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

Avaliação da participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição protéica.

Jackeline Soares de Oliveira Beltran

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Primavera Borelli

São Paulo

2012

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

Beltran, Jackeline Soares de Oliveira
B453a Avaliação da participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular camundongos submetidos à desnutrição protéica / Jackeline Soares de Oliveira Beltran. -- São Paulo, 2013.
142p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Borelli, Primavera

1. Hematologia 2. Apoptose : Patologia 3. Desnutrição protéica : Medicina I. T. II. Borelli, Primavera, orientador.

616.15 CDD

Jackeline Soares de Oliveira Beltran

Avaliação da participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição protéica.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof^a. Dr^a. Primavera Borelli
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____.

À minha filha
Íris Oliveira Beltran

AGRADECIMENTOS

À minha família: mãe, pai e meu irmão pelas palavras de otimismo, confiança e compreensão, com certeza esse trabalho dedico a eles com muito amor e carinho.

Ao meu esposo Thiago Beltran pelo amor, compreensão e muita paciência, mas muita paciência mesmo, por saber lidar com os momentos de estresse e muitas vezes com a com a minha ausência.

À minha filha Íris Beltran que amo tanto, foi muito difícil para eu deixá-la muitas vezes de lado, mas espero recompensar o tempo perdido.

Aos meus padrinhos: João de Deus Mourão e Germano Olímpio Mourão pelo amor e carinho.

Aos meus sogros: Nilton Roberto Beltran (in memoriam) e Elenira Beltran pelo apoio constante em minha vida.

A Prof. ^a Dr.^a Primavera pela paciência e confiança dada a mim para este trabalho ser realizado.

À Graziela Batista da Silva, pela ajuda em todos os momentos deste trabalho e principalmente, pela sua amizade e companheirismo.

Aos companheiros de pós-graduação: Alexandra Mello, Dalila Cunha, Ed Wilson dos Santos, Maristela Tsujita, Luciana Simão, Fabiana Lima, Araceli Hastreiter, Mayara Caldas, Marcela Cavalcante, Cristiane Saito, Renila, Nathália Sierra, Kelma Cordeiro e Luciana Lima pela amizade e apoio nos momentos felizes e difíceis.

As alunas de iniciação científica: Ana Ligia, Stela Penalva, Carolina Argondizo e Mayara Cortez pela amizade e trabalho em equipe.

A Amanda Crisma, Karina Nakajima, pela amizade, conhecimento e auxílio nos experimentos.

Aos técnicos de laboratório: Mariana Ferreira pela amizade e ajuda nas contas malucas de química e Edson Makiyama pelo auxílio nos experimentos e também pela sua amizade.

À minhas amigas da graduação: Joana de Souza, Kátia Oliveira, Estela Caires, Herica Belotto pela amizade e muitos momentos de risada e também aos professores: Prof.Dr. Miguel José Minhoto, Profa. Dra. Mariana Cristoffi e Prof.Dr.José Batista.

Aos meus amigos do Ensino Médio da escola E.E. Amaral Wagner e professores, mesmo estudando em escola pública, e tendo uma educação de nível precário, basta ter força de vontade e persistência para alcançar seus objetivos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fock por ter participado da minha formação profissional e pelos momentos de amizade.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Arana- Chavez pelos conhecimentos e apoio nos experimentos de Microscopia Eletrônica.

Aos professores: Profa. Dra. Sylva Stuchi (FCF-USP), Prof. Dr. Júlio Tirapegui (FCF-USP) e Profa. Dra. Patricia Gama (ICB-USP) por nos disponibilizarem seus laboratórios para alguns experimentos, e aos seus alunos pela disposição em nos ajudar.

Aos colaboradores: Vivian Bradaschia, Lorraine Braga, Thaís Oliveira, Renato Massaro, Luciana Osaki, Renata Albuquerque e Gaspar Ferreira pela amizade, apoio e contribuição nos meus experimentos.

Às secretárias do departamento: Ana, Edna e Suely. À Cláudia, Rose, os técnicos: Camila Marinho, Patrícia Mendonça e Mauricio pela amizade e muitos momentos de risada.

E a todos os colaboradores e estagiários do laboratório de hematologia pela amizade e contribuição.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado, e ao apoio financeiro concedido pela CNPq para a realização desta pesquisa.

“Os ventos que às vezes tiram algo que amamos, são os mesmos que trazem algo que aprendemos a amar... Por isso não devemos chorar pelo que nos foi tirado e sim, aprender a amar o que nos foi dado. Pois tudo aquilo que é realmente nosso, nunca se vai para sempre...”.

Bob Marley

RESUMO

Beltran, J.S.O. **Avaliação da participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição protéica.** 2012. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

A desnutrição pode induzir lesão celular, comprometendo os mecanismos envolvidos de proliferação, diferenciação e morte celular. Estudos de nosso laboratório tem demonstrado, em modelo murino de desnutrição protéica e protéico-energética, hipoplasia medular com evidências histológicas de alteração da matriz extra celular. Nosso objetivo foi avaliar a eventual participação dos processos de apoptose, necrose e autofagia no desenvolvimento da hipoplasia medular observada nesse modelo. Para isso foram utilizados dois grupos de camundongos C57BL/6J machos, adultos, mantidos em gaioleiros metabólicos. O grupo controle (C) recebeu ração normoproteica contendo 12% de proteína e o grupo desnutrido (D), alimentado com ração hipoproteica contendo 2% de proteína. A fonte protéica utilizada foi a caseína. O período de indução da desnutrição foi cerca de cinco semanas, definido pela perda de 20 a 25 % de peso corpóreo por parte dos animais do grupo desnutrido. Após esse período, os animais de ambos os grupos foram anestesiados e realizada a coleta das amostras biológicas para avaliação nutricional e hematológica e coletadas células da medula óssea para avaliação da apoptose, necrose e autofagia. Para avaliação da apoptose e necrose as células foram duplamente marcadas com Annexina V, PI e caspase 3 que foram analisadas por citometria de fluxo. A expressão da proteína BCL-2 foi quantificada pela técnica de Western Blotting. A análise não demonstrou diferença estatística entre os grupos para esses parâmetros. Para avaliação da autofagia extraiu-se proteínas das células da medula óssea e avaliou-se a expressão das proteínas Akt e mTOR total e fosforilado, os complexos de mTor (Raptor, Rictor e Gβ1), Beclin-1 e LC3II. Os resultados demonstraram aumento significativo de mTOR total, Raptor, Beclin-1 e LC3II e diminuição na fosforilação de mTOR nas células oriundas de animais desnutridos em relação ao grupo controle. A desnutrição não modificou a expressão de Akt total, porém houve diminuição da fosforilação de Akt e diminuição na expressão das proteínas Rictor e Gβ1 nas células analisadas.

Como os processos apoptóticos e autofágicos podem ser de difícil detecção *in vivo*, também refizemos os experimentos *in vitro*, estimulando as células com compostos pró-apoptóticos (campotecina) e pró-autofágicos (tamoxifeno). Nesses experimentos observamos

que, apenas quando estimulamos as células de animais desnutridos com camptotecina, as mesmas, no período de 12 horas apresentaram maior percentagem de apoptose inicial em relação a 0 horas, sugerindo que há um período em que as células desnutridas são sinalizadas para via apoptótica sendo mais susceptível ao estímulo. As células de animal desnutrido estimulado apresentaram após 12 horas aumento significativo da apoptose tardia em relação ao controle estimulado, indicando que nesse período há um aumento da apoptose tanto em processo inicial, tanto em processo tardio.

Avaliamos a autofagia em uma cinética de 0, 2, 6, 18 e 24 horas *in vitro* e observamos aumento significativo da autofagia em células da medula óssea de animais desnutridos em 0 horas e após 18 horas de estímulo com tamoxifeno (20 μ M) em relação ao respectivo controle, demonstrando que nesse período a autofagia começa a ser induzida através do estímulo mais facilmente do que o controle.

Autofagia é um dos principais contribuintes para o metabolismo celular, fornecendo nutrientes quando os mesmos estão indisponíveis, e, portanto, no nosso modelo de desnutrição protéica a hipoplasia medular estaria em processo autofágico como mecanismo de reparo e sobrevivência.

Palavras-chave: Apoptose, necrose, autofagia, desnutrição protéica, hemopoese.

ABSTRACT

Beltran, J.S.O. **Evaluation of the involvement of apoptotic processes, necrotic and autophagic marrow hypoplasia in mice submitted to protein malnutrition.** 2012. Thesis (Masters) – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2012.

Malnutrition can induce cell damage, compromising the mechanisms involved in proliferation, differentiation and cell death. Studies from our laboratory have demonstrated, in a murine model of protein malnutrition and protein-energy, marrow hypoplasia with histologic evidence of alteration of the extracellular matrix. Our objective was to evaluate the possible involvement of the processes of apoptosis, necrosis and autophagy in the development of bone marrow hypoplasia observed in this model. For this we used two groups of C57BL/6J adult male kept in metabolic gaioleiro.

The control group (C) received normal protein diet containing 12% protein and undernourished group (D), fed low protein diet containing 2% protein. The protein source used was casein. The induction period of undernutrition was approximately five weeks, as defined by loss of 20 to 25% of body weight per part of group malnourished. After this period, the animals of both groups were anesthetized and held the collection of biological samples for nutritional assessment and hematology and bone marrow cells collected for evaluation of apoptosis, necrosis and autophagy. For assessment of apoptosis and necrosis of the cells were double labeled with Annexina V and PI caspase 3 were analyzed by flow cytometry. The expression of Bcl-2 was quantified by Western Blotting technique. The analysis revealed no statistical difference between the groups for these parameters. For evaluation of autophagy proteins extracted from bone marrow cells and evaluated the expression of proteins Akt and phosphorylated and total mTOR, complexes of mTOR (Raptor, and Rictor Gβ1), Beclin-1 and LC3II. The results showed significant increase in overall mTOR, Raptor, and LC3II Beclin-1 and decreased phosphorylation of mTOR in cells derived from malnourished animals compared to the control group. Malnutrition did not modify the expression of Akt total, but decreased phosphorylation of Akt and decreased expression of the protein Rictor and Gβ1 cells analyzed.

As apoptotic and autophagic processes can be difficult to detect in vivo, also redid the experiments in vitro, stimulating the cells with pro-apoptotic compounds (campotecina) and pro-autophagic (tamoxifen). In these experiments we observed that, when only stimulate cells

with camptothecin malnourished, the same at 12 hours had a higher percentage of initial apoptosis compared to 0 hours, suggesting that there is a period in which cells are signaled to via malnourished being more susceptible to apoptotic stimuli. The animals starved cells stimulated after 12 h showed significant increase in apoptosis compared to control late stimulated, indicating that at that time there is an increase in apoptosis both in the initial process, both late process.

Autophagy evaluated in kinetics of 0, 2, 6, 18 and 24 hours in vitro and observed a significant increase in autophagy in bone marrow cells of malnourished at 0 hours and after 18 hours stimulation with tamoxifen (20 microM) than the respective control, demonstrating that this period autophagy begins to be induced by stimulating more easily than the control.

Autophagy is a major contributor to cellular metabolism, providing nutrients when they are unavailable, and therefore in our model of protein malnutrition in the marrow hypoplasia would autophagic process as a mechanism for survival and repair.

Keywords: apoptosis, necrosis, autophagy, protein malnutrition, hemopoiesis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Gráfico representativo da concentração de regiões afetadas pela desnutrição	19
Figura 2: Principais diferenças entre apoptose e necrose.....	22
Figura 3: Vias de sinalização da apoptose.....	24
Figura 4: Vias de sinalização da necrose.....	26
Figura 5: Via de sinalização da autofagia.....	28
Figura 6: Consumo de água,ração e proteína.....	48
Figura 7: Variação da massa corporal e porcentagem da variação da massa corporal	49
Figura 8: Concentração plasmática das proteínas totais (g/dL) e albumina (g/dL),	49
Figura 9: Celularidade da medula óssea.....	50
Figura 10: Gráficos representativos dos resultados de Annexina V e PI.....	53
Figura 11: Gráficos da avaliação da apoptose por Annexina V e PI	54
Figura 12: Gráficos representativos dos resultados de caspase.3.	55
Figura 13: Gráficos da avaliação da caspase.3	55
Figura 14: Gráficos da avaliação da proteína Bcl-2	56
Figura 15: Imagens de apoptose por fluorescência Hoeschet 33258 1mM.....	56
Figura 16: Gráficos da avaliação da apoptose por Hoeschet 33258 1mM.....	57
Figura 17: Imagens de apoptose e vacúolos autofágicos por Microscopia Eletrônica	58
Figura 18: Gráficos representativos dos resultados de Annexina V e PI in vitro.....	59
Figura 19: Gráficos da avaliação da apoptose por Annexina V e PI in vitro	60
Figura 20: Gráficos representativos do LC3 por citometria de fluxo	62
Figura 21: Gráficos da avaliação do LC3 por citometria de fluxo	62
Figura 22: Resultado da determinação de Akt e p-Akt.....	63
Figura 23: Resultado da determinação de mTOR, p-mTOR ser 2481 e 2448	63
Figura 24: Resultado da determinação de Raptor,Rictor e Gβl.....	64
Figura 25: Resultado da determinação de Beclin-1	64
Figura 26: Resultado da determinação de LC3 I e II	65
Figura 27: Marcação com laranja de acridina animal controle	66
Figura 28: Marcação com laranja de acridina animal desnutrido.....	66
Figura 29: Gráficos representativos da autofagia in vitro	67
Figura 30: Gráficos da avaliação autofagia-LC3 in vitro.....	68
Figura 30: Gráficos da avaliação autofagia-LC3 in vitro.....	68
Figura 31: Esquema represenativo do mTOR	73
Figura 32: Interação das integrinas, fatores de crescimento na autofagia.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das Rações utilizadas	34
Tabela 2: Composição da mistura salínica	35
Tabela 3: Composição da mistura vitamínica	36
Tabela 4: Aminograma.....	50
Tabela 5 :Valores da série eritrocitária	51
Tabela 6: Valores da série leucocitária e das diferentes populações	51
Tabela 7: Resultados das diferentes populações presentes na medula óssea.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteínas conhecidas como Kinases B (PKB)
Apaf 1	Apoptotic Protease – Activating Factor 1
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Bovina
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica ligada à membrana mitocondrial
Beclin-1	APG6 , proteína relacionada à autofagia (AutoPhaGy)
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CTH	Célula-tronco Hemopoética
DNA	Ácido deoxirribonucléico
ERK	Quinase regulada por sinal extra celular
FAO	Food and Agriculture Organization
FAK	Kinase de Adesão Focal
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
Gβ1	Alvo da rapamicina subunidade complexo LST8 , proteína G beta subunidade-like
HCM	Hemoglobina corpuscular média
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
LA	Laranja de Acridina
LC3	Proteínas ligadas aos microtubules de cadeia leve 3 (Light Chain 3)
FN	Fibronectina
MEC	Matriz extracelular
Mtor	Mammalian target of rapamycin
NaF	Fluoreto de sódio
PBS	Phosphate buffer solution (Solução tampão fosfato)
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de Propídeo
PI3K III	Phosphoinositide 3- Kinase
PKC	Proteína Kinase C
PMSF	Phenlmethylsulphonyl fluoride (Fluoreto de fenilmetilssulfonila)
PRAS40	Proteína que regula a insulina através da via de mTOR
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida docecil sulfato de sódio
SMAC-DIABLO	second mithocondria-derived activator of caspases
TBS	Tris buffered saline (Solução tampão fosfato)
TNF	Tumor Necrosis factor
TNF-α	Tumor necrosis factor alfa (Fator de necrose tumoral alfa)
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Desnutrição.....	18
1.2. Hemopoese e Desnutrição.....	20
2. APOPTOSE, NECROSE E AUTOFAGIA	22
3. Vias de Sinalização da Apoptose, Necrose e Autofagia.....	23
3.1 Sinalização da Apoptose.....	23
3.2 Sinalização da Necrose	25
3.3 Sinalização Autofágica.....	27
4. DESNUTRIÇÃOXAPOPTOSE, NECROSE E AUTOFAGIA	30
5. OBJETIVOS	32
6. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
6.1 Animais	33
6.2 Indução da desnutrição.....	33
6.3 Preparo das Rações	33
6.4 Avaliação do estado nutricional dos animais.....	36
6.5 Obtenção das amostras biológicas	36
6.6 Determinação de proteínas totais e albumina plasmática	37
6.7 Aminograma	37
6.8 Hemograma e contagem de reticulócito	37
6.9 Obtenção de células da medula óssea e mielograma.....	37
6.10 Avaliação dos processos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo em células da medula óssea.....	38
6.11 Avaliação por citometria de fluxo de caspase 3 nas células da medula óssea	38
6.12 Extração de proteínas das células totais da medula óssea	39
6.13 Quantificação por Western blotting da proteína Bcl-2.....	39
6.14 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência em cél. totais da medula óssea.....	40
6.15 Avaliação por microscopia eletrônica de Transmissão das imagens de apoptose e vacúolos autofágicos.....	41
6.16 Avaliação da cinética da apoptose in vitro.....	41

6.17 Avaliação da autofagia por citometria de fluxo em células totais da medula óssea.....	42
6.18 Quantificação, por “western blotting” do Akt total, p-Akt, mTOR Total, p-mTOR ser 2448, p-mTOR ser2481, Rictor, Raptor e Gβ1 das células totais da medula óssea.....	43
6.19 Quantificação, por “western blotting”, da proteína Beclin envolvida na via de sinalização e autofagia das células totais da medula óssea	44
6.20 Quantificação, por “western blotting”, da proteína LC3B envolvida na via de sinalização da autofagia das células totais da medula óssea.....	45
6.21 Avaliação da autofagia por microscopia de fluorescência em células totais da medula óssea técnica de laranja de acridina.....	46
6.22 Avaliação da cinética da autofagia in vitro.....	47
7. Análise estatística.....	47
8. RESULTADOS	47
8.1 Determinação da concentração protéica das rações	47
8.2 Avaliações do estado nutricional	48
8.3 Aminograma	49
8.4 Avaliação hematológica	50
8.4.1 Eritrograma	50
8.4.2 Leucograma	51
8.4.3 Células totais da medula óssea.....	52
8.5 Avaliação dos processos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo em células totais da medula óssea em marcação de Anexina V e PI	53
8.6 Avaliação da caspase 3 por citometria de fluxo.....	54
8.7 Quantificação por Western Blotting da proteína Bcl-2.....	56
8.8 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência em cél. totais da medula óssea.	56

8.9 Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão da identificação de apoptose e vacúolos autofágicos.....	57
8.10 Avaliação da cinética da apoptose in vitro.....	59
8.11 Avaliação da autofagia por citometria de fluxo em células totais da medula	61
8.12 Quantificação, por “western blotting” do Akt total, p-Akt, mTOR Total, p-mTOR ser 2448, p-mTOR ser2481, Rictor, Raptor e Gβ1 das células totais da medula óssea.....	62
8.13 Quantificação, por “western blotting”, da proteína Beclin envolvida na via de sinalização da e autofagia das células totais da medula óssea	64
8.13 Quantificação, por “western blotting”, da proteína LC3B envolvida na via de sinalização da autofagia das células totais da medula óssea.....	64
8.14 Avaliação da autofagia por microscopia de fluorescência em células totais da medula óssea técnica de laranja de acridina.....	65
8.16 Avaliação da cinética da autofagia in vitro.....	67
DISCUSSÃO.....	68
9.1 Apoptose e Desnutrição.....	69
9.2 Autofagia e Desnutrição.....	71
10. CONCLUSÃO	79
11.REFERÊNCIAS.....	80
ANEXO COMITÊ DE ÉTICA.....	90

1. Introdução

1.1. Desnutrição

A desnutrição é um dos principais problemas de saúde pública do mundo, sendo a desnutrição protéico-calórica uma das formas mais frequentes. (ONIS; HABICHT, 1996). A desnutrição protéica (DP) e a protéico-calórica ou protéico-energética (DPE) é causa de várias manifestações clínicas, sendo que as alterações mais evidentes são as relacionadas aos parâmetros antropométricos. A DP e a DPE ocorrem em uma seqüência que varia desde a deficiência protéica exclusiva (*Kwashiorkor*), que é decorrente de uma carência protéica com ingestão normal de carboidratos até a deficiência protéica e energética (*Marasmus*), que decorre da deficiência prolongada de proteínas e carboidratos. No homem, a deficiência nutricional raramente é exclusivamente calórica ou protéica, ocorrendo sempre à associação de ambas que geralmente é denominada de síndrome *kwashiorkor-marasmática*. (CARRINGTON; CARVALHO; HALL e KENNEY, 2001). Geralmente em humanos com DPE ocorre concomitantemente em outras deficiências, principalmente de ferro e zinco e outros micronutrientes. (BWIBO; GEWA e NEUMANN, 2004). As manifestações clínicas da DPE dependem do grau e severidade da deficiência protéico-calórica, da causa e duração da deficiência, bem como da idade do indivíduo e da associação ou não com outras doenças. Os quadros intermediários surgem pela combinação de vários graus de privação protéica com diversos graus de deficiência calórica total (De ANGELIS, 1986).

