não haver diferenças no volume trabecular ou na espessura trabecular, pacientes com fraturas anteriores tinham maior separação trabecular em comparação às pacientes sem fraturas (LEGRAND et al., 2000).

A matriz óssea depende de componentes orgânicos e inorgânicos que contribuem para as características de dureza, resistência a fraturas. Defeitos na composição ou organização da matriz mineralizada podem levar ao aumento da fragilidade óssea. Verificamos em cortes histológicos de animais desnutridos, diminuição de colágeno tipo I, osteonectina e osteocalcina na região cortical dos fêmures e observamos também aumento do depósito de OPN na região cortical dos animais desnutridos. Adicionalmente, os resultados da coloração com Picrossírius evidenciaram presença de colágeno tipo III e desorganização das fibras colagênicas nos cortes histológicos da medula óssea dos animais desnutridos.

O colágeno apresenta dois tipos de ligações cruzadas: ligações intramoleculares que ocorrem entre as cadeias α na molécula de tropocolágeno e ligações intermoleculares que ligam uma tripla hélice a outra e são essenciais para o mecanismo de estabilidade da fibra de colágeno. Anormalidades nas ligações cruzadas do colágeno também estão associadas ao aumento do risco de fratura (OXLUND et al., 1995). A orientação das fibras de colágeno também foi identificada como importante preditor de resistência à tração do osso (MARTIN e ISHIDA, 1989). Ossos de camundongos SAMP6, que apresentam desorganização das fibras de colágeno, são mais frágeis, com redução de 23% na força óssea. Outros estudos mostraram que os ossos de pacientes com osteoporose apresentaram expressão alterada de colágeno tipo III e IV quando comparados com indivíduos saudáveis (BAILEY et al., 1993). A conformação tripla hélice do colágeno fornece grande resistência às forças de tensão, apresentando assim grande resistência a tração. Portanto, a desorganização estrutural do colágeno resulta em aumento da fragilidade óssea. Durante o reparo cicatricial ocorre inicialmente a síntese e depósito de colágeno tipo III o qual é gradativamente substituído por colágeno tipo I à medida que ocorre a maturação do tecido cicatricial. Várias desordens do metabolismo do colágeno afetam a qualidade óssea, tais como, escorbuto,

Osteogênese imperfeita, síndrome de Marfan e síndrome de Ehlers-Danlos (UNNANUNTANA et al., 2011).

Em relação às proteínas não colagênicas, apesar de estarem presentes em pequena porcentagem no volume ósseo, controlam o crescimento, formato e tamanho dos cristais de hidroxiapatita. A diminuição de expressão de osteonectina e osteocalcina na região cortical do fêmur dos animais desnutridos, evidenciamos que a desnutrição comprometeu a síntese destas proteínas pelos osteoblastos prejudicando, assim, a mineralização da cortical. Desequilíbrios na remodelação óssea em pacientes com osteoporose também estão associados a alterações na arquitetura do osso cortical com aumento da porosidade. O canal de Havers, no osso cortical, proporciona uma superfície para a ação dos osteoclastos, o que pode aumentar o diâmetro dos canais, aumentando assim a porosidade do osso e levando a trabecularização do osso cortical, que, consequentemente, compromete a força óssea (COOPER et al., 2007).

Ainda em relação à avaliação histológica verificamos aumento do número de osteoclastos nas regiões corticais e trabeculares nos cortes histológicos dos fêmures dos animais desnutridos. Este resultado evidencia um desequilíbrio na homeostase óssea com aumento da diferenciação das células da linhagem monocítica para osteoclastos (FACCIO et al., 2002). Além disso, pode, em parte, justificar as alterações estruturais evidenciadas pelo estudo da microarquitetura óssea.

Outra questão a ser discutida é a participação dos osteoclastos na hemopoese. As células-tronco e progenitoras residem, preferencialmente, nos ossos trabeculares e metáfise dos ossos longos (NILSON et al., 2001). Na região trabecular o contínuo remodelamento pelos osteoclastos libera cálcio e este se liga aos receptores dependentes de cálcio presentes nas células-tronco da medula óssea. Adams e colaboradores mostraram redução da celularidade e do número de células-tronco hemopoéticas em camundongos cujas células-tronco eram deficientes para o receptor de cálcio (ADAMS et al., 2006). A administração farmacológica de um composto calcimimético às células-tronco de fenótipo LSK, aprovado para tratamento de hiperparatireoidismo secundário, aumentou a sensibilidade dos receptores ao cálcio extracelular. As células-tronco foram transplantadas para camundongos e verificou-se que estas se distribuíram preferencialmente na região endosteal e houve aumento da expressão de CXCR4 (LAM et al., 2011). Este receptor favorece a permanência das células-tronco no endósteo.

Os osteoclastos, quando ativos, produzem catepsina-K para o compartimento lisossomal que realiza a degradação da matriz de hidroxiapatita. Além desta função Kollet e colaboradores verificaram que a catepsina-K participa da clivagem da citocina CXCL12 produzida pelo osteoblasto e que promove ancoragem das células-tronco no nicho endosteal (KOLLET et al., 2006). Como resultado, maior número de células-tronco foi observado no sangue periférico. Entretanto, há necessidade de mais estudos devido à falta de um animal catepsina-K knockout. Kollet e colaboradores também verificaram que a metaloproteinase 9 (MMP-9) contribui para o recrutamento de células-tronco para a circulação ao estimularem a ativação de RANKL nos osteoclastos com clivagem de CXCR4 nas células-tronco (KOLLET et al., 2006). A participação de MMP-9 também foi observada em estudo que usou G-CSF na mobilização de CTH da medula óssea murina. Na mobilização das CTH, a medula óssea cria um ambiente altamente proteolítico pela produção de MMP-9, esterases de neutrófilos e catepsina-K acumuladas na medula óssea durante o tratamento do animal com G-CSF (LEVÉSQUE et al., 2002). MMP-9 também é produzida por neutrófilos, monócitos e macrófagos. Nos neutrófilos a MMP-9 é estocada em grânulos específicos e pode ser rapidamente liberada no microambiente medular (KJELDSEN et al., 1994). Além disso, outro estudo verificou falha na mobilização das CTH em animal *knockout* para MMP-9 e demonstrou que esta metaloproteinase participa da liberação do ligante de c-kit e permite a liberação das CTH do nicho endosteal (HEISSIG et al., 2002). Estas observações podem levar o estudo futuro da participação dos osteoclastos em nosso modelo experimental e, atualmente, a sinalização do cálcio nas células-tronco é alvo de estudo em nosso grupo.

Após confirmação de que nosso modelo experimental promoveu alterações da microarquitetura óssea com comprometimento principalmente da região trabecular, realizamos o isolamento das células da região endosteal. Os tratamentos com colagenase mostraram-se eficientes na remoção das células. Verificamos que a morfologia das células removidas correspondia aos osteoblastos, ou seja, células de aspecto cuboide, núcleo polarizado e citoplasma basofílico. A análise dos cortes histológicos após remoção celular evidenciou que os tratamentos foram eficientes.

A imunofenotipagem demonstrou que as células hemopoéticas e Sca-1 positivas foram removidas e que as células isoladas expressaram OPN, confirmando a presença de osteoblastos na população celular isolada. Há um consenso de que

as células da linhagem osteoblástica são $CD45^{-}CD31^{-}Ter119^{-}Sca1^{-}$ e OPN^{+} (MAYACK et WAGERS, 2008). Verificamos, por citometria de fluxo, que os osteoblastos isolados dos animais do grupo desnutrido expressaram maior porcentagem de OPN (**Figura 38**) em relação ao grupo controle, o que corrobora o resultado observado na imunofluorecência para OPN no qual, observamos maior expressão de OPN justamente no grupo desnutrido (**Figura 26**).