Estas síndromes podem cursar com retardo no crescimento, alterações psico-motoras e alterações morfológicas e funcionais acentuadas em diversos órgãos e sistemas do corpo como coração, pulmões, trato gastrointestinal, fígado, rins e sistemas endócrinos e imunológicos (De ANGELIS, 1986; AUGUSTO, 1995; ROBBINS et al., 2003).

A desnutrição acomete principalmente crianças, idosos e indivíduos hospitalizados sob alimentação parenteral ou que apresentam distúrbios alimentares (WAITZBERG et al., 1999; MARCOS, 2000; BRUNDTLAND et al., 2000; GADDUCCI et al., 2001; AKNER e CEDERHOLM, 2001; NOVA et al., 2002; KEUSCH, 2003).

O número de pessoas afetadas pela desnutrição no mundo reduziu-se nos últimos anos afetando, mundialmente, 868 milhões de habitantes, o que ainda torna um problema sério de saúde pública (FAO, 2012). A FAO (Food and Agriculture Organization) também advertiu que esse problema continua sendo inaceitável e que os avanços na luta contra a desnutrição registraram uma desaceleração devido a várias razões, tais como a crise econômica mundial, a

alta dos preços dos alimentos, a crescente demanda de biocombustíveis, a especulação sobre matérias-primas alimentares ou mudanças climáticas.

Segundo o estudo, das 868 milhões de pessoas desnutridas no período 2010-2012, a enorme maioria - 852 milhões - vive em países em desenvolvimento, onde a desnutrição atinge atualmente 14,9% da população. A desnutrição concentra-se em três regiões, que somam 754 milhões de afetados, conforme gráfico 1:

Figura 1: Gráfico representativo da concentração de regiões afetadas pela desnutrição.

Fonte modificada: www.fao.org.br

No sudeste da Ásia e na Ásia oriental foi registrada uma redução da proporção de pessoas desnutridas nas regiões em desenvolvimento entre 1990-92 e 2010-12 (de 13,4% a 7,5 % e de 26,1% a 19,2%, respectivamente), enquanto que, na América Latina, também diminuiu, de 6,5% a 5,6%, indica a FAO. Durante o mesmo período, a proporção aumentou de 32,7% a 35% na Ásia meridional, de 17% a 27% na África subsaariana e de 1,3% a 2,9% na Ásia ocidental e África do Norte.

O Brasil conseguiu reduzir o número de desnutridos, de 14,9% no período de 1990 a 1992 para 6,9% entre 2010 e 2012 devido, principalmente, aos programas sociais desenvolvidos e aplicados pelo Governo. Cerca de 13 milhões de pessoas ainda passam fome ou sofrem com desnutrição, segundo relatório, feito pela FAO, pelo Fundo Internacional para o Desenvolvimento Agrícola (FIDA) e pelo Programa Mundial de Alimentos (PMA).

O diretor-geral da FAO, José Graziano, alertou que é “inaceitável” o número de subnutridos no mundo, considerando os avanços tecnológicos conquistados pela humanidade e ainda acrescentou que mais de 100 milhões de crianças com menos de 5 anos estão abaixo do peso. Segundo ele, a desnutrição infantil é responsável por mais de 2,5 milhões de crianças mortas por ano, ou seja, infelizmente 6,84 crianças morrem todos os dias por fome, praticamente uma a cada quatro horas.

A tendência de redução no número de desnutridos, segundo o relatório, deve ser mantida até 2015. A meta das Nações Unidas é que a média mundial de redução desse número alcance 11,6%, dentro de três anos.

1.2. Hemopoese e desnutrição

O tecido hematopoético como todos os outros tecidos que apresentam alta taxa de renovação e proliferação celular requer uma variedade de nutrientes e pode ser alterado por deficiência nutricional (BORELLI, 2004; BORELLI et al., 2009; XAVIER et al., 2007). A produção de células sanguíneas depende de um microambiente hemopoético adequado, estrutura organizada que regula a fisiologia da célula tronco hemopoética (CTH). (BORELLI, 2004; COWLING & DEXTER, 1995; McKENNA & COTTER, 1997).

A hemopoese ocorre em regiões anatômicas específicas onde existem localizações histo-anatômicas denominados de microambientes, que regulam a fisiologia da CTH e de células progenitoras que permitem a formação das diferentes linhagens sanguíneas. O microambiente hemopoético é constituído por células sanguíneas em diferentes estágios de maturação, células estromais (células reticulares, macrófagos, fibroblastos, adipócitos), por uma matriz extracelular (MEC), formada principalmente por fibronectina (FN), laminina (LN), colágeno, proteoglicanos (PG) e ácido hialurônico, e por substâncias solúveis (EVANS et al., 1991; BRACH e HERMANN, 1991; MAYANI et al., 1992; ABBOUD e LICHTMAN, 2001), apresentando-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica que, além de fornecer o parênquima de sustentação para as células hemopoéticas, permite um “ambiente bioquímico” fundamental para a proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (BORELLI, 2004; MAYANI et al., 1992; OPAS, 1994; ABBOUD e LICHTMAN, 2001). Dessa maneira, as existências de fatores regulatórios formam microambientes indutivos (TRENTIN, 1978; TESTA; DEXTER, 1990) que controlam a hematopoese pela produção e secreção local de citocinas pelas células do estroma, co-localização de citocinas para a célula tronco hematopoética (CTH) nos locais de contato célula - célula e, ou célula – MEC ou ainda, por estímulo direto pelo contato celular (RIOS; WILLIAMS, 1990; METCALF, 1992; OPAS, 1994) interações célula-célula e célula-MEC (TAVASSOLI e MINGUELL, 1991). Demonstrou-se que a implantação da CTH é dependente de migração intramedular seguida de retenção seletiva em nichos endosteais específicos (NILSSON, 2001), sendo que a interação das células primitivas com o estroma depende da presença de proteoglicanos (PG) na MEC secretados pelas células estromais (MAYANI, 1992). Proteoglicanos associados à membrana

celular podem interagir com outros componentes da MEC como FN, constituindo um sistema de regulação da proliferação celular (TAVASSOLI e MINGUELL, 1991).

Estudos no nosso laboratório tem demonstrado, na desnutrição protéica, hipoplasia de medula óssea (MO) de camundongos (BORELLI et al., 1995, 2001, 2007) com evidências histológicas de alteração da MEC e comprometimento da célula tronco hematopoética, com diminuição e/ou perda de proliferação celular afetando a granulopoese (BORELLI et al., 2009), o qual contribuiu para a leucopenia encontrada (GARCIA, 1992; BORELLI et al., 1995), linfocitopenia (GARCIA, 1992; AUGUSTO, 1995; BORELLI et al., 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI et al., 1995; BARON, 1997),

Um dos pré-requisitos para a hematopoese é o estabelecimento das células tronco com um microambiente adequado para interações de células-células ou células-matriz (TAVASSOLI; MIGUELL, 1991). Células estromais e componentes da MEC modulam o crescimento e diferenciação de progenitores hematopoéticos, porém há poucos estudos que exploram o relacionamento entre desnutrição e o microambiente hematopoético (XAVIER et al., 2007; BORELLI et al., 2009; XAVIER et al., 2007) .

Dados da literatura apontam que nos indivíduos desnutridos, há diminuição de componentes da MEC no fígado, porém, a relação protéica/tecido não apresentou diferença significativa, sugerindo que a causa tenha sido a infiltração gordurosa com esteatose hepática. (AXELLSON et al., 1990) observaram mineralização óssea, inferindo que a desnutrição leva à síntese de PG de peso molecular mais elevado acarretando inibição da calcificação. (VITURI et al., 2000) encontrou alterações na proporção de proteínas, especialmente de FN, trombospondina e LN, situação que poderia estar contribuindo para a hipoplasia observada. Mais recentemente, a partir da caracterização imuno-histoquímica e ultra-estrutural de tais alterações evidenciou-se aumento na deposição de FN na medula óssea esternal de animais desnutridos especialmente em sítios endosteais/paratrabeculares (regiões de fixação de células tronco hemopoética) e aumento na deposição de LN, particularmente em regiões perisinusais. Tais alterações podem modificar a co-localização de uma série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de crescimento e diferenciação de células hemopoéticas (BORELLI et al., 1995, 2001, 2007;2009; KLEIN, 1995; VITURI, 2000). Os mecanismos que levam a estas alterações ainda não foram elucidados, mas, considerando que as moléculas da MEC estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação, diferenciação e migração das células hemopoéticas exercendo desta forma controle sobre a hemopoese medular, estas alterações podem ser significativas para a fisiologia do tecido (BORELLI, et al., 1995; VITURI, et al., 2000; XAVIER, et al., 2007).

2. Apoptose, Necrose e Autofagia

A morte celular programada (MCP), referindo-se a autofagia, apoptose e necrose programada, define um tipo de morte sinalizada através de um programa intracelular. Essas três formas de MCP podem decidir, em conjunto, o destino final das células. Apoptose e necrose programada de modo invariável contribuem para a morte celular, enquanto a autofagia pode ter uma função de sobrevivência ou pró-morte. (OUYANG, et al., 2012).

A apoptose é um mecanismo de morte conservada e regulada de células caracterizadas por condensação nuclear, fragmentação de DNA e encolhimento celular, desempenhando papel importante no desenvolvimento do organismo e manutenção da homeostase (SPENCER, 2011), enquanto células necróticas exibem uma forma aumentada sem alterações significativas de organelas. Conforme figura 2, as características morfológicas distintas incluindo condensação cromática e integridade da membrana plasmática preservada, são mais proeminentes na apoptose. Em contraste, células em necrose não exibem uma morfologia típica, exceto para o início da ruptura na membrana plasmática.

Além disso, a ativação da caspase é um pré-requisito para a execução de apoptose, enquanto na necrose é necessária a ativação de RIP1 (Young Sik Cho et al, 2010). A membrana celular é bem preservada em células apoptóticas, que fagocitadas através de células imunes ou células vizinhas (Krysko et al., 2006). Por outro lado, as células danificadas através da necrose estimulam as respostas imunes adaptativas através de ativação de células T, levando a eliminação das células comprometidas pelos processos da inflamação (Eigenbrod et al. 2008).

Figura 2. Principais diferenças entre apoptose e necrose.

Fonte modificada: (Young Sik Cho et al, 2010)

Outro tipo de morte celular programada que interage com a apoptose é a autofagia que conjuntamente envolve processos moleculares importantes que mantêm a homeostase. Enquanto a apoptose cumpre o seu papel através da remoção de células danificadas ou

indesejadas, a autofagia mantém a homeostase celular através da reciclagem seletiva de moléculas e organelas intracelulares. No entanto, em algumas condições, a autofagia pode levar à morte da célula. Dados da literatura indicam uma interação entre as proteínas do núcleo em ambas as vias, que faz com que o mecanismo molecular entre a apoptose e autofagia interajam.

3. Vias de sinalização da apoptose, necrose e autofagia

3.1 Sinalização da apoptose

A apoptose é induzida pela ativação de uma família de proteases que tem uma cisteína no seu sítio ativo e clivam suas proteínas – alvo em ácido aspártico específicos, denominadas caspases. As caspases 2, 8, 9, 10, 11 e 12 são caspases iniciadoras e estão intimamente acopladas a sinais pró-apoptóticos. Estas caspases iniciadoras ativam caspases efetoras como caspases 3, 6 e 7.

As duas vias de sinalização que podem ativar a cascata de caspases levando a apoptose são as vias extrínseca, através dos receptores de morte, e a via intrínseca por ativação mitocondrial (PETER, 2011).

Na via extrínseca o receptor de morte responde a ligantes indutores de morte, incluindo o ligante Fas (FasL), fator de necrose tumoral (TNF), ou TNF relacionado com os ligantes de indução de apoptose (TRAIL). A ligação dos ligantes com os receptores pró-apoptóticos tais como Fas, DR4 ou TNFR1/5 na superfície da célula desencadeia a apoptose através da formação dos domínios de morte associados ao Fas (FADD) ou associados aos domínios de morte de TNF (TRADD). Neste ponto, um complexo de sinalização indutor de morte (DISC) é formado, resultando no recrutamento de caspases iniciadoras 8 e 10, que irão ativar as caspases 3, 6 e 7, executando a morte por apoptose. Além disso, caspases 8 e 10 também podem ativar as vias mitocondriais, acarretando ativação de Bax/Bak e a indução do citocromo C e Smac liberados pela mitocôndria. (CHIPUCK; MOLDOVEANU; LLAMBI; PARSONS e GREEN, 2010).

Na via intrínseca (figura 3), a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP), leva à liberação de proteínas pró-apoptóticas do espaço intermembranar mitocondrial (EIM). Este evento é crucial para ativação das caspases iniciadoras e ativação da apoptose (STEPHEN & GREEN, 2010).

Figura 3 – Vias de sinalização da apoptose, envolvendo a via intrínseca e extrínseca, as caspases, família BCL-2 e as IAPs, processos envolvidos para ativar a apoptose. **Fonte modificada:** (STEPHEN & GREEN, 2010) .

Uma proteína crucial liberada da mitocôndria na via intrínseca é o citocromo C, um componente da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais, porém, quando ligado (no citoplasma) à proteína adaptadora de ativação da pró-caspase chamada de Apaf1 provocado a oligomerização de APAF1 em um heptâmero em forma arredondada chamado de **apoptossomo**. As proteínas APAF1 no apoptossomo recrutam então proteínas pró-caspases iniciadoras (pró-caspase 9), as quais são ativadas por proximidade ao apoptossomo, assim como as proteínas pró-caspases 8 e 10 são ativadas no complexo DISC. Caspase-9 ativada, por sua vez, cliva e ativa caspase 3 e caspase 7 (ABDULLAEV, 2002) .

Há uma segunda liberação mitocondrial de proteínas: Smac (também conhecido como DIABLO) e OMI (também conhecido como HTRA2). Enquanto o citocromo C liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO remove as IAP (Proteínas inibidoras de apoptose) de sua ligação inibitória com as caspases (GREEN , 2010). Cinco diferentes membros das IAP já foram descritos: NAIP, XIAP, c-IAP-1, c-IAP-2 e survivina (EPPING; FERREIRA; GIACCONE e KRUYT, 2002). MOMP é um processo altamente regulado e controlado através das interações entre os membros pró e anti-apoptóticos da família de

proteínas (BCL-2) que regulam a via intrínseca da apoptose principalmente pelo controle da liberação do citocromo C e outras proteínas liberadas pela mitocôndria . Os membros da família BCL-2 classificam-se em anti –apoptóticos como BCL-2 com domínio homólogo 4 (BH1-4) e geralmente são integrados dentro da OMM (membrana mitocondrial exterior), citosol e retículo endoplasmático; BCL-2-relacionados com o gene A1 (A1); BCL-2; BCL-2-relacionados com um gene de isoforma longa (BCL-xL), BCL-w, e leucemia mielóide 1 (MCL-1) são os membros mais importantes do repertório anti-apoptóticas de BCL-2 e preservam diretamente a integridade da OMM inibindo as proteínas pró-apoptóticas de BCL-2 (STRAPPAZZON , VIETRI- RUDAN, CAMPELLO , 2011).

Os membros pró-apoptóticos estão classificados em proteínas efetoras e proteínas “BH3-only”. As proteínas efetoras se classificam em antagonista de BCL-2 (BAK) e BCL-2 associado com a proteína X (BAX) (KVANSAKUL, 2008).

O BH3- only é subdividido através da sua capacidade de interagir com as proteínas anti-apoptóticas de BCL-2 e seus efetores, são classificados em BAD (antagonista de BCL-2 na morte celular); BID (agonista de BCL-2 que interage com os domínios de morte) e BIM (interage com BCL-2 com os mediadores de morte celular) e também pode induzir diretamente a oligomerização de BAK , BAX e MOMP, portanto BH3-only são proteínas referidas como ”ativadores direto” (CHIPUCK; MOLDOVEANU; LLAMBI; PARSONS e GREEN , 2010).

3.2 Sinalização da Necrose

A necrose programada, também conhecido como “necroptosis”, tem atraído recentemente grande atenção como um mecanismo importante de regulação celular e o conhecimento de seus componentes de sinalização está se expandindo. Dados da literatura apontam que “Necroptosis” é regulada através de RIP1 e RIP3 quinases (figura 4) e a sua importância fisiopatológica foi confirmada em vários modelos de doença (Zhou Z , et al. , 2012).

Figura 4: Via de sinalização da necrose, interação de RIP1 e RIP3.

Fonte modificada: (Young Sik Cho et al, 2010).

Em mamíferos existem dois efetores de necrose. Um deles é uma serina/treonina quinase - RIP1 específica que desempenha papel essencial em resposta a TRAIL e TNF- α , uma vez que as células são estimuladas com esses ligantes de morte promove ativação de NF- κ B e sobrevivência das células (YUAN, CHRISTOFFERSON, 2010). Conforme figura 4, RIP1 liberado associa-se com caspase 8 e FADD para formar um complexo citosólico II executando a morte celular por apoptose (MICHEAU e TSCHOPP, 2003). No entanto, quando caspase-8 é inativada, as células são redirecionadas para necrose programada.

De acordo com a literatura, a morte celular por apoptose requer altos níveis de ATP e na necrose uma depleção. No entanto, estudos recentes sugerem que RIP3, mas não RIP1, funciona como o interruptor molecular que determina se as células direcionam-se à apoptose ou necrose em resposta a estímulos externos. Foi apoiado o fato de que na apoptose, RIP1 na ausência de RIP3, desencadeia uma necrose programada. No entanto, apesar dessa surpreendente identificação desta proteína na modulação da necrose, ainda permanece indefinida se necrose é ativada quando esses efetores essenciais da apoptose são prejudicados ou se necrose é ativada por proteínas recém-sintetizadas.

Após a ligação do receptor de morte com seu ligante correspondente, uma série de eventos citosólicos de sinalização são transmitidas para a permeabilização na membrana da mitocôndria, onde é diferencialmente alterado dependendo do modo de morte celular. Apoptose e necrose, preferencialmente, podem causar permeabilização na membrana

mitocondrial externa (MOMP) e transição de permeabilidade mitocondrial (mPT), respectivamente (GALUZZI e KROEMER, 2008). Ambos MOMP e mPT são suprimidos por proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2.

A proteína BMF liga-se à Bcl-2 e Bcl-xL e têm sido implicada na apoptose. Recentemente, BMF foi identificada como um componente da necrose programada (HITOMI, 2008). Embora o papel da BMF na conexão da apoptose e necrose continua por esclarecer, é tentador propor que BMF pode promover não só a apoptose, através da supressão de Bcl-2 mediada por MOMP, mas também a necrose, interferindo com Bcl-2 através do bloqueio de mPT (CHO, PARK, SHIN, CHAN , 2010).

Com TNF ativado, RIP3 interage com enzimas metabólicas, incluindo fosforilase de glicogênio (PYGL), ligase de glutamato de amônia (GLUL) e desidrogenase 1 de glutamato (GLUD1) (Zhang et al., 2009). PYGL e GLUL são enzimas citosólicas que catalisam a degradação de glicogênio e a condensação de glutamato e amônia para glutamina, respectivamente. GLUD1 é uma enzima da matriz mitocondrial que converte glutamato a α -cetoglutarato. O resultado dos produtos de glicose-1-fosfato e glutamina são mobilizados para o ciclo de Krebs, na mitocôndria, para produção de ATP pela fosforilação oxidativa (CHO, PARK, SHIN, CHAN , 2010).

Sob condições de necrose, acúmulo e metabolismo estimulado de fontes de energia pode causar produção de EROS (espécies reativas de oxigênio) que determina a mudança de apoptose para necrose. Portanto, RIP3 pode atuar como um mediador conectando a partir da ligação de TNF-TNFR na membrana citoplasmática ao regulador metabólico na matriz da mitocôndria através da ativação de enzimas citosólicas metabólicas. Estes resultados mostram o novo paradigma que a necrose programada é uma resposta ativa celular para ligantes de morte que é impulsionado pela quinase RIP3.

3.3 Sinalização autofágica

A via de sinalização da autofagia (figura 5) funciona como um “housekeeping”, ou seja, uma função simples de remoção de produtos. Outros sistemas proteolíticos e a participação dos lisossomos é um contínuo “turnover” (síntese e degradação) de constituintes celulares e também outras organelas, tais como mitocôndrias, peroxissomos ou partes de organelas como regiões do complexo de golgi e áreas seletivas do núcleo podem ser removidas pela autofagia (RABINOWITZ, WHITE , 2010).

Figura5-Autofagia divide-se em quatro etapas gerais: (a) nucleação e extensão de uma membrana delimitante em uma estrutura de forma crescente que engolfa uma porção do citoplasma, (b) fechamento do autofagossomo em um compartimento limitado por membrana dupla, (c) fusão do novo compartimento com lisossomos e (d) digestão da membrana interna do autofagossomo e de seu conteúdo. Ainda se sabe pouco sobre os eventos que levam a formação do autofagossomo ou como o processo de autofagia é controlado e as organelas específicas marcadas. Fonte modificada: www.cellsignaling.com.br.

Na execução da autofagia há envolvimento de um conjunto de produtos de genes evolutivamente conservados, conhecidas como: proteínas ATGs. Os ATGs estão envolvidos em várias fases, incluindo na iniciação da nucleação da autofagia, maturação das vesículas autofágicas e fusão das vesículas autofágicas com os lisossomos. , portanto os ATGs interagem o tempo todo na autofagia e também têm sido relacionados com a apoptose. (Fan YJ, Zong WX, 2012).

Uma proteína importante na autofagia é o Atg4 que é responsável pela clivagem C - terminal do LC3 (MIZUSHIMA, 2010). Dados da literatura apontam que um membro do Atg4 (Atg4D) é clivado em DEVD através da caspase 3 durante a apoptose, gerando dois fragmentos GABA associado com “protein like 1” (GABARAP-L1) e fragmento C-terminal que contém um domínio BH3 que pode ser recrutado para a matriz mitocondrial, resultando em morte celular através da regulação de ROS (BETIN, et al.,2012).

Atg5 participa na iniciação da autofagia através de um sistema de conjugação ubiquitina-like que interage com Bcl-xL que por sua vez transloca para a mitocôndria e logo em seguinte ativa a apoptose.

Atg6/Beclin1 tem um papel de extrema importância na iniciação da autofagia. Vários estudos apontam evidências de que Beclin1 é um substrato da caspase 3 e quando a mesma é

ativada, cliva Beclin1 em dois sítios potenciais: TDVD (133) e DQLD (149). Com a clivagem, Beclin1 perde sua capacidade de promover autofagia e além do mais, o fragmento C-terminal localiza a mitocôndria e sensibiliza as células para à apoptose. O mecanismo de como o fragmento C-Beclin1 participa nesse dano mitocondrial ainda requer mais pesquisas (WIRAWAN, VANDE WALLE, KERSSE, 2010).

Existem dois sistemas de ubiquitina-like (família de proteínas conhecida como UBLs que modificam alvos celulares em um caminho que é paralelo, mas distinto de ubiquitina) que são fundamentais para autofagia agindo em conjugação na Atg5-Atg12 e na etapa do processamento da LC3. No primeiro desses sistemas, age com um Atg7 E1 enzima ubiquitina que ativa Atg12 (ATP dependente). O segundo sistema ubiquitina-like envolvido no autofagossomo é a formação do processamento de microtúbulos associado a uma proteína de cadeia leve 3 (LC3B), LC3 é uma proteína ubiquitina-like com apenas um alvo conhecido: PE. LC3-PE conjugado é recrutado ao fagóforo e está envolvido no alongamento e formação do autofagossomo. (PAN, ULLMAN, DOU, 2011). Em síntese, quando o autofagossomo completa a fusão da expansão das extremidades da membrana no fagóforo o próximo passo para a maturação deste processo de auto-degradação é a fusão do autofagossomo com o lisossomo para formar o autofagolisossomo. (ESKELINEN, 2005).

Estudos recentes sugerem que o LC3 pode servir como um meio para facilitar ativação da apoptose através da caspase 8, porque p62 interage com caspase-8, sendo assim, o acúmulo de p62 e LC3 leva a agregação e auto-ativação de caspase-8, resultando portanto em apoptose (YOUNG, TAKAHASHI, KHAN, 2012).

Atg12 é uma proteína ubiquitina-like que pode conjugar-se covalentemente com Atg3 e Atg5 regulando apoptose e autofagia, respectivamente. Um estudo recente revelou que a forma livre de Atg12 pode funcionar como um potente fator apoptogênico em resposta a estímulos de morte de células diferentes. Estudos recentes apontam que Atg12 pode interagir com o anti-apoptótico Bcl-2, regulando assim a ativação de Bax e a permeabilização da membrana exterior (MOMP) (RUBINSTEIN, EISENSTEIN, BER, 2011).

O complexo Atg1/ULK1 (Atg1 em leveduras e ULK1 em mamíferos) é um elemento essencial que regula a formação do autofagossomo. Quando os nutrientes são abundantes, a ligação do complexo pelo alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) complexo 1 (mTORC1) inibe autofagia. mTORC1 é um importante regulador do crescimento celular e metabolismo. Ele é composto de cinco subunidades que incluem Raptor, que interage com ULK1, através da fosforilação de ULK1 e outro complexo Atg13, mTOR inibe a iniciação da autofagia. Em situações de fome, mTORC1 se dissocia do complexo

ULK1, liberando-o para desencadear a nucleação e alongamento do autofagossomo (RABINOWITZ, WHITE, 2010).

A membrana delimitante na autofagia para sua formação necessita da interação da PI3K ou VPS34 uma família de enzimas envolvidas nas funções celulares, tais como crescimento celular, proliferação, diferenciação e sobrevivência. Seu parceiro obrigatório, Beclin-1, na formação dessa membrana na autofagia é relativamente bem entendido em sistemas de mamíferos é determinada por eventos de sinalização na célula que ainda não foram totalmente elucidadas, mas, em muitos casos, são sensíveis à disponibilidade de nutrientes no microambiente.

4. DESNUTRIÇÃO X APOPTOSE, NECROSE E AUTOFAGIA.

Não há na literatura trabalhos relacionando apoptose na medula óssea em animais submetidos à desnutrição protéica, porém tem sido sugerido que os desequilíbrios nutricionais podem induzir a apoptose em uma variedade de tipos de células. Estudos foram realizados para examinar o efeito da desnutrição grave em subconjuntos de células e da frequência de morte celular espontânea e / ou induzida por dexametasona *in vivo* no timo e baço na desnutrição grave em ratos lactantes. A frequência de apoptose foi estimada por citometria de fluxo utilizando anexina-V e por método de TUNEL (transferase-mediated dUTP nick-end labelling assays). Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a desnutrição está associada a um aumento significativo de células apoptóticas espontaneamente no timo (9,8 vezes) e baço (2,4 vezes). O aumento da apoptose foi associada em grande parte com timócitos (+) CD8 (+) de ratos desnutridos. Inesperadamente, frequências semelhantes de apoptose espontânea destas células foram encontradas tanto em ratos nutridos como em ratos desnutridos. A frequência de apoptose induzida por dexametasona mostrou-se semelhante nos dois grupos de animais. No entanto, em animais desnutridos tratados com dexametasona, o percentual de apoptose em timócitos duplamente negativos foi significativamente maior do que em animais bem nutridos, enquanto a taxa de apoptose foi menor entre duas células duplamente positivas. Em geral, o timo parece ser mais sensível aos efeitos da desnutrição para dexametasona do que o baço. Além disso, timócitos duplo negativos parecem ser os mais afetados (Cortés e Ortiz, 2009).

Há estudos sobre desnutrição materna, (BELKACEMI et al., 2012), observaram em ratas grávidas submetidas à desnutrição protéica uma restrição do crescimento intra-uterino, sendo que esta restrição poderia ser ocasionada pela apoptose. Os resultados mostraram que a placenta na desnutrição materna tinha aumentado significativamente a apoptose, com menor expressão das proteínas anti-apoptóticas: Bcl-xL e Bcl-2 e aumento significativo da expressão

das proteínas pró-apoptóticas: Bax e Bak. Outro grupo de pesquisa avaliou a desnutrição materna em ovelhas submetidas a uma desnutrição protéica energética, onde eles verificaram a presença da apoptose em fetos machos pelo ensaio de método de tunel e observaram um aumento de núcleos apoptóticos. Este aumento afetou o desenvolvimento renal dos fetos, reduzindo a formação de novos vasos sanguíneos, e levando a um maior número de células renais morrendo espontaneamente. (LLYOD, 2012).

Ao nascer, o fornecimento de nutrientes para placenta é subitamente interrompida, e os neonatos passam por uma fome severa, até que a oferta possa ser restaurada através dos nutrientes do leite. Pesquisas mostram que os neonatos se adaptam a circunstâncias adversas pela indução de autofagia. Há uma diminuição da autofagia em recém-nascidos durante a embriogênese, no entanto, a autofagia é imediatamente regulada em vários tecidos após o nascimento e é mantida em níveis elevados durante 3 a 12 horas, antes de regressar aos níveis basais dentro de 1 a 2 dias. Camundongos deficientes para a proteína Atg5, que é essencial para a formação do autofagossomo, apresenta normal ao nascimento, mas morrem dentro de um dia. O tempo de sobrevivência dos recém-nascidos esfomeados e deficientes para a proteína Atg5 é de aproximadamente 12 horas, é muito mais curta do que a dos recém-nascidos do tipo selvagem (cerca de 20 horas), mas pode ser prolongada se houver uma alimentação forçada de leite. Deficiência de Atg5 em neonatos exibem diminuição nas concentrações de aminoácidos no plasma e nos tecidos. Estes resultados sugerem que a produção de aminoácidos por degradação autofágica de "self" proteínas, permite a manutenção de energia na homeostase, sendo importante para a sobrevivência durante o jejum neonatal. (KUMA, et al., 2004)

Não há dados na literatura sobre o efeito da desnutrição protéica ou proteica energética na autofagia, somente há trabalhos de autofagia relacionados ao efeito da redução de nutrientes, insulina e ao prolongamento do tempo em que as células permanecem em jejum.

Autofagia pode ser estimulada em determinadas situações, como por exemplo: a fome e por desequilíbrios nutricionais e metabólicos. Quando é induzida por essas condições a autofagia mantém um "pool" de aminoácidos para que as proteínas essenciais possam ser sintetizadas (YOSHIMORI, 2003). Quando os níveis de insulina e nutrientes são reduzidos, autofagia é ativado através das ações sequenciais do mTOR e proteínas ATGs (KUMA, 2010). Dados da literatura relatam que a deficiência de Pdx1 e privação de nutrientes aumenta os níveis de autofagia em células beta no pâncreas (FUJIMOTO et al., 2009).

A autofagia provoca a liberação de nutrientes necessários através da digestão de uma parte da célula, ela pode levar a recuperação, se for bem sucedida. Há uma variedade de meios

pelos quais as células de morte podem ser provocadas, o que parece ser um grande processo regulado para a degradação de proteínas intracelulares e organelas.

Hepatócitos em cultura durante várias horas sob ausência de aminoácidos iniciaram um processo parcial de digestão que parece ser um meio de proporcionar a célula com aminoácidos necessários para manter a gliconeogênese sob condições de estresse. Incubação de uma variedade de células com glucagon também inicia autofagia. (MIZUSHIMA, OHSUMI e YOSHIMORI, 2004).

Claramente, autofagia pode ser iniciada em resposta a um estresse metabólico. No entanto, se o déficit nutricional de estresse metabólico permanecer mais que poucas horas, a célula se move de autofagia para a apoptose. Assim, a autofagia é uma espécie de “failsafe” (limite de segurança) no qual as células buscam uma tentativa de resgatar-se das condições de fome, como na esperança de evitar a apoptose, sendo uma questão relevante para determinar déficits em vários nutrientes que podem iniciar autofagia (YOSHIMORI, 2003).

A literatura mostra que o tipo de estresse em combinação com sua intensidade e a duração pode afetar o caminho da morte escolhida. O tipo de morte iniciada em uma célula ou tecido de um nutriente específico poderá ser definido caso a caso. Sendo assim, um tipo de morte é iniciado, especialmente em tecidos que são substancialmente comprometidos por deficiências em uma variedade de nutrientes. Assim, a correta identificação de caminhos de morte iniciada por desequilíbrios nutricionais pode tornar-se muito importante no tratamento e gestão dos indivíduos afetados.

5. OBJETIVO

Em virtude do exposto e considerando os resultados anteriores de nosso grupo evidenciando que a desnutrição protéica leva a comprometimento da hemopoese, hipoplasia medular com pancitopenia periférica, alterações na matriz extracelular e permanência de células tronco/progenitoras na fase G0/G1 do ciclo celular, nos propomos, neste projeto, avaliar a participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia supra mencionada.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem **C57bl/6J**, machos, de dois a três meses de idade, oriundos de colônias do biotério de Produção e Experimentação Animal 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/FCF/282).

6.2 Indução à desnutrição

Os animais, previamente pesados, foram alocados em gaioleiros metabólicos (ZUCAS *et al.*, 1969), sendo mantidos sob temperatura ambiente de 22 a 25 °C, ciclo de luz claro-escuro de 12 hs (luzes acesas às 7:00 hs da manhã), umidade de $55 \pm 10\%$ e pesados a cada 48 hs. Durante o período de adaptação às condições do gaioleiro metabólico (cerca de duas semanas), todos os animais receberam ração controle contendo 12% de proteínas, para em seguida, serem separados em dois grupos: **nutrido ou controle (C)**, que permaneceu recebendo a ração controle; e **desnutrido (D)**, que passou a receber ração hipoprotéica, contendo 2% de proteínas (Du *et al.*, 2000). Ambos os grupos de animais tiveram livre acesso à água e às rações. Aproximadamente após 5 semanas, período transcorrido até que os animais do grupo perdessem entre 20 a 25 % de peso corpóreo, os animais de ambos os grupos foram eutanaziados para obtenção das amostras biológicas e execução das análises.