Uma das funções da OPN no nicho endosteal é controlar o tamanho do *pool* de CTH. Estudos com camundongos *OPN*$^{-/-}$ sugerem que tal proteína seja um regulador negativo do *pool* de CTH, uma vez que animais *OPN*$^{-/-}$ apresentaram maior porcentagem de CTH (4,11%) quando comparado ao grupo *OPN*$^{+/+}$ (0,93%) caracterizadas imunofenotipicamente como $Sca1^{+}$/c-kit^{+} *(*STIER, 2005). É possível que a desnutrição induza o aumento da expressão de OPN pelos osteoblastos para regular o tamanho do *pool* de CTH, uma vez que observamos menor quantidade de células LSK nos animais desnutridos. A OPN também pode induzir autofagia. Os mecanismos pelos quais a osteopontina induz a autofagia são pouco elucidados, entretanto, sabe-se que esta ativação, ocorre, em parte, pela ligação da OPN com o CD44. OPN contém uma região amino-terminal com sequência de aminoácidos RGD (arginina, glicina e aspartato) que pode se ligar às integrinas. Em estudo com células vasculares endoteliais, o bloqueio de CD44 com anti-CD44 inibiu a autofagia induzida por OPN (ZHENG et al., 2011). Desta forma, parece que a desnutrição favorece a expressão de OPN pelos osteoblastos para manter a quiescência e induzir a autofagia das células-tronco.

A literatura também mostra que a expressão de CD44 é importante para a manutenção da quiescência das células-tronco no nicho endosteal. Portanto, decidimos avaliar os receptores presentes nas CTH que interagem com os osteoblastos, CD44, CXCR4, Tie-2 e Notch-1 e verificamos diminuição da intensidade média de fluorescência de CD44 na população de células LSK e LT-CTH no grupo desnutrido. Além disso, verificamos diminuição da produção de CD44 pela menor expressão gênica nas células-tronco de longa duração (LT-CTH). Esse resultado nos pareceu contraditório, mas na literatura verificamos há vários relatos sobre a diminuição de CD44 e alterações na hemopoese. A participação de CD44 na regulação da hemopoese foi primeiramente descrita por Miyake em 1990. Nos experimentos realizados pelo autor a administração de anti-CD44 à cultura de longa duração de células da medula óssea bloqueou a proliferação das células das

linhagens mieloide e linfoide (MIYAKE et al., 1990). O mesmo efeito foi observado por Khaldoyanidi e colaboradores ao utilizarem anti-CD44 (clone IM7). Neste mesmo trabalho os autores não observaram a formação das áreas de *coblestonne* nas culturas celulares tratadas com anti-CD44 (KHALDOYANIDI et al., 1996). Esses dados corroboram os nossos resultados, pois as células LSK e LT-CTH expressam menos CD44 e esses animais também apresentam diminuição dos precursores de células das linhagens linfoide, mieloide e megacariocítica.

O CD44 é um receptor de superfície de para ácido hialurônico, osteopontina, colágeno e metaloproteinases o que confere múltiplas funções na regulação da proliferação, adesão, sobrevivência e apoptose (THORNE et al., 2004). As funções de CD44 estão associadas às isoformas de CD44. O gene CD44 codifica várias proteínas de superfície celular formadas por *splicing* alternativo de seus exons (LYNCH, 2004). Este gene é constituído por 20 exons, dos quais 10 são denominados exons constantes e são expressos em todos os tipos celulares, essa é a isoforma padrão CD44s. Os demais exons podem ter *splicing* alternativo e serem incorporados aos exons padrões e gerar as variantes CD44v (LYNCH, 2004). As isoformas variantes CD44v6 e CD44v10 apresentam sítio de ligação para OPN (TODARO et al., 2014; MEGAPTCHE et al., 2014). A isoforma CD44v6 é expressa em diferentes tipos de neoplasias malignas e pode atuar como molécula promotora do crescimento e invasão tumoral (GONG et al., 2005).

A fim de avaliarmos a importância da interação OPN-CD44 realizamos os ensaios de cocultura das células LSK e osteoblastos MC3T3-E1 na ausência ou presença de anti-CD44. Inicialmente verificamos que esta linhagem de osteoblastos expressa osteopontina quando cultivada na presença de meio de indução osteogênico. Em relação ao cultivo das células LSK, optamos por utilizar a combinação de SCF, IL-3 e IL-6 para manutenção da cocultura. As citocinas presentes no nicho hemopoético modulam o potencial de expansão, diferenciação e maturação das CTH murinas. Na literatura há descrição de diferentes combinações de citocinas utilizadas na expansão de CTH. Esta combinação foi a que induziu maior proliferação de células LSK após 7 dias de cultura (LUI et al., 2014). Observamos menor proliferação das células LSK dos animais desnutridos quando em cocultura com os osteoblastos em relação às células LSK do grupo controle. Esse dado corrobora o observado *in vivo* evidenciando a menor capacidade proliferativa das células LSK do animal desnutrido.

Além da caracterização imunofenotípica das células isoladas, realizamos cultura destas células em meio contendo indutores de diferenciação osteogênica. Verificamos que as células dos animais desnutridos expressaram menor quantidade de fosfatase alcalina e produziram menor quantidade de pontos de mineralização nos poços da placa de cultura. A menor capacidade de mineralização dos osteoblastos dos animais desnutridos foi evidenciada também pela quantificação do vermelho de alizarina. Esses resultados evidenciam comprometimento da função dos osteoblastos dos animais desnutridos.

Na etapa seguinte evidenciamos diminuição da expressão de osterix, por *Western blotting,* nos osteoblastos dos animais desnutridos. Esta diminuição evidencia um possível bloqueio maturativo nas células da linhagem osteogênica. Nosso grupo já constatou o bloqueio maturativo das células da linhagem hemopoética em animais desnutridos (VINOLO et al., 2008). A administração do quimioterápico 5-fluoroacil nos animais também demonstrou que as células dos animais desnutridos não reestabeleceram a hemopoese normal (BORELLI et al., 2009). Importante ressaltar que, o bloqueio maturativo das células da linhagem osteogência em animais desnutridos não está descrito na literatura até o presente momento. Runx2 e osterix são essenciais para a diferenciação dos osteoblastos. Durante a diferenciação osteogênica, Runx2 e osterix são fatores de transcrição que desempenham papel importante no processo de diferenciação celular. Runx2 está presente nos osteoblastos em todas as etapas de diferenciação celular, desde os osteoprogenitores até os osteoblastos maduros. Runx2 direciona células mesenquimais multipotentes para a linhagem osteoblástica inibindo a diferenciação em adipócitos e condrócitos. Uma vez diferenciados em pré-osteoblastos osterix e Runx2 estimulam a diferenciação dos mesmos em osteoblastos imaturos, que produzem proteínas da matriz óssea. Runx2 inibe a maturação dos osteoblastos e a transição em osteócitos, mantendo osteoblastos em um estágio imaturo (KOMORI, 2003). O bloqueio maturativo de osteoblastos também está relacionado à patologias hematológicas. Estudo demonstrou que a deleção da enzima *Dicer1* que processa miRNA de osterix afetou de maneira seletiva a diferenciação osteogênica e acarretou o desenvolvimento de síndrome mielodisplásica em camundongos (RAAIJMAKERS et al., 2010). A perda de mineralização óssea e defeitos na diferenciação osteogência também foram observadas em modelo murino de leucemia mieloide aguda (FRISCH et al., 2012).

Ainda em relação à expressão proteica nos osteoblastos, verificamos a diminuição da expressão de osteoprotegerina (OPG) nos mesmos. A OPG é uma proteína expressa pelos osteoblastos que inibe a formação e a atividade dos osteoclastos, ligando-se ao RANKL e impedindo sua ligação ao RANK (BLAIR e ATHANASOU, 2004). A diminuição da expressão de OPG diminui a razão OPG/RANKL e permite que as moléculas de RANKL fiquem livres para se ligarem aos receptores RANK presentes nos osteoclastos, permitindo, portanto, a formação e atividade dos mesmos. A ligação RANKL/RANK inibe a apoptose dos osteoclastos e desencadeia a atividade osteoclástica dos mesmos (KAZAMA et al. 2001). Os efeitos catabólicos de RANKL são inibidos pela OPG, um membro da família de receptores de TNF que se liga a RANKL e, assim, impede o acesso de RANKL a seu receptor RANK. O equilíbrio entre a quantidade de RANKL e OPG é determinante da osteoclastogênese. Este resultado corrobora a ideia de que nos animais desnutridos, o estímulo para a reabsorção óssea é maior e por isso foram observadas as alterações ósseas estruturais e histológicas. Um dos fatores que controlam a produção de OPG pelos osteoblastos é o paratormônio (PTH). O PTH ao se ligar ao seu receptor nos osteoblastos induz a secreção de OPG (TALMAGE e NOBLEY, 2008). Entretanto, em nosso modelo de estudo, não podemos atribuir a diminuição da expressão de OPG à ação direta do PTH, pois não evidenciamos alterações significativas nas concentrações deste hormônio.