6.3 Preparo das rações

As rações (Tabela 1) foram preparadas em nosso laboratório na forma de granulado e conservadas a 4°C até o momento do uso. Ambas as rações são isocalóricas e diferem apenas no conteúdo protéico. A fonte de proteína utilizada foi a caseína (LABYNTH®). Como, aproximadamente 80% do fósforo advém da caseína, a utilização de menor quantidade de caseína na ração hipoprotéica diminui a quantidade disponível do mesmo. Portanto, a composição da mistura salínica foi corrigida para que, em ambas, as rações, a quantidade de fósforo fosse a mesma (Tabela 2).

A concentração protéica 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), pela Sra. Ivanir Pires e sob a responsabilidade do Prof Dr. Júlio Tirapegui.

Tabela 1: Composição das Rações utilizadas

<i>Constituintes</i>	<i>Ração controle</i> <i>Ração I</i>	<i>Ração hipoprotéica</i> <i>Ração II</i>
Proteínas (%)	12	2
Mistura salínica (g)*	3,5	3,5
Mistura vitamínica (g)**	1	1
Fibra (g)	5	5
Óleo de Soja (g)	4	4
Sacarose (g)	10	10
L-cistina (g)	1,8	0,257
Colina (g)	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona (mg)	8	8
Amido de milho q.s.p. (g)	100	100

Dietas isocalóricas de 3601,0 kcal/kg de ração. g = grama

¹ As rações foram preparadas de acordo com as recomendações de 1993 do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos (REEVES, 1993).

Tabela 2: Composição da mistura salínica

<i>Composição da mistura salínica</i>	<i>Ração controle (g/Kg de Mix)</i>	<i>Ração hipoprotéica (g/Kg de Mix)</i>
Carbonato de cálcio anidro	357,00	357,00
Fosfato de potássio monobásico	258,75	262,45
Cloreto de sódio	74,00	74,00
Citrato de potássio	12,87	Xx
Sulfato de potássio	46,60	46,60
Óxido de magnésio	24,00	24,00
Citrato férrico	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65
Carbonato de manganês	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30
Iodato de potássio	0,01	0,01
Selenato de sódio anidro	0,01025	0,01025
Paramobilidato de amônio 4 H ₂ O	0,00795	0,00795
Meta-silicato de sódio 9 H ₂ O	1,45	1,45
Sulfato de potássio e crômio	0,275	0,275
Cloreto de lítio	0,0174	0,0174
Ácido bórico	0,0815	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066	0,0066
Sacarose	216,186	225,36

Tabela 3: Composição da mistura vitamínica

<i>Composição da mistura vitamínica</i>	Rações controle e desnutrida g/Kg de mix
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-HCl	0,70
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,60
Ácido fólico	0,20
D-biotina	0,02
Vitamina B-12	2,50
Vitamina E	15,00
Vitamina A	0,80
Vitamina D ₃	0,25
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,655

6.4 Avaliação do estado nutricional dos animais

A avaliação do estado nutricional dos animais foi baseada no peso corporal, no consumo de ração e de água e na avaliação dos seguintes parâmetros bioquímicos: concentração de proteínas totais e albumina sérica e o hemograma. Foi considerada a perda de peso corporal de cerca de 20% a 25% dos animais desnutridos como referencial para a realização dos ensaios.

6.5 Obtenção das amostras biológicas

As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção do plexo axilar, em camundongos previamente anestesiados com 10mg/Kg de peso de cloridrato de xilazina (Rompum[®], Bayer) e 100mg/Kg de peso de cloridrato de cetamida (Ketamina[®], Cristália). As amostras de soro foram utilizadas para as dosagens de proteínas totais e albumina sérica e as amostras sanguíneas coletadas com o anticoagulante EDTA 10% foram utilizadas para a realização do hemograma e contagem de reticulócitos.

6.6 Determinação de proteínas totais e albumina plasmática

As amostras de sangue foram obtidas de acordo com o item 6.5. Após a coleta, as amostras foram imediatamente centrifugadas (2000xg durante 20 minutos, a 4°C). O sobrenadante foi congelado em freezer a -40°C, onde permaneceu até a realização da análise. A concentração de proteínas totais séricas foi determinada pelo método do Biureto (GORNAL et al., 1949) e a dosagem de albumina sérica foi avaliada pelo método do Verde de Bromo Cresol (DOUMAS, 1971), sendo utilizado "kits" comerciais da Labtest®. As amostras foram processadas em duplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instrumentals, Inc), em 540nm.

6.7 Aminograma

Conforme item 6.5, amostras de soro foram obtidas e enviadas para o laboratório CBO Análises para processamento das amostras, sendo avaliadas pelo método de HPLC, cromatografia líquida.

6.8 Hemograma e contagem de reticulócitos

As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção do plexo axilar dos camundongos previamente anestesiados, utilizando-se EDTA 10% como anticoagulante. Estas amostras foram utilizadas para a determinação do volume hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem global de hemácias e leucócitos em contador automático ABX VET, HORIBA. Também foram realizadas extensões sangüíneas, posteriormente coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) e analisadas ao microscópio óptico para a contagem diferencial de leucócitos circulantes e análise morfológica. Os reticulócitos foram determinados em extensão sanguínea preparada em até 30 minutos após a coleta, corada pela coloração supra vital com Novo Azul de Metileno (BRECHER, 1949), utilizando-se microscopia óptica convencional.

6.9 Obtenção de células da medula óssea e mielograma

Para a realização do mielograma foram coletadas as células da medula óssea por meio de lavagem da cavidade medular de ambos os fêmures e tíbias dos animais com meio de cultura Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA), após o corte das epífises. O lavado obtido foi utilizado para a realização da contagem de células em câmara de Neubauer e para a realização de lâminas, obtidas após citocentrifugação e posteriormente coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947).

6.10 Avaliação dos processos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo em células totais da medula óssea com marcação de Annexina V- FITC e PI.

A suspensão de células totais obtidas conforme descrito no item 6.9 foi centrifugada por 5 minutos a 300xg, em temperatura de 5°C. Adicionou-se 2 mL de solução de lise (NaCl à 0,2%) por 20 segundos e logo em seguida acrescentou-se (NaCl à 1,6 %) por 20 segundos e após o processo de lise foram adicionados 5mL de meio de cultura Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA). A suspensão foi novamente centrifugada por 5 minutos, 300xg em temperatura de 5°C. Foram separadas 1×10^6 /ml células totais, centrifugadas e lavadas 2 vezes com Tampão (Storage Buffer BD Biosciences) À suspensão adicionou-se 100uL do Tampão(Storage Buffer BD) , 5 µl L de Annexina V e 5 µl de PI –Iodeto de Propídeo (BD Biosciences) e a suspensão incubada por 15 minutos, em temperatura de 20-25°C. Após esse período, foi adicionada à suspensão 400 µl do Tampão (Storage Buffer) e analisada dentro de 1 hora por citometria de fluxo no citometro FACSCANTO II e adquiridos 10.000 eventos. As aquisições foram analisadas e compensadas pelo software FLOW JO. Para controle positivo da apoptose foram separadas 1×10^6 /mL células totais ressuspensas em solução de concentração final de 4-6 µM de camptotecina e incubadas por 4 horas em banho à 37°C. Para controle positivo de necrose foram separadas 1×10^6 /mL células totais ressuspensas em 100 µL de etanol e incubadas por 10 minutos em banho à 37°C.

6.11 Avaliação por citometria de fluxo de caspase 3 nas células da medula óssea

A suspensão de células totais obtidas conforme descrito no item 6.9 foi centrifugada por 5 minutos a 300xg, em temperatura de 5°C. Adicionou-se 2 mL de solução de lise (NaCl à 0,2%) por 20 segundos e logo em seguida acrescentou-se (NaCl à 1,6%) por 20 segundos e após o processo de lise foram adicionados 5mL de meio de cultura Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA). Foram separadas 1×10^6 /ml células totais que foram lavadas e centrifugadas com PBS, pH 7,2 (Solução tampão fosfato contendo 2mM de EDTA; 0,5 % de BSA; 0,01% de azida sódica) e à suspensão adicionou-se 500 µL de BD Cytofix Cytoperm (BD Biosciences) sendo a suspensão incubada por 20 minutos no gelo. Após esse período, o sedimento celular foi aspirado e ressuspense em 1000 µL de Tampão (BD Perm/Wash Buffer) e à suspensão adicionou-se 100 µL da solução Tampão e 20 µl do anticorpo (FITC Rabbit Anti-Active Caspase 3, de coelho) e incubadas por 30 minutos em temperatura de 20-25°C , ao abrigo da luz. A seguir adicionou-se 1 mL da solução tampão(BD Perm/Wash Buffer), A suspensão foi novamente centrifugada e à suspensão adicionado 500 µl da solução Tampão (BD Perm/Wash Buffer), adquiridas 10.000 eventos em citometro de fluxo FACSCANTO II

e analisadas pelo software FLOW JO. Também foram separadas 1×10^6 /mL células totais para controle positivo de apoptose adicionando –se em uma concentração final de 4-6 μ M de camptotecina e incubadas por 4 horas em banho à 37°C.

6.12 Extração de proteínas das células totais da medula óssea

Após a obtenção das células totais da medula óssea como descrito no item 6.9, foi realizada a extração de proteínas celulares. Cada amostra foi lavada uma vez com 1,0 mL de PBS estéril (pH 7,4). Após a lavagem foram adicionados em cada amostra 150 μ L de tampão RIPA® (PIERCE) contendo inibidores de proteases e de fosfatases (50mM de NaF, 10 μ g/mL de Leupeptina, 1mM de PMSF e 10 μ g/mL de Aprotinina). A amostra foi mantida em banho de gelo, sob agitação moderada, durante 30 minutos. Em seguida o sobrenadante foi retirado e centrifugado a 14000xg durante 15 minutos para sedimentação dos *debris* celulares. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e alíquotado e congelado em “freezer” a -40°C até a realização das análises. (dosagem de proteínas totais e realização de “western blotting”).

6.13 Quantificação, por “western blotting”, da proteína Bcl-2

Após a obtenção das proteínas das células totais da medula óssea de acordo com o item 6.9, as amostras foram diluídas em Tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 1M pH 6,8; 0,01% de azul de bromofenol; 10% de SDS; 50% de glicerol e 10% de mercaptoetanol) na proporção de 1 parte de tampão para 4 partes de amostras, e mantido em ebulição durante 5 minutos para a desnaturação. As amostras foram armazenadas em “freezer” -40°C até o momento da análise.

Após a quantificação das proteínas totais utilizando “Kit” comercial (BCA™ protein assay “Kit”, Pierce), foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida docecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando gel de empilhamento a 4% e a 7% para o gel de separação de acordo com o sistema de LAEMMLI (LAEMMLI, 1970). Foi aplicado no gel 30 μ g de proteínas das células totais da medula óssea, bem como o padrão de peso molecular. A eletroforese foi executada a 150V em tampão de corrida pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 0,1% de SDS e água bidestilada) até que as amostras percorressem todo o gel. Imediatamente após a eletroforese foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF (Millipore®), em sistema semi-seco (Amershan®, GE) utilizando tampão de transferência pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 20% de metanol e 0,02% de SDS) a 70mA por 60 minutos. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos e depois lavada com tampão TBS 0,01% de Tween 20 (TBS-Tween). A seguir a membrana foi tratada com tampão de bloqueio, solução de leite a 5%

(TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 5%) por 90 minutos, a temperatura ambiente, e sob constante agitação. Após este período a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween, sob agitação a temperatura ambiente e posteriormente incubada com o anticorpo primário anti-BCL-2 (Cell Signalling, diluição 1:1000) . As diluições foram feitas em solução de leite a 3% (TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 3%). A incubação foi mantida *overnight*, a 4°C e depois a membrana foi novamente lavada da mesma forma descrita anteriormente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário para a proteínas descrita acima (anti-rabbit, BD Biosciences Pharmigen, diluição de 1:2000), por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação. Novamente a membrana foi submetida ao processo de lavagem e prosseguiu-se com a detecção por quimioluminescência utilizando o “kit” de revelação ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham® GE) no equipamento ImageQuant® 400 (GE, Healthcare). A aquisição da imagem e análise foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL. Para a quantificação de Bcl -2 foi utilizada a marcação de β -actina, para normalização.

6.14 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência em células totais da medula óssea.

A suspensão de células totais, obtidas conforme descrito no item 6.9, foi centrifugada por 5 minutos a 300xg, em temperatura de 5°C. Adicionou-se 2 mL de solução de lise (NaCl à 0,2% por 20 segundos e logo em seguida acrescentou-se (NaCl 1,6%) por 20 segundos e após este processo foram adicionados 5mL de meio de cultura Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA). A suspensão foi novamente centrifugada por 5 minutos a 400xg em temperatura de 5°C. Foram separadas 1×10^6 /mL células totais que foram lavadas e centrifugadas com PBS, pH 7,2 (Solução tampão fosfato contendo 2mM de EDTA; 0,5 % de BSA; 0,01 % de azida sódica) e à suspensão adicionou-se 200 μ L de paraformaldeído 4 % sendo a suspensão incubada por 30 minutos em temperatura de 37°C. Após esse período as células foram lavadas e centrifugadas com PBS , pH 7,2 (Solução tampão fosfato contendo 2mM de EDTA; 0,5 % de BSA; 0,01 % de azida sódica), e a suspensão foram adicionadas 100 μ l (PBS + 20 μ l de Hoeschet–H33258 1 mM), a suspensão das células foi centrifugada em lâminas por 2 minutos em 400 rpm e analisadas por microscópio de fluorescência, usando o filtro DAPI para adquirir a imagem do núcleo no aumento de 1000X.

6.15 Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão da identificação de imagens de apoptose e vacúolos autofágicos em células da medula óssea de camundongos.

Fragmentos de esterno (1 mm^2) isentos de tecido muscular e conjuntivo foram imersos em glutaraldeído (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 2% contendo 2,5% de paraformaldeído (recém-preparado) em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), por um período de 6 horas em temperatura ambiente e posteriormente a 4°C por 36 horas. As amostras foram descalcificadas em EDTA a 4,13% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), pH 7,2 por um período de 14 dias e após, foram exaustivamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, e pós-fixada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1M durante duas horas. A seguir, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol-acetona e então incluídas em resina SPURR® (Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, PA, USA) a 70°C por 72 horas. Cortes de $1\text{ }\mu\text{m}$ de espessura foram corados com azul de toluidina e examinados em microscópio óptico para delimitar as regiões da medula óssea adjacentes à região subendosteal e então trimados para cortes ultra-finos. Cortes de (80 nm) foram obtidos com lamina de diamante em ultramicrotomo (Leica Ultracut R ultramicrotome® Leica, Buffalo, NY, USA), colocados em malhas de 200 mesh e tratados com acetato de uranila e então examinados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol, Tokyo, Japan) a 80 kV. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Hematologia Experimental - FCF/USP e no Laboratório Biologia Oral da Faculdade de Odontologia/USP, sob a responsabilidade do Prof.Dr.Vitor E. Arana-Chavez.

6.16 Avaliação da cinética da apoptose *in vitro*

As células da medula óssea foram obtidas por lavagem da cavidade medular conforme item 6.9 com meio Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA) suplementado com 10% soro bovino fetal. As células foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) em placas não aderentes de 24 poços e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Logo em seguida, realizamos uma cinética de tempo de 0, 2, 6, 12 e 24 horas nas células estimuladas com camptotecina $6\text{ }\mu\text{M}$ e também avaliamos as células não estimuladas. Após o tempo estimado, a suspensão de células totais obtidas foi centrifugada por 5 minutos a 300xg, em temperatura de 5°C . Adicionou-se 2 mL de solução de lise (NaCl à 0,2%) por 20 segundos e logo em seguida acrescentou-se (NaCl à 1,6%) por 20 segundos e após este processo foram adicionados 5mL de meio de cultura Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA). A suspensão foi novamente

centrifugada por 5 minutos, 300xg em temperatura de 5°C. Foram separadas 1×10^6 /mL células totais, centrifugadas e lavadas 2 vezes com Tampão (Storage Buffer BD Biosciences). À suspensão adicionou-se 100uL do Tampão (Storage Buffer BD), 5 µl L de Annexina V e 5 µl de PI –Iodeto de Propídeo (BD Biosciences). A suspensão incubada por 15 minutos, em temperatura de 20-25°C. Após esse período, foi adicionada à suspensão 400 µl do Tampão (Storage Buffer) e analisada dentro de 1 hora por citometria de fluxo no citometro FACSCANTO II utilizando-se íon argônio. As aquisições foram analisadas e compensadas pelo software FLOW JO. Para controle positivo da apoptose foram separadas 1×10^6 /ml células totais ressuspensas em solução de concentração final 6 µM de camptotecina e incubadas por 4 horas em estufa à 37°C . Para controle positivo de necrose foram separadas 1×10^6 /ml células totais ressuspensas em 100 µL de etanol e incubadas por 10 minutos em estufa a 37°C.

6.17 Avaliação da autofagia por citometria de fluxo em células totais da medula óssea utilizando Cyto-ID Autophagy Detection Kit Enzo Life.

A suspensão de células totais obtidas conforme descrito no item 6.9 foi centrifugada por 5 minutos a 400xg, em temperatura de 5°C. Adicionou-se 2 mL de solução de lise (NaCl à 0,2 %) por 20 segundos e logo em seguida acrescentando (NaCl à 1,6 %) por 20 segundos e após este processo foram adicionados 5mL de meio de cultura Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA). A suspensão foi novamente centrifugada por 5 minutos a 400xg em temperatura de 5°C. Foram separadas 1×10^6 /ml células totais que foram lavadas e centrifugadas com Tampão (Cyto-ID Autophagy Detection Kit Enzo Life) e à suspensão adicionou-se 1 µl (Cyto-ID Green Detection Enzo Life) diluído em volume final de 4 ml no Tampão (Cyto-ID Autophagy Detection Kit Enzo Life) sendo a suspensão incubada por 30 minutos em temperatura de 20-25°C , ao abrigo da luz e analisada por citometria de fluxo em citometro FACS CANTO II e analisadas pelo software FLOW JO analisando sua expressão no valor em mediana. Também foram separadas 1×10^6 /ml células totais para controle positivo de autofagia adicionando –se em uma concentração final de 20 µM de Tamoxifen (Cyto-ID Autophagy Detection Kit Enzo Life) e incubadas por 24 horas em estufa de 37° C.

6.18 Quantificação, por “western blotting”, de proteínas envolvidas na via de sinalização de Akt total, p-Akt, mTOR Total, p-mTOR ser 2448, p-mTOR ser 2481, Rictor, Raptor e Gβ1 das células totais da medula óssea.