A ativação osteoclástica pode, ainda, ser favorecida pela ação do fator M-CSF sobre os pré-osteoclastos. O M-CSF é uma molécula crucial no controle da maturação e comprometimento dos precursores de osteoclastos, atuando também na regulação positiva do RANK (mediador na formação de osteoclastos) (EDWARDS e MUNDY, 2011). Sua ação na osteoclastogênese tem início no momento em que os fatores de transcrição PU.1 e MITF, presentes nos progenitores mieloides, ativam a expressão de seu receptor. A ligação do M-CSF ao seu receptor promove a expressão de RANK nos precursores de osteoclastos, possibilitando uma interação osteoblasto/osteoclasto através da ligação RANKL/RANK. Uma vez que ocorra a ligação RANKL/RANK, quinases intrínsecas ativam e fosforilam moléculas de sinalização e recrutam fatores receptores ativadores de TNF (TRAFs), especialmente TRAF 1, 2, 3, 5 e 6, sendo que a TRAF6 promove a ativação de NFκB, JNK, c-Fos, c-Myc e NFATc1, levando à ativação dos progenitores, maturação e ativação dos osteoclastos (BOYCE, 2013; EDWARDS e MUNDY,

2011). Em nosso modelo experimental, não observamos alterações nas concentrações de M-CSF no lavado medular dos animais. Assim, outros fatores podem estar associados à ativação dos osteoclastos.

A fim de continuarmos nossa investigação acerca dos fatores que poderiam contribuir para a permanência das células-tronco no nicho endosteal, optamos por avaliar a expressão gênica de *CXCL12*, angiopoetina (*ANGPT1*), jagged (*JAG2*) e N-caderina (*CDH2*). Verificamos diminuição significativa da expressão gênica de angiopoietina 1 (*ANGPT1*) nos animais desnutridos. A via de sinalização Ang1/Tie2 promove a manutenção das CTH em quiescência e é mediada pela interação entre angiopoietina 1 (*ANGPT1*) produzida por osteoblastos e o receptor Tie2 presente nas CTH. A ativação dos receptores do tipo tirosina quinase Tie2 mantém as CTH no nicho hemopoético e induzem saída em G0 (ARAI et al., 2005). Verificamos diminuição da expressão gênica de *ANGPT1* nos animais desnutridos. Este resultado é desfavorável à permanência das células-tronco em quiescência no nicho endosteal. Outra função a ser avaliada é a função da angiopoetina na formação óssea. Embora os osteoblastos expressem angiopoietina 1, o papel desta proteína na formação óssea permanece pouco elucidado. Suzuki e colaboradores demonstraram que a superexpressão de angiopoietina em osteoblastos de animais transgênicos (Ang1-Tg) resultou em aumento da massa óssea e melhores parâmetros ósseos *in vivo* quando comparados ao tipo selvagem. Os animais também apresentavam maior número de células endoteliais vasculares nos animais Ang1-Tg evidenciando relação entre osteoblastos e células endoteliais (SUZUKI et al., 2007). Em outro estudo, a superexpressão de angiopoietina em ostoblastos melhorou a propriedade das células-tronco de fenótipo LSK em reconstituir a medula óssea à longo prazo. Os autores observaram que a superexpressão de angiopoietina aumentou a capacidade de diferenciação das células LSK (IKUSHIMA et al., 2013). Essas observações justificariam nosso resultado de diminuição de angiopoietina nos desnutridos sugerindo que, embora classicamente, a função da angiopoetina seja induzir a quiescência celular, o fato da DP ter prejudicado a diferenciação dos osteoblastos comprometeu a síntese de angiopoietina.

Em resumo, encontramos nosso modelo experimental de desnutrição proteica, comprometimento da microarquitetura óssea, prejuízo da diferenciação osteogênica, aumento da expressão de osteopontina e osteoprotegerina e diminuição da síntese de angiopoietina nos osteoblastos. Também encontramos

aumento do número de osteoclastos no fêmur dos animais. Em relação ao sistema hemopoético houve diminuição do número de células-tronco com capacidade de reconstituir a hemopoese em longo (LT-CTH) e curto prazo (CT-CTH), diminuição do número de progenitores multipotentes. O ciclo celular das células LT-CTH também estava comprometido com aumento do número de células em quiescência. As células LSK dos animais desnutrido também apresentaram menor expressão de CD44 e menor capacidade proliferativa quando em cocultura de osteoblastos MC3T3-E1.

6 CONCLUSÕES

Concluímos que a DP promoveu alterações tanto no tecido ósseo quanto nas células-tronco hemopoéticas. Entretanto, não podemos afirmar que as alterações observadas no sistema hemopoético foram decorrentes exclusivamente de alterações do nicho endosteal. É possível que características intrínsecas às células-tronco também tenham acarretado às alterações da hemopoese nos animais desnutridos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. B.; CHABNER, K. T.; ALLEY, I. R.; et al. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. **Nature**, v. 439, n. 7076, p. 599–603, 2006.

ADOLFSSON, J.; BORGE, O. J.; BRYDER, D.; et al. Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin(-)Sca1(+)c-kit(+) stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. **Immunity**, v. 15, n. 4, p. 659–669, 2001.

AHMED, T.; RAHMAN, S.; CRAVIOTO, A. Oedematous malnutrition. **The Indian journal of medical research**, v. 130, n. 5, p. 651–654, 2009.

AKASHI, K.; KONDO, M.; CHESHIER, S.; et al. Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors. **Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology**, v. 64, p. 1–12, 1999.

ALELE, J. D.; KAMEN, D. L.; HUNT, K. J.; RAMSEY-GOLDMAN, R. Bone geometry profiles in women with and without SLE. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 11, p. 2719–2726, 2011.

ALFORD, A. I.; HANKENSON, K. D. Matricellular proteins: Extracellular modulators of bone development, remodeling, and regeneration. **Bone**, v. 38, n. 6, p. 749–757, 2006.

ALLISTON, T. Biological regulation of bone quality. **Current Osteoporosis Reports**, v. 12, n. 3, p. 366–375, 2014.

ARAI, F.; HIRAO, A.; SUDA, T. Regulation of hematopoiesis and its interaction with stem cell niches. **International journal of hematology**, v. 82, n. 5, p. 371–376, 2005.

ASAGIRI, M.; SATO, K.; USAMI, T.; et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in bone homeostasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 9, p. 1261–1269, 2005.

BAILEY, A. J.; WOTTON, S. F.; SIMS, T. J.; THOMPSON, P. W. Biochemical changes in the collagen of human osteoporotic bone matrix. **Connective tissue research**, v. 29, n. 2, p. 119–132, 1993.

BARJA-FIDALGO, C.; SOUZA, E. P. G.; SILVA, S. V.; et al. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. **Inflammation research**, v. 52, n. 11, p. 470–476, 2003.

BARKER, L. A.; GOUT, B. S.; CROWE, T. C. Hospital malnutrition: prevalence, identification and impact on patients and the healthcare system. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 2, p. 514–527, 2011.

BELTRAN, J.S. Avaliação da participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2013.

BHUTTA, Z. A.; SALAM, R. A. Global nutrition epidemiology and trends. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v. 61 Suppl 1, p. 19–27, 2012.

BONNET, D. Haematopoietic stem cells. **The Journal of pathology**, v. 197, n. 4, p. 430–440, 2002.

BLAIR, H. C.; ATHANASOU, N. A. Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption. **Histology and Histopathology**, v. 19, n. 1, p. 189–199, 2004.

BORELLI, P.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; et al. Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. **The British journal of nutrition**, v. 97, n. 2, p. 307–314, 2007.

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

BORELLI, P.; SOUZA, I. P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M. L.; KANG, H. C. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Annals of nutrition & metabolism**, v. 42, n. 6, p. 367–373, 1998.

BOSKEY, A. L.; COLEMAN, R. Aging and bone. **Journal of dental research**, v. 89, n. 12, p. 1333–1348, 2010.

BOYCE, B. F. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 10, p. 860–867, 2013.

BOYCE, B. F.; ROSENBERG, E.; DE PAPP, A. E.; DUONG, L. T. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 42, n. 12, p. 1332–1341, 2012.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337–342, 2003.

BRACH, M. A.; HERRMANN, F. Hematopoietic growth factors: interactions and regulation of production. **Acta haematologica**, v. 86, n. 3, p. 128–137, 1991.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 19, n. 9, p. 895, 1949.

BRONNER, F. Recent developments in intestinal calcium absorption. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 2, p. 109–113, 2009.

BRYDER, D.; ROSSI, D. J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. **The American journal of pathology**, v. 169, n. 2, p. 338–346, 2006.

BURGHARDT, A. J.; LINK, T. M.; MAJUMDAR, S. High-resolution Computed Tomography for Clinical Imaging of Bone Microarchitecture. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 469, n. 8, p. 2179–2193, 2011.

BURSTONE, M. S. Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 21, n. 3, p. 523–539, 1958.

CALVI, L. M.; ADAMS, G. B.; WEIBRECHT, K. W.; et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 841–846, 2003.

CAMPBELL, W. W.; FLEET, J. C.; HALL, R. T.; CARNELL, N. S. Short-term low-protein intake does not increase serum parathyroid hormone concentration in humans. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 8, p. 1900–1904, 2004.

CESAR, R.; BOFFA, R. S.; FACHINE, L. T.; et al. Evaluation of Trabecular Microarchitecture of Normal Osteoporotic and Osteopenic Human Vertebrae. **Procedia Engineering**, v. 59, p. 6–15, 2013. Acesso em: 28/1/2016.

CHABAS, D. Osteopontin, a multi-faceted molecule. **Medecine sciences**, v. 21, n. 10, p. 832–838, 2005.

CHEN, C.-Z.; LI, L.; LI, M.; LODISH, H. F. The endoglin(positive) sca-1(positive) rhodamine(low) phenotype defines a near-homogeneous population of long-term repopulating hematopoietic stem cells. **Immunity**, v. 19, n. 4, p. 525–533, 2003.

CHEN, C.-Z.; LI, M.; DE GRAAF, D.; et al. Identification of endoglin as a functional marker that defines long-term repopulating hematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 24, p. 15468–15473, 2002.

CHEN, R.; ZOU, Y.; MAO, D.; et al. The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. **The Journal of Cell Biology**, v. 206, n. 2, p. 173–182, 2014.

CHEN, Y.; AZAD, M. B.; GIBSON, S. B. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 285–295, 2010.

CHITTETI, B. R.; CHENG, Y.-H.; KACENA, M. A.; SROUR, E. F. Hierarchical organization of osteoblasts reveals the significant role of CD166 in hematopoietic stem cell maintenance and function. **Bone**, v. 54, n. 1, p. 58–67, 2013.

CHRISTENSEN, J. L.; WEISSMAN, I. L. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14541–14546, 2001.

CLEMENS, T. L.; KARSENTY, G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 26, n. 4, p. 677–680, 2011.

CONDE, W. L.; MONTEIRO, C. A. Nutrition transition and double burden of undernutrition and excess of weight in Brazil. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. 6, p. 1617S–22S, 2014.

COOPER, D. M. L.; THOMAS, C. D. L.; CLEMENT, J. G.; et al. Age-dependent change in the 3D structure of cortical porosity at the human femoral midshaft. **Bone**, v. 40, n. 4, p. 957–965, 2007.

DELANY, A. M.; AMLING, M.; PRIEMEL, M.; et al. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 105, n. 7, p. 915–923, 2000.

EAVES, C. J.; CASHMAN, J. D.; SUTHERLAND, H. J.; et al. Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 628, p. 298–306, 1991.

EDWARDS, J. R.; MUNDY, G. R. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 7, n. 4, p. 235–243, 2011.

ELIASSON, P.; JÖNSSON, J.-I. The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. **Journal of Cellular Physiology**, v. 222, n. 1, p. 17–22, 2010.

EMA, H.; MORITA, Y.; SUDA, T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. **Experimental Hematology**, v. 42, n. 2, p. 74–82.e2, 2014.

FACCIO, R.; GRANO, M.; COLUCCI, S.; et al. Localization and possible role of two different alpha v beta 3 integrin conformations in resting and resorbing osteoclasts. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. Pt 14, p. 2919–2929, 2002.

FANALI, G.; DI MASI, A.; TREZZA, V.; et al. Human serum albumin: From bench to bedside. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 33, n. 3, p. 209–290, 2012.

FANTNER, G. E.; ADAMS, J.; TURNER, P.; et al. Nanoscale ion mediated networks in bone: osteopontin can repeatedly dissipate large amounts of energy. **Nano letters**, v. 7, n. 8, p. 2491–2498, 2007.

FARHI, D.C.; CHAI, C.C.; EDELMAN, A.S., PARVEEN, T.; VO, T, L, T. **Patholoy of Bone Marrow and Blood Cells. Lippincott Williams & Wilkins**, v.1, p16, 2004.

FISHER, L. W.; TORCHIA, D. A.; FOHR, B.; YOUNG, M. F.; FEDARKO, N. S. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 280, n. 2, p. 460–465, 2001.

FOCK, R. A.; BLATT, S. L.; BEUTLER, B.; et al. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. **Nutrition**, v. 26, n. 10, p. 1021–1028, 2010.

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

FOLMES, C. D. L.; DZEJA, P. P.; NELSON, T. J.; TERZIC, A. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 5, p. 596–606, 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2015. **The State of Food Insecurity in the World**. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>. Acesso em: 10 dez. 2015.

FRANZ-ODENDAAL, T. A.; HALL, B. K.; WITTEN, P. E. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. **Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 235, n. 1, p. 176–190, 2006.

FREEMARK, M. Metabolomics in nutrition research: biomarkers predicting mortality in children with severe acute malnutrition. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 36, n. 1 Suppl, p. S88–92, 2015.

FRISCH, B. J.; PORTER, R. L.; CALVI, L. M. Hematopoietic niche and bone meet. **Current opinion in supportive and palliative care**, v. 2, n. 3, p. 211–217, 2008.

FROST, H. M. The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. **Bone and mineral**, v. 2, n. 2, p. 73–85, 1987.

GONG, Y.; SUN, X.; HUO, L.; WILEY, E. L.; RAO, M. S. Expression of cell adhesion molecules, CD44s and E-cadherin, and microvessel density in invasive micropapillary carcinoma of the breast. **Histopathology**, v. 46, n. 1, p. 24–30, 2005.

GONZÁLEZ-TORRES, C.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, H.; MILIAR, A.; et al. Effect of Malnutrition on the Expression of Cytokines Involved in Th1 Cell Differentiation. **Nutrients**, v. 5, n. 3, p. 579–593, 2013.

GRÜDTNER, V. S.; WEINGRILL, P.; FERNANDES, A. L. Aspectos da absorção no metabolismo do cálcio e vitamina D. **Rev Bras Reumatol**, v. 37, n. 3, p. 143-151, 1997.

HALLORAN, B. P.; FERGUSON, V. L.; SIMSKE, S. J.; et al. Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 17, n. 6, p. 1044–1050, 2002.

HEISSIG, B.; HATTORI, K.; DIAS, S.; et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. **Cell**, v. 109, n. 5, p. 625–637, 2002.

HIRSHBERG, A.; SHERMAN, S.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Collagen fibres in the wall of odontogenic keratocysts: a study with picrosirius red and polarizing microscopy. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 28, n. 9, p. 410–412, 1999.

HOLMES, S. J.; ECONOMOU, G.; WHITEHOUSE, R. W.; ADAMS, J. E.; SHALET, S. M. Reduced bone mineral density in patients with adult onset growth hormone deficiency. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 78, n. 3, p. 669–674, 1994.

HOLSAPPLE, M. P.; WEST, L. J.; LANDRETH, K. S. Species comparison of anatomical and functional immune system development. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 68, n. 4, p. 321–334, 2003.

HOSOKAWA, K.; ARAI, F.; YOSHIHARA, H.; et al. Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 554–563, 2010.

HUANG, J. C.; SAKATA, T.; PFLEGER, L. L.; et al. PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 19, n. 2, p. 235–244, 2004.

HUNTER, G. K.; HAUSCHKA, P. V.; POOLE, A. R.; ROSENBERG, L. C.; GOLDBERG, H. A. Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. **The Biochemical journal**, v. 317 (Pt 1), p. 59–64, 1996.

IKUSHIMA, Y. M.; ARAI, F.; NAKAMURA, Y.; et al. Enhanced Angpt1/Tie2 signaling affects the differentiation and long-term repopulation ability of hematopoietic stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 1, p. 20–25, 2013.

ITO, K.; HIRAO, A.; ARAI, F.; et al. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. **Nature Medicine**, v. 12, n. 4, p. 446–451, 2006.