Após a obtenção das proteínas das células totais da medula óssea de acordo com o item 6.9, as amostras foram diluídas em Tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 1M pH 6,8; 0,01% de azul de bromofenol; 10% de SDS; 50% de glicerol e 10% de mercaptoetanol) na proporção de 1 parte de tampão para 4 partes de amostras, e mantido em ebulição durante 5 minutos para a desnaturação. As amostras foram armazenadas em “freezer” -40°C até o momento da análise.

Após a quantificação das proteínas totais utilizando “Kit” comercial (BCATM protein assay “Kit”, Pierce), foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida doceil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando gel de empilhamento a 4% e a 7% para o gel de separação de acordo com o sistema de LAEMMLI (LAEMMLI, 1970). Foi aplicado no gel 30µg de proteínas das células totais da medula óssea, bem como o padrão de peso molecular. A eletroforese foi executada a 150V em tampão de corrida pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 0,1% de SDS e água bidestilada) até que as amostras percorressem todo o gel. Imediatamente após, a eletroforese foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF (Millipore®), em sistema semi-seco (Amershan®, GE) utilizando tampão de transferência pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 20% de metanol e 0,02% de SDS) a 70mA por 60 minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos e depois lavada com tampão TBS 0,01% de Tween 20 (TBS-Tween). A seguir, a membrana foi tratada com tampão de bloqueio, solução de leite a 5% (TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 5%) por 60 minutos a temperatura ambiente e sob constante agitação. Após este período, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween, sob agitação a temperatura ambiente e posteriormente incubada com o anticorpo primário anti-Akt total (BD Biosciences diluição 1:1000), anti-Akt pS472/pS473 de camundongo (BD Biosciences diluição 1:1000), anti-mTOR total, de coelho (Cell Signalling diluição 1:1000), anti-p-mTOR ser 2448, de coelho (Cell Signalling diluição 1:1000), anti-p-mTOR ser 2481 (Cell Signalling diluição 1:1000), anti-Rictor, de coelho (Cell Signalling diluição 1:1000), anti-Raptor, de coelho (Cell Signalling diluição 1:1000) e, ou anti-Gβ1, de coelho (Cell Signalling diluição 1:1000). Para as proteínas Akt e mTOR tanto na fração total ou fosforilada as diluições foram feitas em solução de leite a 3% (TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 3%) e para as proteínas Rictor, Raptor e Gβ1 as diluições foram feitas

em solução de BSA a 5% (TBS-Tween e BSA Sigma Aldrich® a 5%). A incubação foi mantida *overnight*, a 4°C e depois a membrana foi novamente lavada da mesma forma descrita anteriormente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário para a proteína Akt e p-Akt (anti-mouse IgG de camundongo conjugado com peroxidase, BD Biosciences Pharmingen, diluição de 1:5000), e para as demais proteínas descritas acima (anti-rabbit, Cell Signalling, diluição de 1:2000) por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação. Novamente a membrana foi submetida ao processo de lavagem e prosseguiu-se com a detecção por quimioluminescência utilizando o “kit” de revelação ECL (ECL Advanced Western Blotting Detection Reagents, Amersham® GE) no equipamento ImageQuant® 400 (GE, Healthcare). A aquisição da imagem e análise foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL. Para a quantificação das proteínas acima foi utilizada a marcação de β -actina, exceto para a proteína G β l que foi utilizada a marcação de α -tubulina, para normalização.

6.19 Quantificação, por “western blotting”, da proteína Beclin envolvida na via de sinalização da e autofagia das células totais da medula óssea.

Após a obtenção das proteínas das células totais da medula óssea de acordo com o item 6.9, as amostras foram diluídas em Tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 1M pH 6,8; 0,01% de azul de bromofenol; 10% de SDS; 50% de glicerol e 10% de mercaptoetanol) na proporção de 1 parte de tampão para 4 partes de amostras, e mantidas em ebulição durante 5 minutos para a desnaturação. As amostras foram armazenadas em “freezer” -40°C até o momento da análise.

Após a quantificação das proteínas totais utilizando Kit comercial (BCA™ protein assay “Kit”, Pierce), foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida docecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando gel de empilhamento a 4% e a 7% para o gel de separação de acordo com o sistema de LAEMMLI (LAEMMLI, 1970). Foi aplicado no gel 30 μ g de proteínas das células totais da medula óssea, bem como o padrão de peso molecular. A eletroforese foi executada a 150V em tampão de corrida pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 0,1% de SDS e água bidestilada) até que as amostras percorressem todo o gel. Imediatamente após a eletroforese foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF (Millipore®), em sistema semi-seco (Amersham®, GE) utilizando tampão de transferência pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 20% de metanol e 0,02% de SDS) a 70mA por 60 minutos. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos e depois lavada com tampão TBS 0,01% de Tween 20 (TBS-Tween). A seguir a membrana foi

tratada com tampão de bloqueio, solução de leite a 5% (TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 5%) por 90 minutos a temperatura ambiente e sob constante agitação. Após este período a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween, sob agitação a temperatura ambiente e posteriormente incubada com o anticorpo primário anti-Beclin (Cell Signalling diluição 1:1000). As diluições foram feitas em solução de leite a 3% (TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 3%). A incubação foi mantida *overnight*, a 4°C e depois a membrana foi novamente lavada da mesma forma descrita anteriormente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário para a proteínas descrita acima (anti-rabbit, Cell Signalling, diluição de 1:2000), por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação. Novamente a membrana foi submetida ao processo de lavagem e prosseguiu-se com a detecção por quimioluminescência utilizando o “kit” de revelação ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham® GE) no equipamento ImageQuant® 400 (GE, Healthcare). A aquisição da imagem e análise foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL. Para a quantificação do Beclin foi utilizada a marcação de β -actina, para normalização.

6.20 Quantificação, por “western blotting”, da proteína LC3B envolvida na via de sinalização da autofagia das células totais da medula óssea.

Após a obtenção das proteínas das células totais da medula óssea de acordo com o item 6.9, as amostras foram diluídas em Tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 1M pH 6,8; 0,01% de azul de bromofenol; 10% de SDS; 50% de glicerol e 10% de mercaptoetanol) na proporção de 1 parte de tampão para 4 partes de amostras, e mantido em ebulição durante 5 minutos para a desnaturação. As amostras foram armazenadas em “freezer” -40°C até o momento da análise.

Após a quantificação das proteínas totais utilizando Kit comercial (BCA™ protein assay “Kit”, Pierce), foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida doceíl sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando gel gradiente 4 e 20%. Foi aplicado no gel 30µg de proteínas das células totais da medula óssea, bem como o padrão de peso molecular. A eletroforese foi executada a 100V em tampão de corrida pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 0,1% de SDS e água bidestilada) até que as amostras percorressem todo o gel. Imediatamente após a eletroforese foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF (Millipore®), em sistema molhado (Biorad®) utilizando tampão de transferência pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 20% de metanol e 0,02% de SDS) a 70mA por 60 minutos. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos e depois lavada com tampão TBS 0,01% de Tween 20 (TBS-Tween). A seguir a membrana foi tratada

com tampão de bloqueio, solução de leite a 5% (TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 5%) por 60 minutos a temperatura ambiente e sob constante agitação. Após este período a membrana foi lavada 3 vezes com tampão TBS-Tween, sob agitação a temperatura ambiente e posteriormente incubada com o anticorpo primário anti-LC3B, de coelho (Cell Signalling diluição 1:1000). As diluições foram feitas em solução de leite a 3% (TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 3%). A incubação foi mantida *overnight*, a 4°C e depois a membrana foi novamente lavada da mesma forma descrita anteriormente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-rabbit, Cell Signalling, diluição de 1:5000), por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação. Novamente a membrana foi submetida ao processo de lavagem e prosseguiu-se com a detecção por quimioluminescência utilizando o “kit” de revelação ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham® GE) no equipamento ImageQuant® 400 (GE, Healthcare). A aquisição da imagem e análise foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL. Para a quantificação do LC3B foi utilizada a marcação de LC3II, conforme (TANIDA , UENO, KOMINAMI, 2008) para normalização, mas também foram marcadas com β -actina para validação do método.

6.21 Avaliação da autofagia por microscopia de fluorescência em células totais da medula óssea pela técnica de laranja de acridina.

A suspensão de células totais obtidas conforme descrito no item 6.9 foi centrifugada por 5 minutos a 300xg, em temperatura de 5°C. Adicionou-se 2 mL de solução de lise (NaCl à 0,2%) por 20 segundos e logo em seguida acrescentou-se (NaCl à 1,6%) por 20 segundos e após este processo foram adicionados 5mL de meio de cultura Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA). A suspensão foi novamente centrifugada por 5 minutos a 400xg em temperatura de 5°C. Foram separadas 1×10^6 /mL células totais que foram lavadas e centrifugadas com PBS, pH 7,2 (Solução tampão fosfato contendo 2mM de EDTA; 0,5 % de BSA; 0,01 % de azida sódica) e à suspensão adicionou-se uma concentração de 1 μ g/mL de laranja de acridina por 15 minutos à temperatura ambiente ao abrigo da luz e logo em seguida, analisadas por microscópio de fluorescência com em uma objetiva de 100x. Utilizou-se o filtro FITC com fluorescência verde para analisar citoplasma e núcleo e fluorescência vermelha para observar os compartimentos ácidos das células. .

6.22 Avaliação da cinética da autofagia *in vitro*

As células da medula óssea foram obtidas por lavagem da cavidade medular conforme item 6.9 com meio Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA). suplementado com 10% soro bovino fetal. As células foram plaqueadas (1×10^6 células/poço) em placas não aderentes de 24 poços e mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, logo em seguida, realizamos uma cinética de tempo de 0, 2, 6, 12 e 24 horas nas células estimuladas com camptotecina 6 µM e também avaliamos as células não estimuladas. Após o tempo estimado, a suspensão de células totais obtidas foi centrifugada por 5 minutos a 300xg, em temperatura de 5°C. Adicionou-se 2 mL de solução de lise (NaCl à 0,2%) por 20 segundos e logo em seguida acrescentando (NaCl à 1,6%) por 20 segundos e após este processo foram adicionados 5mL de meio de cultura Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA). A suspensão foi novamente centrifugada por 5 minutos a 400xg em temperatura de 5°C. Foram separadas 1×10^6 /mL células totais que foram lavadas e centrifugadas com Tampão Cyto-ID Autophagy Detection Kit Enzo Life e à suspensão adicionou-se 1 µL de Cyto-ID Green Detection Enzo Life diluído em volume final de 4 mL no Tampão Cyto-ID Autophagy Detection Kit Enzo Life. A suspensão incubada por 30 minutos em temperatura de 20-25°C, ao abrigo da luz e analisada por citometria de fluxo em citometro FACSCANTO II utilizando-se laser de íon argônio, comprimento de onda de 488nm e analisadas pelo software FLOW JO. Também foram separadas 1×10^6 /mL células totais para controle positivo de autofagia adicionando –se em uma concentração final de 20 µM de Tamoxifen (Cyto-ID Autophagy Detection Kit Enzo Life) e incubadas por 24 horas em estufa de 37° C.

7.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados foram submetidos ao teste de distribuição Gaussiana seguido do teste “t”. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O programa utilizado foi GraphPad Prism 5®.

8.0 RESULTADOS

8.1 Determinação da concentração protéica das rações

A determinação da concentração protéica das rações controle e hipoprotéica consumidas pelos animais foi realizada pelo método de micro-Kjedahl. A ração controle apresentou $12,71 \pm 0,57\%$ (n=6) enquanto a ração desnutrida apresentou $2,85 \pm 0,41\%$ *** (n=6) de proteína.

*** $p < 0,001$ quando comparado a ração hipoprotéica com a ração controle.

8.2 Avaliações do estado nutricional

O peso corpóreo e o consumo de água e ração de cada animal foram monitorados a cada 48 horas verificando-se que os animais do grupo desnutrido tiveram aumento significativo no consumo de água (figura 6A), mas não de ração (figura 6B), respectivamente quando comparado aos animais do grupo controle. No entanto o consumo de proteína do grupo desnutrido foi significativamente menor em relação ao grupo controle, uma vez que a ração hipoproteica oferecida ao grupo desnutrido possui apenas 2% de proteína (figura 6C) Verificou-se que os animais do grupo desnutrido apresentaram perda significativa do peso corporal em relação ao grupo controle, $-20,90 \pm 1.60\%$ (média $\pm$ desvio padrão), enquanto que os animais do grupo controle tiveram ganho de peso de $10.39 \pm 1.60\%$ (média $\pm$ desvio padrão), durante o período do ensaio.(figuras 7A e 7B).

As concentrações séricas de proteínas totais e a albumina dos animais do grupo desnutrido foram significativamente menores em relação à dos animais do grupo controle (figuras 8A e 8B).

Figura 6: Consumo de água, ração e proteína (A): Consumo de água (ml/dia) do grupo controle (n= 14) e do grupo desnutrido (n=14). (B): Consumo de ração (g/dia) dos animais do grupo controle (n=14) e do grupo desnutrido (n=14). (C): Consumo de proteína (g/dia) dos animais do grupo controle (n=14) e do grupo desnutrido (n=14).. Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *** p < 0, 0001 quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

Figura 7: (A): Variação do peso corporal durante o período de 5 semanas de indução à desnutrição de animais do grupo controle (n=16) e de animais do grupo desnutrido (n=16). (B): Porcentagem da variação do peso corporal durante o período de 5 semanas de indução à desnutrição de animais do grupo controle (n=6) e de animais do grupo desnutrido (n=6). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

*** $p < 0,001$ quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

Figura 8: (A) Concentração plasmática das proteínas totais (g/dL) e (B) albumina (g/dL), dos animais do grupo controle (n=15) e dos animais do grupo desnutrido (n=15). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. ** $p < 0,001$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

8.3 AMINOGRAMA

Foram avaliados 20 tipos diferentes de aminoácidos, (tabela 4), presentes no plasma. O aminoácido alanina apresentou-se significativamente elevado no plasma de animais do grupo desnutrido quando comparado aos animais do grupo controle. Por outro lado, os aminoácidos Isoleucina, Lisina, Metionina, Valina, Serina e Taurina apresentaram redução significativa no plasma de animais do grupo desnutrido em relação ao controle.

Tabela 4: Aminograma

Aminoácidos (mg/Kg)	Controle (N=5)	Desnutrido (N= 3)
Glutamina	57.17 ± 3.200	59.64 ± 0.9602
Alanina	31.01 ± 1.253	40.86 ± 0.7625 **
Arginina	13.24 ± 1.132	15.86 ± 1.543
Asparagina	3.684 ± 0.3084	3.500 ± 0.1929
Ac. Aspártico	1.914 ± 0.5396	1.267 ± 0.2697
Glicina	12.03 ± 0.7121	12.67 ± 0.2452
Isoleucina	8.738 ± 0.5987	6.637 ± 0.2887 *
Leucina	14.10 ± 1.304	10.83 ± 0.5736
Ac. Glutâmico	7.998 ± 1.219	7.510 ± 1.051
Lisina	35.05 ± 1.410	26.05 ± 1.484 **
Cistina	16.68 ± 0.6142	15.67 ± 0.1856
Metionina	6.502 ± 0.4651	4.523 ± 0.3096 *
Fenilalanina	9.040 ± 0.5400	7.490 ± 0.4350
Tirosina	12.62 ± 1.158	8.653 ± 1.165
Treonina	15.21 ± 0.9833	13.27 ± 2.102
Prolina	10.68 ± 0.4684	11.89 ± 0.4605
Valina	17.86 ± 1.050	11.03 ± 0.1782 **
Histidina	9.878 ± 0.5658	10.65 ± 0.1717
Serina	11.11 ± 0.7468	16.29 ± 0.5607 **
Taurina	70.50 ± 9.662	38.26 ± 5.864 *

Tabela 4: Valores dos aminoácidos dos animais dos grupos controle (n=5) e animais do grupo desnutrido (n=3). Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. O **n** indica o número de animais utilizados no experimento.

*p<0,05 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

** p < 0, 001 quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

8.4. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

8.4.1 Eritrograma

A avaliação do quadro eritrocitário revelou que os animais desnutridos apresentaram redução significativa nos parâmetros eritrocitários e reticulopenia quando comparada aos animais do grupo controle, caracterizando um quadro de anemia (Tabela 5). Quanto aos índices hematimétricos não houve diferença entre os grupos controle e desnutrido com exceção apenas do VCM (volume corpuscular médio).

8.4.2 Leucograma

Os animais do grupo desnutrido apresentaram leucopenia significativa quando comparado aos animais do grupo controle. Verificou-se linfocitopenia significativa nos animais do grupo desnutrido em relação ao grupo controle, porém o número absoluto de neutrófilos e eosinófilos permaneceram inalterados tanto nos animais do grupo controle quanto nos animais do grupo desnutrido. Monócitos e basófilos foram raramente encontrados nos animais de ambos os grupos (Tabela 6).

Tabela 5: Parâmetros da série eritrocitária

Parâmetros	Grupo Controle (N=5)	Grupo Desnutrido (N=10)
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$9,56 \pm 0,16$	$7,12 \pm 0,20^{***}$
Hemoglobina (g/dL)	$12,96 \pm 0,38$	$9,45 \pm 0,27^{***}$
Volume Hematócrito (%)	$38,50 \pm 1,60$	$28,48 \pm 1,15^{***}$
VCM (fL)	$43,80 \pm 0,20$	$41,70 \pm 0,15^{***}$
CHCM (%)	$34,80 \pm 1,04$	$32,59 \pm 0,53$
HCM (pg)	$14,48 \pm 0,49$	$14,46 \pm 0,33$
Reticulócitos (%)	$4,08 \pm 0,20$	$3,15 \pm 0,16^{**}$

Tabela 5: Valores do número de hemácias, concentração de hemoglobina, volume hematócrito, dos animais do grupo controle (N=10) e desnutrido (N=10), dos parâmetros hematológicos da série eritróide. Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

***p<0,0001 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

Tabela 6: Resultados do número total de leucócitos e das diferentes populações leucocitárias (neutrófilos segmentados, linfócitos, eosinófilos e neutrófilos)

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Desnutrido
Leucócitos ($/\text{mm}^3$)	$2973 \pm 0,3$	$1874 \pm 0,2^{***}$
Neutrófilos Segmentados ($/\text{mm}^3$)	$335,2 \pm 46,1$	$305,2 \pm 79,4$
Linfócitos ($/\text{mm}^3$)	$2264 \pm 169,3$	$1531 \pm 177,8^{**}$
Eosinófilos ($/\text{mm}^3$)	$1,68 \pm 0,46$	$1,43 \pm 0,32$

Tabela 6: Valores do número total de leucócitos e de neutrófilos segmentados, linfócitos e eosinófilos expressos em células/ mm^3 , do sangue de animais dos grupos controle (n=11) e animais do grupo desnutrido (n=19). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. **p<0,001 e *** p < 0, 0001 quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

8.4.3. Células Totais da Medula Óssea

Conforme verificamos na figura 9 a medula óssea dos animais desnutridos apresentou-se hipoplásica uma vez que animais do grupo desnutrido tiveram menor número de células nucleadas quando comparados aos animais do grupo controle. A análise diferencial demonstrou redução significativa de células das linhagens granulocíticas e eritróide (tabela 7).