ITO, K.; HIRAO, A.; ARAI, F.; et al. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 997–1002, 2004.

ITO, K.; SUDA, T. Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 4, p. 243–256, 2014.

JEANNET, G.; SCHELLER, M.; SCARPELLINO, L.; et al. Long-term, multilineage hematopoiesis occurs in the combined absence of beta-catenin and gamma-catenin. **Blood**, v. 111, n. 1, p. 142–149, 2008.

JEEJEEBHOY, K.N. Nutritional assessment. **Nutrition**. 2000;16(7-8):585-90.

JEN, M.; YAN, A. C. Syndromes associated with nutritional deficiency and excess. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 6, p. 669–685, 2010.

JOOSTEN, K. F. M.; HULST, J. M. Prevalence of malnutrition in pediatric hospital patients. **Current opinion in pediatrics**, v. 20, n. 5, p. 590–596, 2008.

JORDAN, A. R.; RACINE, R. R.; HENNIG, M. J. P.; LOKESHWAR, V. B. The Role of CD44 in Disease Pathophysiology and Targeted Treatment. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 182, 2015.

JUSTESEN, J.; STENDERUP, K.; ERIKSEN, E. F.; KASSEM, M. Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. **Calcified tissue international**, v. 71, n. 1, p. 36–44, 2002.

KATAYAMA, M.; KAWAGUCHI, T.; BERGER, M. S.; PIEPER, R. O. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, n. 3, p. 548–558, 2007.

KAZAMA, J. J.; MARUYAMA, H.; GEJYO, F. Osteoclastogenesis and osteoclast activation in dialysis-related amyloid osteopathy. **American Journal of Kidney Diseases: The Official Journal of the National Kidney Foundation**, v. 38, n. 4 Suppl 1, p. S156–160, 2001.

KEARNS, A. E.; KALLMES, D. F. Osteoporosis primer for the vertebroplasty practitioner: expanding the focus beyond needles and cement. **AJNR. American journal of neuroradiology**, v. 29, n. 10, p. 1816–1822, 2008.

KHALDOYANIDI, S.; DENZEL, A.; ZÖLLER, M. Requirement for CD44 in proliferation and homing of hematopoietic precursor cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, n. 5, p. 579–592, 1996.

KHOSLA, S.; RIGGS, B. L.; ATKINSON, E. J.; et al. Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment. **Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 1, p. 124–131, 2006.

KIEL, M. J.; RADICE, G. L.; MORRISON, S. J. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. **Cell stem cell**, v. 1, n. 2, p. 204–217, 2007.

KJELDSEN, L.; SENGELØV, H.; LOLLIKE, K.; NIELSEN, M. H.; BORREGAARD, N. Isolation and characterization of gelatinase granules from human neutrophils. **Blood**, v. 83, n. 6, p. 1640–1649, 1994.

KOCABAS, F.; XIE, L.; XIE, J.; et al. Hypoxic metabolism in human hematopoietic stem cells. **Cell & Bioscience**, v. 5, p. 39, 2015.

KOHLI, S. S.; KOHLI, V. S. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. **Indian journal of endocrinology and metabolism**, v. 15, n. 3, p. 175–181, 2011.

KOLLET, O.; DAR, A.; SHIVTIEL, S.; et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. **Nature Medicine**, v. 12, n. 6, p. 657–664, 2006.

KOMORI, T. Regulation of skeletal development by the Runx family of transcription factors. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 95, n. 3, p. 445–453, 2005.

KONDO, M.; WEISSMAN, I. L.; AKASHI, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 661–672, 1997.

LAM, A. R.; BHATTACHARYA, S.; PATEL, K.; et al. Importance of receptor flexibility in binding of cyclam compounds to the chemokine receptor CXCR4. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 1, p. 139–147, 2011.

LAM, B. S.; ADAMS, G. B. Hematopoietic stem cell lodgment in the adult bone marrow stem cell niche. **International journal of laboratory hematology**, v. 32, n. 6 Pt 2, p. 551–558, 2010.

LANE, T. F.; SAGE, E. H. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 8, n. 2, p. 163–173, 1994.

LARSSON, J.; KARLSSON, S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. **Oncogene**, v. 24, n. 37, p. 5676–5692, 2005. Acesso em: 9/1/2014.

LEGRAND, E.; CHAPPARD, D.; PASCARETTI, C.; et al. Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis. **Journal of bone and mineral research**, v. 15, n. 1, p. 13–19, 2000.

LÉVESQUE, J. P.; HENDY, J.; TAKAMATSU, Y.; et al. Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 5, p. 440–449, 2002.

LIMA, A. L. L. DE; SILVA, A. C. F. DA; KONNO, S. C.; et al. Causes of the accelerated decline in child undernutrition in Northeastern Brazil (1986-1996-2006). **Revista De Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 17–27, 2010.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LOVE, N. K.; KESHAVAN, N.; LEWIS, R.; HARRIS, W. A.; AGATHOCLEOUS, M. A nutrient-sensitive restriction point is active during retinal progenitor cell differentiation. **Development (Cambridge, England)**, v. 141, n. 3, p. 697–706, 2014.

LUI, W. C.; CHAN, Y. F.; CHAN, L. C.; NG, R. K. Cytokine combinations on the potential for ex vivo expansion of murine hematopoietic stem cells. **Cytokine**, v. 68, n. 2, p. 127–132, 2014.

LYNCH, K. W. Consequences of regulated pre-mRNA splicing in the immune system. **Nature Reviews. Immunology**, v. 4, n. 12, p. 931–940, 2004.

MALARA, A.; CURRAO, M.; GRUPPI, C.; et al. Megakaryocytes contribute to the bone marrow-matrix environment by expressing fibronectin, type IV collagen, and laminin. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 32, n. 4, p. 926–937, 2014.

MANTEL, C.; MESSINA-GRAHAM, S.; BROXMEYER, H. E. Upregulation of nascent mitochondrial biogenesis in mouse hematopoietic stem cells parallels upregulation of CD34 and loss of pluripotency: a potential strategy for reducing oxidative risk in stem cells. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 9, n. 10, p. 2008–2017, 2010.

MARTIN, T. J. Historically significant events in the discovery of RANK/RANKL/OPG. **World Journal of Orthopedics**, v. 4, n. 4, p. 186, 2013.

MARTIN, R. B.; ISHIDA, J. The relative effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bone strength. **Journal of biomechanics**, v. 22, n. 5, p. 419–426, 1989.

MAYACK, S. R.; WAGERS, A. J. Osteolineage niche cells initiate hematopoietic stem cell mobilization. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 519–531, 2008.
MAYACK, S. R.; WAGERS, A. J. Osteolineage niche cells initiate hematopoietic stem cell mobilization. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 519–531, 2008.

MAYANI, H.; GUILBERT, L. J.; JANOWSKA-WIECZOREK, A. Biology of the hemopoietic microenvironment. **European journal of haematology**, v. 49, n. 5, p. 225–233, 1992.

MEGAPTCHE, A. P.; ERB, U.; BÜCHLER, M. W.; ZÖLLER, M. CD44v10, osteopontin and lymphoma growth retardation by a CD44v10-specific antibody. **Immunology and Cell Biology**, v. 92, n. 8, p. 709–720, 2014.

MELLIS, D. J.; ITZSTEIN, C.; HELFRICH, M. H.; CROCKETT, J. C. The skeleton: a multi-functional complex organ: the role of key signalling pathways in osteoclast differentiation and in bone resorption. **The Journal of Endocrinology**, v. 211, n. 2, p. 131–143, 2011.

MIYAKE, K.; MEDINA, K. L.; HAYASHI, S.; et al. Monoclonal antibodies to Pgp-1/CD44 block lympho-hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 2, p. 477–488, 1990.

MIYAMOTO, T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. **The Keio journal of medicine**, v. 60, n. 4, p. 101–105, 2011.

MONTEIRO, C. A. The decline in child malnutrition in Brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 25, n. 5, p. 950–951, 2009.

MORTENSEN, M.; FERGUSON, D. J. P.; EDELMANN, M.; et al. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 2, p. 832–837, 2010.

MÜLLER-SIEBURG, C. E.; CHO, R. H.; THOMAN, M.; ADKINS, B.; SIEBURG, H. B. Deterministic regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. **Blood**, v. 100, n. 4, p. 1302–1309, 2002.

MURIEL, M. P.; BONAVENTURE, J.; STANESCU, R.; et al. Morphological and biochemical studies of a mouse mutant (fro/fro) with bone fragility. **Bone**, v. 12, n. 4, p. 241–248, 1991.

NAKA, K.; HIRAO, A. Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. **International Journal of Hematology**, v. 93, n. 4, p. 434–439, 2011.

NAKAJIMA, K.; CRISMA, A. R.; SILVA, G. B.; et al. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. **Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 82–89, 2014.

NILSSON, S. K. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2293–2299, 2001. Acesso em: 9/1/2014.

NILSSON, S. K.; JOHNSTON, H. M.; COVERDALE, J. A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2293–2299, 2001.

NORDDAHL, G. L.; PRONK, C. J.; WAHLESTEDT, M.; et al. Accumulating mitochondrial DNA mutations drive premature hematopoietic aging phenotypes distinct from physiological stem cell aging. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 5, p. 499–510, 2011.

OHLSTEIN, B.; KAI, T.; DECOTTO, E.; SPRADLING, A. The stem cell niche: theme and variations. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 6, p. 693–699, 2004.

ORGERON, M. L.; STONE, K. P.; WANDERS, D.; et al. The impact of dietary methionine restriction on biomarkers of metabolic health. **Progress in Molecular Biology and Translational Science**, v. 121, p. 351–376, 2014.

OSAWA, M.; HANADA, K.; HAMADA, H.; NAKAUCHI, H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. **Science (New York, N.Y.)**, v. 273, n. 5272, p. 242–245, 1996.

OXLUND, H.; BARCKMAN, M.; ORTOFT, G.; ANDREASSEN, T. T. Reduced concentrations of collagen cross-links are associated with reduced strength of bone. **Bone**, v. 17, n. 4 Suppl, p. 365S–371S, 1995.

PASSEGUÉ, E.; WAGERS, A. J.; GIURIATO, S.; ANDERSON, W. C.; WEISSMAN, I. L. Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 11, p. 1599–1611, 2005.

PEARCE, D. J.; RIDLER, C. M.; SIMPSON, C.; BONNET, D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. **Blood**, v. 103, n. 7, p. 2541–2546, 2004.

POUNDARIK, A. A.; DIAB, T.; SROGA, G. E.; et al. Dilatational band formation in bone. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 47, p. 19178–19183, 2012.

QUESENBERRY, P. J.; COLVIN, G. A.; LAMBERT, J.-F. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory. **Blood**, v. 100, n. 13, p. 4266–4271, 2002.

RAAIJMAKERS, M. H. G. P. Myelodysplastic syndromes: revisiting the role of the bone marrow microenvironment in disease pathogenesis. **International Journal of Hematology**, v. 95, n. 1, p. 17–25, 2012.

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-76A rodent diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

REYA, T.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F.; WEISSMAN, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105–111, 2001.

RODRÍGUEZ, L.; CERVANTES, E.; ORTIZ, R. Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: a public health problem. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 4, p. 1174–1205, 2011.

RODRÍGUEZ, L.; GONZÁLEZ, C.; FLORES, L.; et al. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 12, n. 4, p. 502–507, 2005.

ROEGIERS, F.; JAN, Y. N. Asymmetric cell division. **Current opinion in cell biology**, v. 16, n. 2, p. 195–205, 2004.

ROSEN; POLLAK. Circulating IGF-I: New Perspectives for a New Century. **Trends in endocrinology and metabolism: TEM**, v. 10, n. 4, p. 136–141, 1999.

SAKA, B.; KAYA, O.; OZTURK, G. B.; ERTEN, N.; KARAN, M. A. Malnutrition in the elderly and its relationship with other geriatric syndromes. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 745–748, 2010.

SAKA, B.; KAYA, O.; OZTURK, G. B.; ERTEN, N.; KARAN, M. A. Malnutrition in the elderly and its relationship with other geriatric syndromes. **Clinical Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 745–748, 2010.

SAMPLE, S. J.; RACETTE, M. A.; HAO, Z.; et al. Functional adaptation in female rats: the role of estrogen signaling. **PloS one**, v. 7, n. 9, p. e43215, 2012.

SAWAYA, A. L.; MARTINS, P. A.; BACCIN MARTINS, V. J.; et al. Malnutrition, long-term health and the effect of nutritional recovery. **Nestlé Nutrition Workshop Series. Paediatric Programme**, v. 63, p. 95–105; 105–108, 259–268, 2009.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood cells**, v. 4, n. 1-2, p. 7–25, 1978.

SEITA, J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 6, p. 640–653, 2010.

SHEN, J.; REN, H.; TOMIYAMA-MIYAJI, C.; et al. Resistance and augmentation of innate immunity in mice exposed to starvation. **Cellular Immunology**, v. 259, n. 1, p. 66–73, 2009.

SHENKIN, A. Serum prealbumin: Is it a marker of nutritional status or of risk of malnutrition? **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 12, p. 2177–2179, 2006.

SHI, X.; LIU, X. S.; WANG, X.; GUO, X. E.; NIEBUR, G. L. Effects of trabecular type and orientation on microdamage susceptibility in trabecular bone. **Bone**, v. 46, n. 5, p. 1260–1266, 2010.

SILVA, B. C.; BILEZIKIAN, J. P. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 22, p. 41–50, 2015.

SINGH, R.; CUERVO, A. M. Autophagy in the cellular energetic balance. **Cell Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 495–504, 2011.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. Osteopontin. **Critical reviews in oral biology and medicine**, v. 11, n. 3, p. 279–303, 2000.

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 241, n. 4861, p. 58–62, 1988.

STIER, S.; KO, Y.; FORKERT, R.; et al. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. **The Journal of experimental medicine**, v. 201, n. 11, p. 1781–1791, 2005.

SUDA, T.; TAKUBO, K.; SEMENZA, G. L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 4, p. 298–310, 2011.

SUGIYAMA, T.; KOHARA, H.; NODA, M.; NAGASAWA, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. **Immunity**, v. 25, n. 6, p. 977–988, 2006.

SUZUKI, T.; MIYAMOTO, T.; FUJITA, N.; et al. Osteoblast-specific Angiopoietin 1 overexpression increases bone mass. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 362, n. 4, p. 1019–1025, 2007.

TALMAGE, R. V.; MOBLEY, H. T. Calcium homeostasis: reassessment of the actions of parathyroid hormone. **General and Comparative Endocrinology**, v. 156, n. 1, p. 1–8, 2008.

THORNE, R. F.; LEGG, J. W.; ISACKE, C. M. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. Pt 3, p. 373–380, 2004.

THURNER, P. J.; CHEN, C. G.; IONOVA-MARTIN, S.; et al. Osteopontin deficiency increases bone fragility but preserves bone mass. **Bone**, v. 46, n. 6, p. 1564–1573, 2010.

TODARO, M.; GAGGIANESI, M.; CATALANO, V.; et al. CD44v6 is a marker of constitutive and reprogrammed cancer stem cells driving colon cancer metastasis. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 3, p. 342–356, 2014.

TRUMPP, A.; ESSERS, M.; WILSON, A. Awakening dormant haematopoietic stem cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 3, p. 201–209, 2010.

UNNANUNTANA, A.; REBOLLEDO, B. J.; KHAIR, M. M.; DICARLO, E. F.; LANE, J. M. Diseases affecting bone quality: beyond osteoporosis. **Clinical orthopaedics and related research**, v. 469, n. 8, p. 2194–2206, 2011.

VAN DER WATH, R. C.; WILSON, A.; LAURENTI, E.; TRUMPP, A.; LIÒ, P. Estimating dormant and active hematopoietic stem cell kinetics through extensive

modeling of bromodeoxyuridine label-retaining cell dynamics. **PloS One**, v. 4, n. 9, p. e6972, 2009.

VAN OS, R.; KAMMINGA, L. M.; AUSEMA, A.; et al. A Limited role for p21Cip1/Waf1 in maintaining normal hematopoietic stem cell functioning. **Stem cells**, v. 25, n. 4, p. 836–843, 2007.

VINOLO, M. A. R.; CRISMA, A. R.; NAKAJIMA, K.; et al. Malnourished mice display an impaired hematologic response to granulocyte colony-stimulating factor administration. **Nutrition Research (New York, N.Y.)**, v. 28, n. 11, p. 791–797, 2008.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. **Brazilian journal of medical and biological** , v. 33, n. 8, p. 889–895, 2000.

WEBER, J. M.; CALVI, L. M. Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. **Bone**, v. 46, n. 2, p. 281–285, 2010.