Figura 9: Número total de células nucleadas da medula óssea dos animais do grupo controle (n=10) e dos animais do grupo desnutrido (n=10). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. ***p<0,0001 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

Tabela 07: Resultado das diferentes populações presentes na medula óssea

Parâmetros	CONTROLE (x10 ⁶ mm ³) N=5	Desnutrido (x10 ⁶ mm ³) N=5
Mieloblastos	0,6 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1
Formas jovens	0,9 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,1 *
Formas em anel	2,0 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1 *
Neutrófilos segmentados	23,4 $\pm$ 0,6	18,4 $\pm$ 0,9*
Eosinófilos	0,4 $\pm$ 0,08	0,4 $\pm$ 0,07
Linfócitos	10,2 $\pm$ 1,0	7,9 $\pm$ 0,7 *
Monócitos/Macrófagos	0,08 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,04
Eritroblasto basófilo	0,9 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,06
Eritroblasto policromático	4,2 $\pm$ 0,42	2,8 $\pm$ 0,4*
Eritroblasto Ortocromático	7,4 $\pm$ 1,5	5,1 $\pm$ 0,6*
Plasmócitos	0,10 $\pm$ 0,04	0,08 $\pm$ 0,11
Linhagem Megacariocítica	0,9 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,2 *
Relação Granulo/Eritróide	3,1 $\pm$,020	2,1 $\pm$ 0,3*
Relação Linfo/Eritroide	1,0 $\pm$ 0,19	1,2 $\pm$ 0,1

Tabela 07: Resultado das diferentes populações da medula óssea dos animais do grupo controle (n=5) e dos animais do grupo desnutrido (n=5). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *p<0,05 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

RESULTADOS DE APOPTOSE E NECROSE

8.5 Avaliação dos processos apoptóticos e necróticos por citometria de fluxo em células totais da medula óssea

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com Annexina V e PI para avaliação dos processos apoptóticos e, ou necróticos. (Figuras 10C e 10D, respectivamente e figuras 11A, 11B e 11C), não tendo sido observada diferença significativa entre os grupos. Nas figuras 10A e 10B podem ser vistos os controles positivos do experimento (apoptose e necrose, respectivamente).

Figura 10: Figura de um experimento representativo da avaliação da apoptose através da marcação com Annexina V (FITC) e PI (PE) de células totais da medula óssea de animais controle e desnutrido. Não houve diferenças significativas.

Figura 11: Gráficos da avaliação da apoptose e necrose por citometria de fluxo . **(A):** Annexina V (C: 12.92 ± 2.336 , n=10; D: 11.48 ± 1.966 , n=10) **(B):** Annexina V e PI (C: 32.39 ± 4.130 , n=10; D: 43.76 ± 4.617 n=10); **(C):** PI (C: 0.4274 ± 0.08397 , n= 10; D: 0.8143 ± 0.2173 , n = 10). Os resultados estão expressos em média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

8.6 Avaliação da caspase 3 por citometria de fluxo, em células totais da medula óssea.

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas para caspase 3 para avaliação dos processos apoptóticos (figuras 12B e 12 C , respectivamente figura 13), não tendo sido observada diferença significativa entre os grupos. Na figura 12A, pode ser visto o controle positivo do experimento.

Figura 12: Figura de um experimento representativo para avaliação da caspase 3 de células totais da medula óssea de animais controle e desnutrido. Não houve diferenças significativas.

Figura 13 : Gráfico da avaliação da caspase 3 por citometria de fluxo). O grupo controle apresentou o valor de 4.86 ± 1.17 ($n = 10$) e o grupo desnutrido: 5.21 ± 0.92 , ($n = 10$). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

8.7 Quantificação, por western blotting, da proteína Bcl-2

Não houve diferença significativa da proteína Bcl-2 (Figura 14) nas células totais da medula de animais desnutridos, ao se comparar-se com as células totais dos animais controles.

Figura 14: Gráfico da avaliação da proteína Bcl-2. O grupo controle apresentou o valor de 45.57 ± 7.86 (n = 7) e o grupo desnutrido: 52.27 ± 9.11 (n = 7). Os resultados estão expressos por média ± desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

8.8 Avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência em células totais da medula óssea.

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com Hoeschet – H33258 1 mM (figuras 15 A e 15 B , respectivamente figura 16), não houve diferença significativa entre os grupos.

Figura 15: Marcação com Hoeschet 33258 1mM de células totais da medula óssea de animais desnutrido e controle. Seta vermelha indicando célula com cromatina em fase de condensação, seta amarela indicando célula com núcleo picnótico e seta verde indicando célula viável. Não houve diferenças significativas entre os animais desnutridos comparados aos animais controle. Aumento de 1.000 x.

Figura 16: Gráfico da avaliação da apoptose por microscopia de fluorescência. Os resultados estão expressos Two-way ANOVA. (Controle e Desnutrido n=3) . O n indica o número de animais utilizados no experimento.

8.9 Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão da identificação de imagens de apoptose e vacúolos autofágicos em células da medula óssea de camundongos.

Cortes de (80 nm) de esternos de camundongos desnutridos foram contrastados com acetato de uranila e então examinados em microscópio eletrônico de transmissão. Na figura 17 A observamos na seta em vermelho, célula em processo de apoptose com fragmentação nuclear abaixo do endósteo, na figura 17 B observamos características da morfologia ultraestrutural da autofagia, com presença de dupla membrana, caracterizando-se em um autofagossomo na região medular. Na figura 17 C observamos na seta vermelha típicos vacúolos autofágicos com estágios de degradação e na seta amarela observa-se possivelmente um fagofóro membrana delimitante que está envolvido no alongamento e formação do autofagossomo na região medular.

Figura 17: Microscopia eletrônica de transmissão exibindo uma região da medula óssea esternal. Contraste acetato de uranila. Figuras A, B e C aumento de 30.000 x. Corte representativo de 1 animal do grupo desnutrido.

8.10 Avaliação da cinética da apoptose *in vitro*

As células da medula óssea foram plaqueadas em poços de 24 wells sendo que tanto as células do animal controle e do animal desnutrido receberam estímulo apoptótico- 6 μ m de camptotecina em uma cinética de 0 , 2, 6, 12 e 24 horas. Também foram avaliadas as mesmas células em uma cinética no mesmo período acima em células não estimuladas (figura 19) . Na figura 18 pode ser visto o gráfico da avaliação da cinética, sendo observado na figura 19 A que células oriundas animal desnutrido com estímulo *in vitro* em 12 horas teve um aumento significativo em relação a 0 horas , assim como células de animal controle e desnutrido não estimulados apresentaram um aumento em 24 horas em relação a 0 horas; na figura 19 C as células de animal desnutrido estimulado apresentaram após 12 horas aumento significativo da apoptose tardia em relação ao controle estimulado. Na figura 19 B observa-se que as tanto as células dos animais desnutridos e dos animais controle , estimulados , apresentaram aumento significativo da necrose em 2 e 24 horas , mas não houve diferenças significativas entre os grupos . Observamos também que no período de 24 horas as células de animais desnutridos e controles estimulados há uma diminuição de células em processo de apoptose inicial (figura 19 A), porém há um aumento evidente de células em processo necrótico (figura 19 B) e células em processo de apoptose tardio (figura 19 C) em 24 horas , mostrando que o estímulo é mais relevante durante esse período na cinética.

Figura 18: Figura de um experimento representativo avaliação da apoptose com marcação com Annexina V (FITC) e PI (PE) de células totais da medula óssea de animais controle e desnutrido para avaliação da cinética em 0, 2, 6, 12 e 24 horas estimulados e não estimulados.

Figura 19: Cinética da avaliação da apoptose e necrose por citometria de fluxo . (A): Annexina V (B): PI (C): Annexina V. n= 6 controle , n=6 desnutridos. Os resultados estão expressos Two-way ANOVA ** $p > 0,001$ *** $p > 0,0001$

RESULTADOS AUTOFAGIA

8.11 Avaliação da autofagia por citometria de fluxo em células totais da medula óssea utilizando Cyto-ID Autophagy Detection Kit Enzo Life .

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com Cyto-ID Green para avaliação do LC3 (figuras 20, respectivamente figura 21) . Na figura 20 pode ser visto o controle positivo do experimento. A quantidade de LC3 apresentou-se significativamente aumentada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle.

Figura 20: Figura de um experimento representativo da avaliação de LC3 –FITC de células totais da medula óssea de animais controle e desnutrido. Houve um aumento significativo no animal controle em relação ao desnutrido. Amostra 86 C= Animal Controle e amostra 74 D = Animal Desnutrido. Nesse experimento foram utilizados N=6 para os animais controle e n= 6 para animais desnutridos.

Figura 21: Resultados da determinação do LC3: (C: 32.37 ± 4.714 n=6; D: 48.90 ± 5.020 n=6). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *p<0,05 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

8.12 Quantificação, por western blotting, de proteínas envolvidas na via de sinalização de Akt total, p-Akt ,mTOR Total ,p-mTOR ser 2448 , p-mTOR ser 2481 , Rictor, Raptor e Gβ1 das células totais da medula óssea.

Não houve diferença significativa do Akt total (figura 22 A) nas células totais da medula de animais desnutridos, ao se comparar-se com as células totais dos animais controles. Já a quantidade de p-Akt (figura 22 B) foi significativamente menor nas células totais da medula óssea de animais desnutridos quando comparada aos animais do grupo controle. A quantidade de mTOR total apresentou-se significativamente aumentada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle (figura 23 A), Já a quantidade de p-mTOR ser 2448 e p-mTOR ser 2481 apresentou redução significativa nas células de animais desnutridos em relação ao animais do grupo controle (figuras 23 B e 23 C).

A quantidade de Raptor apresentou-se significativamente aumentada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle

(figura 24 A), Já a quantidade de Rictor e G β 1 apresentou redução significativa nas células de animais desnutridos em relação ao animais do grupo controle (Figuras 24 B e 24 C).

Figura 22: Resultados da determinação de Akt Total (figura 22 A) : (C: 51.65 ± 12.92 N=5; D: 41.27 ± 9.837 N=5) p-Akt (figura 22 B): (C: 63.85 ± 4.637 , n=6; D: 45.42 ± 7.519 , n=6). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

Figura 23: Resultados da determinação de mTOR Total (figura 23 A): (C: 59.23 ± 2.281 , n = 5; D: 81.98 ± 3.662 , n = 5.), p-mTOR ser 2448 (figura 23 B) : (C: 72.13 ± 11.45 N=7; D: 34.81 ± 9.456 N=7) e p-mTOR ser 2481 (figura 23 C): (C: 1.23 ± 0.172 N=7 ; D: 0.68 ± 0.092 N=7). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

Figura 24: Resultados da determinação de Raptor (figura 24 A): (C: 0.56 ± 0.218 n=5; D: 1.12 ± 0.100 n=5), Rictor (figura 24 B): (C: 1.35 ± 0.209 n=5 ; D: 0.62 ± 0.182 n= 5) e Gbl (figura 24 C): (C: 0.78 ± 0.135 n=6 ; D: 0.29 ± 0.088 n=6) Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

8.13 Quantificação, por western blotting, da proteína Beclin envolvida na via de sinalização da apoptose e autofagia das células totais da medula óssea.

A quantidade de Beclin apresentou-se significativamente aumentada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle (Figura 25).

Figura 25: Resultados da determinação de Beclin: (C: 4.07 ± 0.640 n=5; D: 10.63 ± 1.766 n=5). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

8.13 Quantificação, por western blotting, da proteína LC3B envolvida na via de sinalização da autofagia das células totais da medula óssea.

Durante a formação do autofagossomo há uma lipidação da proteína LC3 ,por isso podemos observar por western blotting as duas isoformas desta proteína , portanto quando há um aumento na expressão de LC3 II , significa que as células estão em processo autofágico

(Mizushima , Yoshimori , 2007). A quantidade de LC3II apresentou-se significativamente aumentada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle (figura 26 B), porém a quantidade de LC3 I (isoforma não lipídada desta proteína) apresentou-se significativamente aumentada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle (figura 26 A), que estaria levando aumento da proteína LC3 II.

Figura 26: Resultados da determinação do LC3 I (figura 26 A): (C: 1.43 ± 0.159 n=5; D: 2.89 ± 0.325 n= 5) e LC3II (Figura 26 B): (C: 45.60 ± 10.67 n=6; D: 74.92 ± 5.741 n=6). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *p<0,05 e **p<0,001 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

8.14 Avaliação da autofagia por microscopia de fluorescência em células totais da medula óssea.

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com Laranja de Acridina - 1 ug/ml , para verificação de vacúolos autofágicos , pois a Laranja de acridina é um corante que tem afinidade com os compartimentos ácidos da célula , ou seja, quando acontece o processo de fusão entre o autofagossomo e o lisossomo o ph varia entre 4 a 5,5 na célula . Como podemos observar na figura 27 A o citoplasma e núcleo das células animal controle e na figura 27 B não há presença de compartimentos ácidos , já na figuras 28 A e 28 C observamos citoplasma e núcleo respectivamente , e nas figuras 28 B e 28 D nas células do animal desnutrido, observamos a presença desses compartimentos ácidos , indicando a presença de vacúolos autofágicos . Este experimento somente foi realizado somente para análise qualitativa.

A

B

Figura 27: Marcação com laranja de acridina 1ug/ml de células totais da medula óssea de animais controle. Figura 27 A observamos na fluorescência verde citoplasma e núcleo, na figura 27 B não observamos os componentes ácidos na célula dos animais controle. Aumento de 1.000 x.

A

B

C

D

Figura 28: Marcação com laranja de acridina 1ug/ml de células totais da medula óssea de animais controle. Figura 28 A e Figura 28 C observamos na fluorescência verde citoplasma e núcleo das células da medula óssea, na figura 28 B e 28 D observamos os componentes ácidos nas células dos animais desnutridos. Aumento de 1.000 x.

8.16 Avaliação da cinética da autofagia “in vitro”.

As células da medula óssea foram plaqueadas em poços de 24 wells sendo que tanto as células do animal controle e do animal desnutrido receberam estímulo autofágico- 20µm de tamoxifeno em uma cinética de 0 , 2, 6, 18 e 24 horas, também foram avaliadas as mesmas células em uma cinética no mesmo período acima em células não estimuladas (figura 29) . Na figura 30, pode ser visto o gráfico da avaliação da cinética , sendo que há um aumento significativo nos animais desnutridos em 0 horas em relação ao controle , há um aumento significativo nos animais desnutridos não estimulados em 18 horas em relação ao controle não estimulado e há uma diminuição nos animais desnutridos não estimulados em relação ao controle não estimulado em 24 horas .

Figura 29: Figura de um experimento representativo da avaliação da autofagia através da marcação com LC3 (Green) para avaliação da cinética em animais desnutridos e controles estimulados e não estimulados em 0, 2, 6, 18 e 24 horas.

Figura 30: Cinética da avaliação da autofagia. n= 6 controle, n=6 desnutridos. Os resultados estão expressos Two-way ANOVA ** $p < 0,001$ *** $p < 0,0001$

9. Discussão

Neste modelo de desnutrição as rações foram elaboradas considerando os teores de vitaminas, ácidos graxos e sais minerais necessários para fornecer uma dieta adequada (REEVES et al., 1993), restringindo-se apenas a quantidade de proteína da ração ofertada (ração hipoprotéica). O grupo desnutrido apesar de não ter ingerido menos calorias que o grupo controle teve uma perda de peso significativa indicando um processo de desnutrição protéica.

Neste trabalho os animais desnutridos apresentaram maior consumo de água em relação aos animais controle, dados estes que estão de acordo com a literatura, que relatam maior consumo de água pelos animais desnutridos em decorrência da depleção das reservas de glicogênio, visto que cada molécula de glicogênio é armazenada juntamente com 4 moléculas de água (ZIEGLER; FILER, 1996).

Verificamos que os animais desnutridos apresentam menor número de eritrócitos, diminuição da concentração da hemoglobina, hematócrito e VCM (volume corpuscular médio) comparado aos animais controle, caracterizando um quadro de anemia microcítica. Os animais desnutridos também apresentam leucopenia importante, (BORELLI et al., 1995, 1998, 2001, 2006; BARON, 1997) e em nossos estudos anteriores (BORELLI et al., 1995, 2007;

BLATT, 2004; XAVIER et al., 2007), ficou demonstrado que a leucopenia e a anemia estão associadas a uma hipoplasia medular especialmente importante no setor mielóide.

Essas alterações hematológicas como pancitopenia periférica e hipoplasia medular são justificadas por deficiência protéica no processo de renovação celular. Como a medula óssea é um tecido altamente renovável devido à vida média relativamente curta das células sanguíneas, o aporte de nutrientes é fator limitante para a produção medular. Dados do nosso grupo demonstraram que as células progenitoras de animais desnutridos apresentam uma parada maturativa evidenciada por número elevado de células tronco/progenitoras na fase G0/G1 do ciclo celular (BORELLI et al., 2009) e redução da celularidade óssea.

No presente trabalho investigamos a participação de processos apoptóticos/necróticos e, ou autofágico na hipoplasia medular observado em camundongos desnutridos.