WEISSMAN, I. L.; SHIZURU, J. A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3543–3553, 2008.

WILLIAMS, C.D. A nutritional disease of childhood associated with a maize diet. **Archives of Disease in Childhood**, v. 8, p. 423-433, 1933.

WILSON, A.; LAURENTI, E.; TRUMPP, A. Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. **Current opinion in genetics & development**, v. 19, n. 5, p. 461–468, 2009.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 2, p. 93–106, 2006.

WOOD, A. J. J.; RIGGS, B. L.; MELTON, L. J. The Prevention and Treatment of Osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 327, n. 9, p. 620–627, 1992.

World Health Organization. Disponível em: < http://apps.who.int/bmi/index.jsp>. Acesso em 01 out 2015.

World Health Organization. Disponível em: <http://www.un.org/millenniumgoals/2015_MDG_Report/pdf/MDG%202015%20rev%20(July%201).pdf> Acesso em: 10 dez. 2015.

WU, M.; KWON, H. Y.; RATTIS, F.; et al. Imaging hematopoietic precursor division in real time. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 5, p. 541–554, 2007.

XAVIER, J. G.; FAVERO, M. E.; VINOLO, M. A. R.; et al. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. **Histology and histopathology**, v. 22, n. 6, p. 651–660, 2007.

XIE, M.; TATAW, M.; VENUGOPALA REDDY, G. Towards a functional understanding of cell growth dynamics in shoot meristem stem-cell niche. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 20, n. 9, p. 1126–1133, 2009.

YORIMITSU, T.; KLIONSKY, D. J. Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 6, p. 279–285, 2007.

YOUNG, M. F.; KERR, J. M.; IBARAKI, K.; HEEGAARD, A. M.; ROBEY, P. G. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 281, p. 275–294, 1992.

ZHANG, J.; NIU, C.; YE, L.; et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 836–841, 2003.

ZHANG, Q.; GUO, R.; SCHWARZ, E. M.; BOYCE, B. F.; XING, L. TNF inhibits production of stromal cell-derived factor 1 by bone stromal cells and increases osteoclast precursor mobilization from bone marrow to peripheral blood. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, n. 2, p. R37, 2008.

ZHAO, Y.; LIN, Y.; ZHAN, Y.; et al. Murine hematopoietic stem cell characterization and its regulation in BM transplantation. **Blood**, v. 96, n. 9, p. 3016–3022, 2000.

ZHENG, Y.-H.; TIAN, C.; MENG, Y.; et al. Osteopontin stimulates autophagy via integrin/CD44 and p38 MAPK signaling pathways in vascular smooth muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 1, p. 127–135, 2012.

ZHONG, J. F.; ZHAO, Y.; SUTTON, S.; et al. Gene expression profile of murine long-term reconstituting vs. short-term reconstituting hematopoietic stem cells.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 102, n. 7, p. 2448–2453, 2005.

ZHOU, B. P.; LIAO, Y.; XIA, W.; et al. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 3, p. 245–252, 2001.

8 ANEXOS

8.1 Informações para os membros da banca julgadora

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a argüição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a argüição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a argüição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na argüição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091 3621 - Fax (11) 3091 3141 – e-mail: pgfarma@usp.br

8.2 Protocolo do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF/05/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto "**Avaliação do nicho endosteal na hematopoese de camundongos submetidos à desnutrição proteica.**" (Protocolo CEUA/FCF/346), de responsabilidade da **Profa. Dra. Primavera Borelli**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 06 de fevereiro de 2012.

São Paulo, 07 de fevereiro de 2012.

Prof. Dr. Marco Antonio Stephano
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3622 / Fax: (11) 3091-3677 - e-mail: ceuafcf@usp.br

8.3 Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9136 - 1477578/2 - Maristela Tsujita

Email:	mtsujita@usp.br
Data de Nascimento:	06/05/1976
Cédula de Identidade:	RG - 22.434.063-3 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico-Bioquímico - Modalidade: Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 1999
Mestrado:	Mestre em Farmácia - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2004

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	03/02/2012
Início da Contagem de Prazo:	03/02/2012
Data Limite para o Depósito:	03/02/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia - 03/02/2012 até o presente. Email: borelli@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 03/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 28/03/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 03/02/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 11/01/2016 14:41:20

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 1477578/2 - Maristela Tsujita

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMH5767-2/1	Conceitos, Métodos e Diagnósticos em Biologia Tecidual (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	09/03/2012	29/06/2012	90	6	96	A	N	Concluída
EDM5791-5/8	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	14/03/2012	29/06/2012	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	2	100	A	N	Concluída
BIO5796-1/1	Avanços em Biologia Óssea e Regeneração (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	17/09/2012	30/09/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5705-4/2	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/12/2012	09/12/2012	30	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5705-4/4	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/02/2014	09/02/2014	30	2	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	22
Estágios:			
Total:	0	20	22

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015

Impresso em: 11/01/2016 14:41:20

8.4 Currículo Lattes

Maristela Tsujita

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/1539315703574845

Última atualização do currículo em 07/12/2015

Resumo informado pelo autor

Possui graduação em FARMÁCIA E BIOQUÍMICA pela USP (1999) e mestrado em Farmácia (Análises Clínicas) pela USP (2004). Professora da Universidade Paulista e doutoranda em Hematologia na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Tem experiência na área de Hematologia Clínica, com ênfase em Criopreservação, diagnóstico de leucemias por imunofenotipagem e estudo no nicho hematopoetico.

(Texto informado pelo autor)

Formação acadêmica/titulação

2012 Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Participação do nicho endosteal na hemopoese de camundongos submetidos à desnutrição proteica
Orientador: Primavera Borelli

2001 - 2004 Mestrado em Farmácia (Análises Clínicas).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Estudo da S-nitrosilação de RAS e participação das MAP quinases (ERK, JNK E p38) na apoptose de células THP-1 induzidas por óxido nítrico., Ano de obtenção: 2004
Orientador: HUGO PEQUENO MONTEIRO

1995 - 1999 Graduação em FARMÁCIA E BIOQUÍMICA.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Paulista - UNIP

Vínculo institucional

2002 - Atual Vínculo: Professora , Enquadramento funcional: Professora, Regime: Parcial

2. Instituto de Hemoterapia Sírio Libanês - IHSL

Vínculo institucional

2007 - 2010 Vínculo: Farmacêutica , Enquadramento funcional: Supervisora da Criobiologia , Carga horária: 44, Regime: Integral

3. Universidade Anhembi Morumbi - UAM

Vínculo institucional

2011 - 2011 Vínculo: Professora , Enquadramento funcional: Professora , Carga horária: 20, Regime: Parcial

4. Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo - FPS/HSP

Vínculo institucional

1999 - 2003 Vínculo: Farmacêutica , Enquadramento funcional: Farmacêutica , Carga horária: 40, Regime: Integral

Idiomas

Inglês Compreende Bem , Fala Razoavelmente , Escreve Bem , Lê Bem

Francês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Capítulos de livros publicados

1. TSUJITA, M., Blatt S, FOCK, R. A.
Patologia dos leucócitos: neoplasias hematológicas In: Hematologia: Métodos e interpretação.1 ed.São Paulo : Roca, 2012, p. 323-362.