9.1 Apoptose e Desnutrição

Os resultados obtidos mostraram, *in vivo*, que a apoptose parece não ser importante no estabelecimento da hipoplasia observada, o que já havíamos demonstrado anteriormente em camundongos Swiss submetidos à desnutrição e utilizando a técnica de TUNEL, o índice de apoptose nas células da medula óssea de animais desnutridos não foi maior que nos respectivos controles (BORELLI et al., 2007), diferentemente do que foi encontrado em estudos sobre detecção de alterações da apoptose celular de linfócitos na desnutrição protéica energética (DPE) e sabendo que há uma maior incidência de infecção nessa desnutrição dados da literatura relatam que estudos realizados em 10 crianças desnutridas e 10 saudáveis foram submetidas a história clínica, exame clínico e exames laboratoriais de rotina, além de estimativa de alterações celulares apoptóticas por citometria de fluxo. Todos os índices apoptóticos foram maiores nos casos de desnutrição em comparação com os controles e normalizou após a reabilitação nutricional. Correlação positiva significativa foi encontrada entre a taxa de infecção e a porcentagem de células apoptóticas precoce em ambos os grupos de pacientes antes da reabilitação nutricional. Em conclusão, as anormalidades de linfócitos na desnutrição protéica energética (DPE) não estão limitadas apenas à sua contagem anormal, mas também incluem o aumento da apoptose das suas formas periféricas que podem explicar muitas das anomalias associadas na desnutrição protéica energética (DPE). Este desarranjo da apoptose é reversível através da implementação de um programa de reabilitação nutricional. (HODHOD et al., 2005).

Estudos em macrófagos peritoneais de ratos submetidos à desnutrição protéica - calórica (DPC) apresentam níveis significativamente maiores de apoptose, quando estimuladas com agentes pró-apoptóticos em comparação com os ratos controles. O aumento da apoptose nos macrófagos de ratos submetidos à DPC foi devido a diminuição da expressão das proteínas : PKC e Bcl-2.(RIVADENEIRA, 2001). A deficiência de zinco através de um desequilíbrio nutricional pode induzir este tipo de morte em uma variedade de tipos celulares. (FRAKER, 2005) sendo demonstrado que esta deficiência acelera muito a apoptose entre linfócitos pré-T e B. (FRAKER e KING, 2004). Embora os mesmos tenham sido realizados em camundongos, é provável que em humanos com deficiência de zinco devido à dietas ou doenças crônicas também ocasione o mesmo problema. Sugerem-se que o papel da apoptose e outras formas de morte celular em desequilíbrios nutricionais é provavelmente extensiva . A deficiência de zinco é, portanto, um paradigma que começa a elucidar o papel fundamental que a apoptose desempenha nos desequilíbrios nutricionais. (FRAKER e KING, 2004). Citocinas induzidas por morte celular programada em linhas celulares e em timócitos levou a hipótese de que as deficiências nutricionais podem também induzir a apoptose em células vulneráveis. Além disso, desnutrição protéico calórica (DPC) provoca elevação da produção de GCs (glicocorticóides) que iniciam a apoptose em timócitos. Por causa da atrofia do timo e linfopenia acompanhado nessas deficiências, parece provável que a apoptose poderia desempenhar um papel fundamental no comprometimento da linfopoiese nessas duas formas mais comuns de desnutrição (DEPASQUALE – JARDIEU e FRAKER, 1980 e FRAKER e KING, 2004).

Como os processos apoptóticos podem ser de difícil detecção *in vivo*, também refizemos os experimentos *in vitro*, estimulando as células com um composto pró-apoptótico camptotecina (6µm). Nesses experimentos observamos que, apenas quando estimulamos as células de animais desnutridos com camptotecina, as mesmas, no período de 12 horas apresentaram maior porcentagem de apoptose tardia do que o respectivo controle, sugerindo que há um período em que as células desnutridas são sinalizadas para via apoptótica, sendo mais susceptível ao estímulo. As células de animal desnutrido estimulado apresentaram após 12 horas aumento significativo da apoptose inicial em relação a 0 horas , indicando que nesse período há um aumento da apoptose tanto em processo inicial, tanto em processo tardio. As células de animal desnutrido e animal controle, não estimulados, apresentaram no período de 24 horas um aumento significativo em relação à 0 hora de células em processo de apoptose inicial. Contudo, podemos observar que entre o período de 0 a 6 horas as células permanecem em níveis fisiológicos de apoptose , exceto em 2 horas que as células estimuladas começam a

ser sinalizadas para via necrótica, as células desnutridas começam a ser mais suscetíveis ao estímulo a partir de 12 horas e prolongando esse estímulo até 24 horas. Não há dados na literatura relatando sobre o estudo da apoptose *in vitro* na desnutrição proteica, porém há estudos *in vitro* sobre a deficiência de folato associada com a acumulação de células na fase S do ciclo celular e apoptose, no qual investigaram o papel do p 53 e as proteínas relacionadas com a apoptose Bcl-2 e Fas, em linfócitos humanos de sangue periférico. Essas células cultivadas cerca de 3 a 9 dias em meio de cultura sem ácido fólico, timidina e hipoxantina aumentou a expressão de p53 e diminuiu a expressão de Bcl-2 em células deficientes de ácido fólico comparados com as células controle. (LIN, 2006), outros trabalhos relatam que cultivando células a cerca de 9 dias em meio de cultura deficiente de ácido fólico e também de colina levam à morte celular de linfócitos humanos (LU, 2012). Outro grupo também avaliou a homeostase da célula epitelial de intestino, *in vitro*, em um modelo murino recém desmamado, desnutrido proteicamente, verificou-se uma diminuição na altura das vilosidades e da profundidade das criptas intestinais e aumento da apoptose. Recém-desmamados desnutridos suplementados com alanil-glutamina apresentaram melhorias, na altura dos vilos, profundidade de criptas, resistência transmucosa e diminuição da apoptose em comparação com os animais não suplementados. (UENO, 2011).

9.2 Autofagia e Desnutrição

Autofagia pode ser estimulada por desequilíbrios nutricionais e metabólicos. Quando o fornecimento de nutrientes se torna insuficiente, a autofagia é ativada. Exemplo clássico desse processo é o que ocorre no fígado de mamíferos, que degrada proteínas por autofagia a fim de produzir aminoácidos para gliconeogênese. No entanto, mesmo sob condições adequadas de nutrientes, a autofagia é necessária a fim de permitir que as células removam estruturas celulares defeituosas. (WHITE, 2010). Diante de um estímulo agressor ou de um defeito celular, a célula pode entrar em autofagia como uma tentativa de reparo e só quando não há mais reparo possível é que ocorre o processo de morte celular.

Vários estudos sugerem que os genes e as proteínas que estimulam a autofagia podem bloquear a apoptose, ou o contrário, a partir de estímulos muito bem definidos, estabelecendo assim, uma sinalização cruzada entre esses dois fenômenos. (KLIONSKY, 2007). Vários estudos recentes indicaram que a autofagia também tem uma função de pró-morte através de vários mecanismos. A excessiva indução de autofagia pode ser um dos mecanismos pelo qual

o processo autofágico possa ser considerado um fator de pró-morte. O mecanismo pelo qual a autofagia pode executar essas funções aparentemente opostas como uma pró-sobrevivência e de um mecanismo de pró-morte permaneceu esquiua até recentemente. Usando *C. elegans* como um modelo de estudo, descobriram que durante a fome, níveis fisiológicos de autofagia promove a sobrevivência de *C. elegans*, mas quando estes níveis são insuficientes ou em excesso *C. elegans* direciona-se para o mecanismo de pró-morte. Além disso, verificou-se que a sinalização do receptor da acetilcolina é importante na modulação do nível de autofagia durante a fome, talvez por meio das quinases: DAP e RGS-2. O estudo fornece evidência *in vivo* de que os níveis de autofagia são críticos para decidir a promoção da sobrevivência ou morte e que os níveis fisiológicos de autofagia são considerados como pró-sobrevivência, enquanto que os níveis insuficientes ou excessivas de autofagia são considerados como pró-morte. (KANG, 2008).

Contudo esta hipótese não é facilmente demonstrada uma vez que a autofagia é intimamente ligada a outros mecanismos de morte celular como a apoptose e a necrose. (KIMCHI, KROEMER, MAIURI, ZALCKVAR, 2007).

Não há trabalhos relatando sobre a desnutrição x autofagia na desnutrição protéica, mas recentes estudos genéticos demonstraram que camundongos com autofagia sem às proteínas Atg5 ou Atg7 ,não pode sobreviver mais de 12 horas após o nascimento, por causa da falta de nutrientes. Além disso, no sistema nervoso central houve uma diminuição da ativação autofágica , no que ocasionou perda massiva de neurônios, resultando em neurodegeneração (UCHIYAMA, 2008).

Neste estudo, envolveram o papel *in vivo* da autofagia em mamíferos e verificaram nos camundongos knockout da proteína Atg7, sendo esta uma proteína essencial para a autofagia, uma diminuição da indução da fome por degradação de proteínas no fígado adulto e camundongos null de Atg7 morreram dentro de 1 dia após o nascimento. A perda de Atg7 leva a defeitos e acúmulo de organelas anormais. Estes resultados mostram o quanto o papel da autofagia é importante em resposta ao estímulo de fome e ao controle da qualidade de proteínas e organelas nas células quiescentes. (KOMATSU, 2006) .

TAKEMURA et al.,2009 realizaram estudos no coração de ratos adultos ,induzindo autofagia através da depleção de proteína fluorescente verde (GFP)-LC3 transgênicos por 3 dias; observaram por microscopia eletrônica , aumento dos lisossomos e vacúlos autofágicos em cardiomiócitos depois de 12 horas que essas células permaneceram em jejum, entretanto o número dos autolisossomos aumentaram ,logo após um longo período de jejum.

Na autofagia, diversas vias de sinalização podem estimular ou inibir o processo autofágico. Uma delas envolve a via de sinalização de PI3K/Akt/mTOR. Essa via pode ser estimulada por receptores de fatores de crescimento que induzem a fosfatidilinositol-3-Kinase da classe I (Class I PI3K), que culmina na indução do alvo de rapamicina de mamíferos (mTOR), que é conhecido por ser um inibidor de autofagia (MARTINET, 2009 ; RUBISZTEIN, 2007; KONDO, 2005) e a proteína Akt que é ativada por insulina e vários fatores de crescimento, participando da regulação da síntese de glicogênio através da fosforilação e inativação da GSK-3 α e β e suprime a apoptose fosforilando e inativando proteínas reguladoras gênicas da família Forkhead as quais estimulam a transcrição de genes que codificam proteínas promotoras da apoptose. (DOWNWARD, 1998), além disso, interage diretamente no crescimento celular através da fosforilação de mTOR.

Dados no nosso laboratório demonstraram que há aumento nas concentrações plasmáticas de glicocorticóide, redução de insulina e IGF1, o que poderia ter acarretado na redução do p-Akt nos animais desnutridos. Também já avaliamos (Nakajima, K...tese, dados ainda não publicados) que no grupo de animais desnutridos há uma redução das proteínas Erk1/2 em células tronco/progenitoras. Este dado juntamente com a diminuição do p-Akt ora demonstrada podem ser responsáveis pelas alterações na ativação/fosforilação de mTOR.

Dados da literatura demonstram que mTOR é ativado por fatores de crescimento e nutrientes como carboidratos e aminoácidos e que funciona como um “sensor” para equilibrar a disponibilidade de nutrientes e crescimento celular (KIHARA, 2001), ou seja, se as células estiverem desprovidas de nutrientes, mTOR não consegue inibir a autofagia e, caso estes nutrientes não sejam fornecidos ativar a via de sinalização da apoptose, entretanto na (figura 31) podemos verificar que TOR quinase forma dois complexos distintos denominados TOR complexo 1 (TORC1) e (TORC2). mTORC1 que contém os seguintes complexos mTOR, Raptor, mLST8 (*G β L*) e PRAS40, estimula o crescimento das células, aumenta a síntese e participa na degradação de proteínas, inibe autofagia e pode ser ativado por fatores de crescimento e aminoácidos. Já mTORC2 que contém os seguintes complexos mTOR, Rictor, mSin1, PRR5 e mLST8 (*G β L*), participa da sobrevivência da célula e na organização do citoesqueleto e é regulada principalmente por fatores de crescimento (TSUKASA, 2011).

Figura 31: Esquema representativo da via do mTOR. **Fonte modificada:** (TSUKASA, 2011).

Raptor é um componente essencial para a sinalização de mTORC1 e funciona como uma proteína de apoio para recrutar mTORC1 para os substratos tais como S6K, eIF4E e 4EBPs (proteínas de ligação). Dados deste trabalho demonstram que há aumento significativo de mTOR total e diminuição significativa de p-mTOR ser 2448 e ser 2481 nas células da medula óssea dos animais desnutridos quando comparados com o controle, portanto, o aumento de Raptor e mTOR total pode ser devido a diminuição da fosforilação de mTOR (NARITA, 2012).

Os complexos Rictor e mLST8 (*GβL*) apresentaram diminuição da sua expressão nos animais desnutridos comparados ao animais controles. Rictor é uma proteína que participa na atividade catalítica de mTORC2, e recruta os substratos SGK e PKC, da mesma maneira semelhante à do Raptor em mTORC1. Já a proteína mLST8 (*GβL*) é necessária para a formação de uma interação de nutrientes entre Raptor e mTOR e mantendo assim uma via de mTOR ativa. A diminuição de mLST8 (*GβL*) não diminui os níveis de mTOR (SABATINI, 2006).

Os aminoácidos também participam na ativação de mLST8 (*GβL*) com mTOR e são reconhecidamente conhecidos como reguladores do processo autofágico. (KUMA, MIZUSHIMA, 2010). Concentrações fisiológicas de aminoácidos não induzem a autofagia por inibirem a formação do autofagossomo. Além disso, autofagia também é inibida pela insulina e promovida pelo glucagon. Há trabalhos relatando sobre os efeitos dos aminoácidos na autofagia, onde o grupo avaliou os efeitos da ingestão de leucina em uma dieta deficiente de proteína (desnutrição protéica) na síntese e degradação das proteínas musculares. A redução da massa muscular foi

suprimido pela suplementação de leucina-(1,5% de leucina) em ratos alimentados com uma dieta isenta de proteína, durante 7 dias. Além disso, houve uma diminuição na degradação das proteínas musculares, principalmente da expressão da proteína LC3II, mas não foi evidenciado aumento na síntese de proteínas do músculo. Esses resultados sugerem que a dieta isenta de proteína suplementada com leucina suprime a degradação das proteínas musculares através da inibição da autofagia, em vez da síntese de proteínas. (SUGAWARA, 2009).

O mecanismo pelo qual os aminoácidos inibem a formação de autofagossomo envolvem vias de transdução de sinal, dentre as quais, a via de mTOR - via de transdução de sinal dependente, também usado pela insulina e outros fatores de crescimento. (DERETIC, 2008).

Os aminoácidos podem ser classificados em: essenciais e não essenciais. Os aa essenciais são aqueles cujos esqueletos de carbono não podem ser sintetizados pelo organismo, necessitando ser obtidos pela dieta. (REEDS, GARLICK, 2000). Dados do nosso trabalho demonstram que os aminoácidos essenciais: Isoleucina, Lisina, Metionina e Valina apresentaram concentrações plasmáticas reduzidas no grupo de animais desnutridos em relação ao grupo controle, bem como os aa não essenciais Serina e Taurina.

O aminoácido Taurina intensifica os efeitos da insulina e também é responsável por um melhor funcionamento do metabolismo da glicose (BERG, 2006), este dado pode justificar a redução de insulina encontrada nos animais desnutridos que este por sua vez interage com a via de Akt e contribui para a redução da fosforilação de mTOR.

Outra hipótese para o aumento da autofagia na desnutrição pode ser devida a uma diminuição na expressão de receptores de fatores de crescimento ou ainda, de aumento de sensores de nutrientes da célula, como por exemplo: mTOR. Outra via de ativação da autofagia é a via de FAK dependente de integrina. A interação proteínas da matriz extracelular com receptores de membrana tipo integrina ativa a adesão focal via a proteína FAK (focal adhesion quinase) que ao ser ativada fosforila a proteína TSC2 que, por sua vez, inibe mTOR (LOCK, DEBNATH, 2008).

Conforme podemos observar na figura 32, a perda do acoplamento das integrinas na superfície celular com proteínas da MEC pode induzir autofagia através de três possíveis vias de sinalização: fatores de crescimento, sensores de nutrientes (mTOR, aminoácidos), sensores de energia (ATP), ou em resposta ao estresse.

A interrupção, do contato célula-matriz pode ativar tanto as vias de energia (ATP), tanto as vias de resposta ao estresse, através de mecanismos atualmente desconhecidos. Isto

leva a ativação da AMPK e IF2a, ambos conhecidos por estimular a via da autofagia (KARANTZA, et al., 2007).

Figura 32: Interação das integrinas, fatores de crescimento, sensores de energia e nutrientes na via autofágica. Fonte: (LOCK, DEBNATH , 2008).

Dados do nosso laboratório evidenciaram que na desnutrição protéica há evidências histológicas de alteração da MEC (matriz extracelular) e, com aumento de fibronectina, laminina e trombospondina e comprometimento da célula tronco hematopoética com diminuição e/ou perda de proliferação celular afetando a granulopoese (BORELLI et al., 2009), ou seja, há uma permanência de células tronco/progenitoras na fase G0/G1 do ciclo celular que poderia ser ocasionada pela via de mTOR já que o mesmo participa na progressão do ciclo celular (SABATINI, 2012). Também encontramos em células progenitoras hemopoéticas de animais desnutridos, alteração na expressão das integrinas VLA4 e VLA5, aumento de corticosterona circulante (dados ainda não publicados). Este conjunto de resultados pode explicar, ao menos em parte, o aumento do processo autofágico. Um dos pré-requisitos para a hematopoese é o estabelecimento das células tronco com um microambiente adequado para interações de células-células ou células-matriz (TAVASSOLI; MIGUELL, 1991). Células estromais e componentes da MEC modulam o crescimento e diferenciação de progenitores hematopoéticos, e considerando que moléculas da matriz extracelular estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação, diferenciação e migração das células hematopoéticas, essas mudanças podem ser significativas para a fisiologia desse tecido (BORELLI et al., 2009).

Durante o processo autofágico ocorre a conversão da proteína LC3 I citoplasmática para LC3 II de forma lipídica, que se liga ao pré – autofagossomo e autofagossomo. Essa conversão da proteína é a forma mais confiável de quantificar a proteína pelo ensaio de Western Blotting. Observamos um aumento do LC3 I citoplasmático e LC3 II nos animais desnutridos em relação aos animais controle, no sentido em que mais LC3 está sendo lipídica e deslocada para as membranas do autofagossomo. Verificamos também um aumento de Beclin-1 nos animais desnutridos em relação aos animais controle esta proteína é muito importante para iniciação do processo autofágico e interage com a proteína anti-apoptótica Bcl-2 , que inibe autofagia quando está presente no retículo endoplasmático ; a dissociação de Beclin-1 de Bcl-2 é essencial para a atividade autofágica. (RUBINSZTEIN, 2007).