Prêmios e títulos

2014 Melhor apresentação oral na categoria doutorado., XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia

2014 Melhor pôster na categoria doutorado., XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia

2014 Menção honrosa pela apresentação de pôster, XXIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP

2013 Melhor pôster, Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. doi ZANATTA, DANIELA B, **TSUJITA, MARISTELA**, BORELLI, PRIMAVERA, AGUIAR, RODRIGO B, FERRARI, DANIEL G, STRAUSS, BRYAN E
Genetic barcode sequencing for screening altered population dynamics of hematopoietic stem cells transduced with lentivirus. Molecular Therapy ¿ Methods & Clinical Development. , v.1, p.14052 - , 2014.
Referências adicionais : Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1038/mtm.2014.52]

2. doi FONTAO-WENDEL, R., HOFF, P. M., LAZAR, A., FREITAS, D., NOVIS, Y., PATAH, P., TSUJITA, M., BALTHAZAR, A., PIERROTI, M., WENDEL, S.
Immune-mediated pancytopenia induced by oxaliplatin: a case report.. Transfusion (Arlington, Va.). JCR, v.50, p.1453 - 1459, 2010.
Palavras-chave: Pancytopenia
Áreas do conhecimento : Hematologia
Setores de atividade : Atividades de atenção à saúde humana
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Impresso. Home page: [doi:10.1111/j1537-2995.2010.02600.x]

3. doi BORELLI, P., BARROS, F.E.V., NAKAJIMA, K., BLATT, S.L., BEUTLER, B., PEREIRA, J., **TSUJITA, M.**, FAVERO, G.M., FOCK, R.A.
Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. , v.42, p.523 - 530, 2009.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1590/s0100-879x2009000600008]

4. doi OLIVEIRA, CARLOS JORGE R., CURCIO, MARLI F., MORAES, MIRIAM S., **TSUJITA, MARISTELA**, TRAVASSOS, LUIZ R., STERN, ARNOLD, MONTEIRO, HUGO P.
The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells. Nitric Oxide (Print). JCR, v.18, p.241 - 255, 2008.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.niox.2008.02.001]

5. doi **TSUJITA, MARISTELA**, BATISTA, WAGNER L., OGATA, FERNANDO T., STERN, ARNOLD, MONTEIRO, HUGO P., ARAI, ROBERTO J.
The nitric oxide-sensitive p21Ras-ERK pathway mediates S-nitrosoglutathione-induced apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications (Print). JCR, v.369, p.1001 - 1006, 2008.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.117]

6. doi BORELLI, PRIMAVERA, BLATT, SOLANGE, PEREIRA, JULIANA, BEUTLER DE MAURINO, BEATRIZ, **TSUJITA, MARISTELA**, CRISTINA DE SOUZA, ANA, GUILHERME XAVIER, JOSÉ, AMBRÓSIO FOCK, RICARDO
Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. British Journal of Nutrition. JCR, v.97, p.307 - , 2007.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [doi:10.1017/s0007114507172731]

7. RIBEIRO-DIAS, F., BARBUTO, J. A. M., TSUJITA, M., JANCAR, S.
Discrimination between NK and LAK cytotoxic activities of murine spleen cells by MTT assay: differentian inhibition by PGE2 and EDTA.. Journal of Immunological Methods (Print). JCR, v.241, p.121 - 129, 2000.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Impresso

Apresentação de trabalho e palestra

1. OLIVEIRA, J. L., **TSUJITA, M.**, ALLEGRINI JUNIOR, S., ARANA-CHAVES, V. E., Borelli P
Efeitos da desnutrição proteica no metabolismo ósseo, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

2. **TSUJITA, M.**, BURI, M. V., OLIVEIRA, J. L., SILVA, G. B., PAREDES-GAMERO, E. J., FOCK, R.A., Borelli P
Protein malnutrition: effects on hematopoietic stem cell frequency, cell cycle and chemokine receptors expression in the endosteal niche regulation, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

3. **TSUJITA, M.**, BURI, M. V., OLIVEIRA, J. L., SILVA, G. B., PAREDES-GAMERO, E. J., FOCK, R. A., Borelli P
Protein malnutrition: effects on hematopoietic stem cell frequency, cell cycle and chemokine receptors expression in the endosteal niche regulation, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

4. SILVA, G. B., HASTREITER, A., MASSARO, R. R., **TSUJITA, M.**, MARIA-ENGLER, S. S., BORELLI, P.
Protein malnutrition modifies fibronectin remodeling capability in long-term bone marrow culture, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

5. SILVA, G. B., HASTREITER, A., MASSARO, R. R., **TSUJITA, M.**, MARIA-ENGLER, S. S., Borelli P
Protein malnutrition modifies fibronectin remodeling capability in long-term bone marrow culture, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)

6. SILVA, G. B., HASTREITER, A., MASSARO, R. R., **TSUJITA, M.**, MARIA-ENGLER, S. S., Borelli P
Protein malnutrition modifies fibronectin remodeling capability in long-term bone marrow culture, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

7. SILVA, G. B., HASTREITER, A., MASSARO, R. R., BELTRAN, J. S. S. O., **TSUJITA, M.**, MARIA-ENGLER, S. S., BORELLI, P.
Regulatory mechanisms of fibronectin turnover in long term bone marrow culture: impacts of low protein diet, 2015. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

8. **TSUJITA, M.**, TEIXEIRA, M., RODRIGUES, M., HASTREITER, A., SILVA, G. B., FOCK, R.A., BORELLI, P.
Femoral microarchitecture and endosteal niche alterations in protein malnutrition/; possible effects on hematopoiesis?, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

9. **TSUJITA, M.**, TEIXEIRA, M., RODRIGUES, M., HASTREITER, A., SILVA, G. B., GOUVEIA, C., AMBRÓSIO FOCK, RICARDO, Borelli P
Femoral microarchitecture and endosteal niche alterations in protein malnutrition: possible effects on hematopoiesis?, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

10. SILVA, G. B., **TSUJITA, M.**, HASTREITER, A., Borelli P
Remodelamento da matriz extracelular da medula óssea em modelo murino de desnutrição proteica, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

11. SILVA, G. B., **TSUJITA, M.**, SANTOS, E. W. C. O., BELTRAN, J. S. S. O., Borelli P
Role of Akt/mTOR pathway in fibronectin expression mediated by protein malnutrition, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

12. SILVA, G. B., **TSUJITA, M.**, SANTOS, E. W. C. O., BELTRAN, J. S. S. O., Borelli P
Role of Akt/mTOR pathway in fibronectin expression mediated by protein malnutrition, 2014. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

13. SANTOS, E. W. C. O., OLIVEIRA, D. C., BELTRAN, J. S. S. O., SILVA, G. B., **TSUJITA, M.**, CARMO, L. S., CRISMA, A. R., FOCK, R.A., Borelli P
Valores de referência de parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss Webster, C57BL/6, BALB/c e ratos Wistar, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

14. TSUJITA, M., SILVA, G. B., BELTRAO, J. S. O., SALGADO, P. B., ALLEGRINI JUNIOR, S., ARANA-CHAVES, V. E., FOCK, R. A., BORELLI, P.
Efeitos da desnutrição proteica na densidade óssea e aspectos ósseos microanatômicos., 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

15. SANTOS, E. W. C. O., OLIVEIRA, D. C., BELTRAN, J. S. S. O., SILVA, G. B., TSUJITA, M., HASTREITER, A., R.A., F., Borelli P
Efeitos de dietas hipoproteica ou hiperlipídica nos parâmetros hematológicos e imunológicos em modelo murino, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

16. ZANATTA, D. B., AGUIAR, R. B., **TSUJITA, M.**, BORELLI, P., STRAUSS, B. E.
Genetic Barcode Sequencing as a simple tool for screening altered population dynamics os hematopoietic stem cells transduced with lentivirus, 2013. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

17. **TSUJITA, M.**
Avaliação do nicho hematopoético/endosteal em camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)

18. MONTEIRO, H. P., **TSUJITA, M.**
The role of p21Ras and the mitogen-activated protein kinases in nitric oxide-induced human monocytes apoptosis, 2005. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

19. BLATT, S. L., FOCK, R. A., FAVERO, M. E., SOUZA, A. C., **TSUJITA, M.**, VINOLO, M., SILVA, M. C. F., BORELLI, P.
Avaliação do perfil imunofenotípico e da apoptose da medula óssea em desnutrição proteica, 2003. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

20. BLATT, S. L., **TSUJITA, M.**, SOUZA, A. C., FOCK, R. A., BORELLI, P.
Desnutrição altera a resposta de progenitores hemopoéticos frente a fatores de crescimento, 2003. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

21. **TSUJITA, M.**, Arai R.J., SILVA, E. F., MONTEIRO, H. P.
Role of the Ras signaling pathway in the nitric oxide-promoted apoptosis of THP-1 cells, 2003. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

22. IOGUY, S. S., **TSUJITA, M.**, BELISARIO, V. F., MARTINEZ, G. A., VELOSO, E. D., PEREIRA, J., MELO, N. B., TUTIYA, I., BEITLER, B., CHAMONE, D. A.
Leucemia Mielóide Aguda M6 e M7: perfil imunofenotípico, 2001. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

23. **TSUJITA, M.**, IOGUY, S. S., BEITLER, B., MARTINEZ, G. A., VELOSO, E. D., PEREIRA, J., MELO, N. B., TUTIYA, I., CHAMONE, D. A.
Reconhecimento de LLA-B CD45 negativo por citometria de fluxo, 2001. (Congresso,Apresentação de Trabalho)