Avaliamos também *in vitro*, estimulando as células com compostos pró-autofágicos (tamoxifeno 20µm). Nesses experimentos observamos que nas células oriundas de animais desnutridos há aumento significativo do processo autofágico já em 0 hora, resultado esse concordante com os obtidos nos ensaios de western blotting onde encontramos aumento da proteína LC3 II, proteína esta envolvida no alongamento e formação do autofagossomo. (PAN, ULLMAN, DOU, 2011). Este resultado evidencia que as células recém obtidas dos animais desnutridos já se encontravam em processo autofágico como mecanismo de sobrevivência ou reparo, pois em duas horas de ensaio, não houve diferença entre o grupo experimental e o controle. A nosso ver, isso se deve ao fato de que as células encontram-se em meio de cultura adequado e suplementado com soro, o que deve ter impedido a autofagia.

Observamos aumento significativo da autofagia em células da medula óssea de animais desnutridos após 18 horas de estímulo com tamoxifeno (20 µM) em relação ao respectivo controle, demonstrando que nesse período a autofagia começa a ser induzida através do estímulo mais facilmente do que o controle e um aumento do processo autofágico nas células não estimuladas do animal controle em relação ao desnutrido ,dados condizentes com experimento *in vitro* da apoptose em 24 horas no qual as células do animal desnutrido não estimulado é significativamente maior na apoptose inicial , isso mostra que logo após o período de 18 horas , as células desnutridas não estimuladas direcionam-se para via apoptótica.

Não há trabalhos relatando o efeito da desnutrição proteica na autofagia *in vitro* , mas há estudos na autofagia *in vitro* através da privação do aminoácido Leucina ,onde observaram que a proteína Atg14 , proteína específica para autofagossomo é removido pelo citosol em um meio rico de nutrientes e sua expressão na presença de um meio privado de

nutrientes é suprimido , mTORC1 pode inverter eficientemente essa remoção do Atg 14 no citosol , mostrando que o papel essencial do mTORC1 é de inibição. (YAN, 2012) . COMB et al, 2012 demonstrou que na presença da privação do aminoácido Leucina em meio de cultura *in vitro*, alterações na via do IKK , inibição do feedback PI3K/Akt e da fosforilação da subunidade p85 em resposta à privação de nutrientes.

Os dados de autofagia obtidos dos ensaios *ex vivo* e *in vitro* podem estar relacionados com a via de mTOR/AkT. Demonstramos que a desnutrição afeta a via mTOR/AkT, com redução da forma fosforilada de mTOR e de AKT e esta redução pode ocasionar a diminuição na inibição da autofagia, uma vez que mTOR inibe autofagia , conforme figura 30.

A autofagia é um dos principais contribuintes para o metabolismo celular, fornecendo nutrientes estão indisponíveis. Embora o processo de autofagia seja vital para manter a sobrevivência das células, ela em excesso levaria a um tipo de morte celular autofágico programado, visto que autofagia também tem fatores pré –apoptóticos (Fan YJ, Zong WX, 2012).

Em nosso modelo de desnutrição protéica a autofagia poderia ser inicialmente um mecanismo de sobrevivência, mas que ao longo da permanência do estado carencial, poderia evoluir para a morte autofágica programada.

10. CONCLUSÃO

A redução da celularidade da medula óssea em animais desnutridos não é, ao menos nessa fase da desnutrição, ocasionada por apoptose e necrose e sim por autofagia. Podemos concluir que a hipoplasia medular estaria em morte autofágica programada, já que nosso modelo experimental de desnutrição protéica conduzem essas células a um processo autofágico.

11. REFERÊNCIAS

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

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

AXELLSON, I.; PITA, J. C.; HOWELL, D.S.; LORENTZON, R.; BERNANI, I.; BOQUIST, L. Kinetics of proteoglycans and cells in growth plate of normal, diabetic, and malnourished rats. **Pediatr. Res.**, Baltimore, v.27, p.41-44, 1990.

AUGUSTO, ALP. Avaliação nutricional. In: AUGUSTO, ALP. *et al.* **Terapia nutricional**. São Paulo: Editora Atheneu, 1995. p. 28-37.

BARON, RB. Desnutrição protéico-calórica. In BENNETT, JC; PLUM, F. Cecil tratado de medicina interna. 20^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan,v.1 p. 1273-1277, 1997

BELKACEMI L.,DESAI M.,NELSON D.;ROSS M. Altered mitochondrial apoptotic pathway in placentas from undernourished rat gestations. **Mitochondrial Function/Dysfunction in Health and Disease**.v.15,p.377-393,2012.

BERG, J.,TYMOCZKO, J. and STRYER , L.; Biochemistry, International Edition, W.H. Freeman and Company, 2006.

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

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

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

BORELLI, P.; FOCK, R. A.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; BEUTLER, B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G. Effect of protein deprivation on erythropoiesis. **British Journal Nutrition**, 2007.

BORELLI, P; BARROS,FEV, NAKAJIMA, K; BLATT, SL; BEUTLER, B; PEREIRA, J; TSUJITA, M; FAVERO, GM; FOCK, RA. Protein malnutrition halts hemopoietic progenitor cell in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Reserch** v.42,p. 523-530,2009.

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

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

BWIBO NO; GEWA C; NEUMANN CG. Child nutrition in developing countries. **Pediatr Ann.** 2004 ; 33:658-74.

CARVALHO NF; CARRINGTON PH ; HALL DE e KENNEY RD. Severe nutritional deficiencies in toddlers resulting from health food milk alternatives. *Pediatrics*. 2001; 107:4-45.

CHIPUK JE .; MOLDOVEANU T., LLAMBI F., PARSONS M., GREEN D. The BCL-2 family reunion. **Mol Cell.**v. 37,p. 299–310, 2010.

COMB, W.,HUTTI,H.,COGSWELL,P.,CANTLEY,L.BALDWIN,A. p85 α SH2 domain phosphorylation by IKK promotes feedback inhibition of PI3K and Akt in response to cellular starvation. **Mol. Cell.** v.6,p.719-730,2012.

COWLING, G.J.; DEXTER, T.M. Apoptosis in the haemopoietic system. In: DEXTER, T.M.; RAFF, M.C.; WYLLIE, A.H., eds. DEXTER, M.C.; RAFF, A.H.; Wyllie, T.M. **The role of apoptosis in development, tissue homeostasis and malignancy: death from inside out**. London: Chapman & Hall, New York ; p.21-7, 1995.

DE ANGELIS, RC. Desnutrição calórico-protéica (Má nutrição calórico-protéica). In: **Fisiologia da nutrição**. 3ed. São Paulo: Nobel, p.38-56, 1986.

DE ONIS, M.; HABICHT, J. P. Antropometric reference data for international use: recommendations from a World Health Organization Expert Committee. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.64, p.650-58, 1996.

DEPASQUALE – JARDIEU, P.& FRAKER, P.J.Further characterization of the role of corticosterone in the loss of humoral immunity in zinc- deficient A/Jmice as determined by adrenalectomy .**J. Immunol.**124: 2650-2655

DOWNWARD,J .Mechanisms and consequences of activation of protein Kinase B/Akt.**Curr.Opin.Cell Biol.**, 10,262-7,1998.

EIGENBRODE, T.; PARK, J.H.; HARDER, J.; IWAKURA, Y.; NUNEZ, G. Cutting edge: critical role for mesothelial cells in necrosisinduced inflammation through the recognition of IL-1 alpha released from dying cells. **J. Immunol.** v. 181, p. 8194-8198,2008.

ESKELINEN EL. Maturation of autophagic vacuoles in mammalian cells. **Autophagy** v. 1 p.1-10 ,2005.

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

FAN YJ.; ZONG W. The cellular decision between apoptosis and autophagy. **Cancer Chin J.** v. 10 ,2012.

FAO – Food and agriculture organization of the United Nations. www.fao.org, 2009 e 2012.

FRAKER, P. Roles for cell death in Zinc deficiency. **Science**.v..135, p. 359-362, 2005.

FRAKER, P. & KING, L. Reprogramming of the immune system during zinc deficiency **.Ann.Rev.Nutr.** v.24:,p.277-298 , 2004

FUNG C.; LOCK R.; GAO S.; SALAS E.; DEBNATH. Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. **Mol Biol Cell.** v. 19,p. 797-806, 2008.

FUJIMOTO K., HANSON P., TRAN H., FORD E.,HAN Z.,JOHNSON J., SCHIMIDT R., VERDE K., WICE B; POLONSKY K. Autophagy regulates pancreatic beta cell death in response to Pdx1 deficiency and nutrient deprivation. **J Biol Chem**.v.284,p.64-73, 2009.

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

GALLUZZI L., KROEMER G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. **Cell** v. 135, p. 1161-1163,2008

HODHOD A., MOUSTAFA A., NASSAR M.F., MAHMOUD M.Z,. Apoptotic changes in lymphocytes of protein energy malnutrition patients. **Issue 1**, v.25, p: 21-29,2005.

HITOMI J., CHRISTOFFERSON D., YAO J., DEGTEREV A., XAVIER R., YUAN J. Identification of a molecular signaling network that regulates a cellular necrotic cell death pathway. **Cell** v. 135, p. 1311-1323, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3ed. São Paulo: 1985. 332p.

ISSEI T.; TAKASHI U.;EIKI K.LC3 and autophagy. **Methods in Molecular Biology.** v.445,2010.

KARANTZA, W.; PATEL, S.; CHEN, G., KRAVCHUCK, O., MATHEW, R., WHITE, E., JIN, S. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. **Genes Dev.** v.13, p.1621-1635, 2007.

KANG C.; AVERY L., To be or not to be, the level of autophagy is the question: dual roles of autophagy in the survival response to starvation. **Autophagy**. v.82, p.82-84, 2008 .

KLEIN, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*. v.29, p. 914-26, 1995.

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

KIHARA A., NODA T., ISHIHARA N., OHSUMI Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Cell Biol.** V.152, p.519-530, 2001.

KLIONSKY DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 931–937.

KRYSKO D., DHERDE K., VANDENABEELE, P. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. **Apoptosis** .v.11, p. 1709-1726 ,2006.

KOMATSU M., KOMINAMI E. Autophagic-lysosomal system: physiology and pathology. **Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi**. v.26, p. 75-81, 2006.

KUMA A., MIZUSHIMA N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. **Semin Cell Dev Biol**. v.21, p.683-90, 2010.

KUMA A., HATANO M., MATSUI M., YAMAMOTO A., NAKAYA H., YOSHIMORI T., OHSUMI Y., TOKUHISA T., MIZUSHIMA N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. **Nature**, v.432, p.1032-1060, 2004.

LIN HL, CHEN C.; TSAI W., YEN J., LIU H. In vitro folate deficiency induces apoptosis by a p53, Fas (Apo-1, CD95) independent, bcl-2 related mechanism in phytohaemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes. **Br J Nutr.** v.95,p. 870-880,2006.

LOCK, R.,DEBNATH,J. Extracellular matrix regulation of autophagy. **Curr Opin Cell Biol.**v.20,p.583-590,2008.

LLOYD L.,FOSTER T.,RHODES P., RHIND S., GARDNER D. Protein-energy malnutrition during early gestation in sheep blunts fetal renal vascular and nephron development and compromises adult renal function. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v.301.p.1599-1615,2011.

LU L.; NI J.,ZHOU T., XU W., FENECH M., WANG X. Choline and/or folic acid deficiency is associated with genomic damage and cell death in human lymphocytes in vitro. **Nutr Cancer.** v. 64,p.470-481, 2012.

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

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

METCALF, D. The hematopoietic regulators na embarrassment of niches. *Bioessays.* v.14, p.799-805, 1992
MICHEAU O, TSCHOPP J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. **Cell.** ,2003.

NARITA,M.; INOKI,K.Rags connect mTOR and autophagy.**Landes Bioscience.** v.3,p.111-114,2012.

NILSSON S.K., JOHNSTON H.M. AND COVERDALE J.A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cells niches. **Blood** v.97, 2293-2299, 2001.

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

OUYANG L.; SHI Z.; ZHAO S.; WANG FT.; ZHOU TT.; LIU B.; BAO JK.; Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. . **Cell Prolif.** v. 45, p. 487-498 , 2012.

OPAS M. Substratum mechanics and cell differentiation. **Int Rev Cytol.** 1994; 150:119-37.

ORTIZ R., CORTES L., CORTES E., and MEDINA H. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats.Clinical and Experimental **Immunology**, v.155,p. 96–106, 2008.

PAN J.; ULLMAN E.; DOU Z. Inhibition of protein degradation induces apoptosis through a microtubule-associated protein 1 light chain 3–mediated activation of caspase-8 at intracellular membranes. **Mol Cell Biol.** v. 31, p.3158–3170, 2011.

PETER, M.E. Programmed cell death .Apoptosis meets necrosis. **Nature** v. 471 p. 310-312, 2011.

RABINOWITZ, J.D. ; WHITE, E. **Autophagy and Metabolism** .Sciencemag.v.330, 2010.

REEDS, P.J.; GARLICK, P.J. Protein and amino acids for humans.**J.Nutr.**v. 130,2000.

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

RIVADENEIRA D., GROBMYER S., NAAMA H., MACKRELL P., STAPLETON P., DALY J. Malnutrition-induced macrophage apoptosis. **Surgery.** V.129,P.617-625,2001.

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

RUBINSTEIN A.; EISENSTEIN M; BER Y. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. **Mol Cell**. v.44, p. 698–709, 2011.

SABATINI DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. **Nat Rev Cancer** v.6,p. 729–734,2006.

SABATINI,D.; PELED, L.SnapShot: mTORC1 Signaling at the Lysosomal Surface. **Cell**.v.6,p.1390-1390,2012.

SPENCER, P.K. Sorger, Measuring and Modeling Apoptosis in Single Cells. **Cell** .v.144 ,p- 926-939 , 2011.

STEPHEN,W.;GREEN R. Mitochondria and cell death : outer membrane permeabilization and beyond. **Nature**, 2010.

STRAPPAZZON F.; VIETRI-RUDAN M.; CAMPELLO S.Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy. **Embo J**.v.30, p.1195–1208,2011.

SUGAWARA T., ITO Y., NISHIZAWA N., NAGASAWA T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. **Amino Acids**.v.37,p.609-616, 2009 .

TANIDA I., UENO T., KOMINAMI E.LC3 e autophagy. **Methods in Molecular Biology**.v.445.p.77-80,2008.

TAKEMURA G.,KANAMORI H., GOTO K.,MARUYAMA R.,TSUJIMOTO A., FUJIWARA H., SEISHIMA M.,MINATOGUCHI S. Autophagy maintains cardiac function in the starved adult. **Autophagy**. v.5,p. 1034-1060, 2009.

TAVASSOLI, M.; MIGUELL, J. J. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. **Proc Soc Exp Biol Med**. V.196,p. 367-73,1991.

TRENTIN JJ. Hemopoietic microenvironments.**Transplant Proc**. v.10,p.:77-82,1978

TSUKASA,S.; KEN,I.Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids pathway.**Acta Biochim Sin**. v.43,p.671-679,2011.

UENO P.,MAIER E., GUEDES M., AZEVEDO O., WU D., WILSON T., HOGAN S., GUERRANT R., POLK D., DENSON L.,MOORE S. Alanyl-glutamine promotes intestinal epithelial cell homeostasis in vitro and in a murine model of weanling undernutrition. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**. v.301,p. 612-622, 2011.

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

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

WIRAWAN E.; VANDE W.; KERSSE K. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1–induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. **Cell Death** v. 1 ,2010.

XAVIER, JG; FAVERO, ME; VINOLO, MAR; ROGERO, MM; DAGLI, MLZ, ARANA-CHAVEZ, VE; BOROJEVIC, R; BORELLI, P. Protein malnutrition alters histological and ultrastructural chacteristics of the boné marrow and decreases hematopoiesis in adult mice. **HistolHistopathol**. v.22 ,p. 651-60,2007.

YAN,X., SUN,Q.,JI,J.,ZHU,Y.,LIU, Z.,ZHONG,Q. Reconstitution of leucine-mediated autophagy via the mTORC1-Barkor pathway in vitro. **Autophagy**. v.2,p. 213-21, 2012.

YOUNG S.; SEUNG Y.; HEE S.,FRANCIS K. Physiological Consequences of Programmed Necrosis, an Alternative form of Cell Demise. **Mol. Cells**.v. 29, p.327-332, 2010.

YOUNG M.; TAKAHASHI Y.; KHAN O. Autophagosomal membrane serves as platform for intracellular death-inducing signaling complex (iDISC)–mediated caspase-8 activation and apoptosis. **J Biol Chem**, v. 287, p. 12455–12468, 2012.

YOSHIMORI, T. Autophagy: A regulated bulk degradation process inside cells . *Biochem .Biophys. Res .Commun* v.313,p. 453-458, 2004.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUAOfício CEUA/FCF/50/2010

São Paulo, 14 de julho de 2010.

Ilmo(a). Sr(a)
Jackeline Soares de Oliveira Beltran
Orientador: Profa. Dra. Primavera Borelli
FBC

Prezado(a) Senhor(a),

A Comissão de Ética no Uso de Animais da FCF/USP, em reunião realizada em 12 de julho de 2010, apreciou o projeto intitulado "Avaliação da participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição protéica" (Protocolo CEUA/FCF/282) e resolveu solicitar o que segue:

- a) Definir o número correto de animais no item 6d do formulário, pois será necessário realizar primeiro o projeto piloto e sem esta análise não se torna possível estabelecer o número total de animais, sugerimos que nesta primeira etapa seja apenas considerado o número de animais utilizado no projeto piloto e após essa análise seja solicitada a complementação ao modelo experimental;
- b) O cronograma, item 6e do formulário, não está de acordo com o número total de animais, considerando a data de início e a de término haverá muito mais animais do que o solicitado;
- c) No item 7h do formulário, excluir a eutanásia por decaptação. No projeto consta eutanásia por deslocamento cervical, verificar essa divergência. Lembrando que o deslocamento cervical somente deve ser realizado sob anestesia;
- d) Citar a bibliografia completa no item 9 do formulário;
- e) Informar no item 10 do formulário o número do projeto FAPESP e CNPq;
- f) A mestrande Jackeline Soares de O. Beltran deverá assinar o termo de responsabilidade como pesquisadora responsável.

Aguardamos pronunciamento de Vossa Senhoria no prazo de 60 dias, o não atendimento das solicitações acima, levará ao arquivamento do processo.

Atenciosamente,

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