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

**Efeito da Desnutrição Protéica sobre a Matriz
Extracelular da Medula Óssea de
Camundongos**

CIDÔNIA DE LOURDES VITURI

Tese para obtenção do grau de
Doutor

Orientadora:

Profa. Dra. Primavera Borelli

Coorientador:

Prof.Dr. Márcio Alvarez da Silva

São Paulo

2001

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

V854e Vituri, Cidônia de Lourdes
Efeito da desnutrição protéica sobre a matriz extracelular da
medula óssea de camundongos / Cidônia de Lourdes Vituri. --
São Paulo, 2001.
131p.

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

1. Hematologia 2. Nutrição : Ciência dos alimentos 3.
Biologia celular 4. Bioquímica I. T. II. Borelli, Primavera,
orientador

616.15 CDD

CIDÔNIA DE LOURDES VITURI

**Efeito da Desnutrição Protéica sobre a Matriz Extracelular da
Medula Óssea de Camundongos**

Comissão Julgadora

**Tese para obtenção do grau de
Doutor**

**Profa. Dra. Primavera Borelli
Orientadora/Presidente**

**Profa. Dra. Laureci Gomes
1º Examinador**

**Profa. Dra. Lúcia de Oliveira Sampaio
2º Examinador**

**Prof. Dr. Júlio Orlando Tirapegui Toledo
3º Examinador**

**Prof. Dr. Dalton de Alencar Fischer Chamone
4º Examinador**

São Paulo, 15 de fevereiro de 2001.

Sabedoria

*Ela é mais formosa do que o sol, e do que todas as constelações;
Comparada com a luz, ela vence.*

*Ela realça a sua nobreza na convivência que tem com Deus, e no amor que lhe tem o
Senhor de todas as coisas.*

Ela é que ensina a ciência de Deus, e é a diretriz de suas obras.

*E, se alguém deseja a profundidade da ciência, ela é que sabe o passado, e que julga do
futuro;*

Penetra as sutilezas dos discursos e as soluções dos argumentos;

*Conhece os sinais e os prodígios antes que eles apareçam, o que tem de acontecer no
decorso dos tempos e dos séculos.*

*Eu a amei e busquei desde minha juventude, procurei tomá-la por esposa, e fiquei
enamorado da sua formosura.*

Livros didáticos ou poéticos, Antigo Testamento.

*Aos meus pais Amélia e Fioravante
Antônio, "in memoriam", pelo amor e
ensinamentos que iluminaram meu caminho.*

*Ao meu filho Kauê,
pelo carinho e
compreensão.*

*A minha irmã Neuza, pelo
incentivo e colaboração durante
a minha ausência.*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Primavera Borelli, pela constante orientação, estímulo, confiança e principalmente pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva, da Disciplina de Biologia Celular, BEG-UFSC, pelos esclarecimentos, entusiasmo e confiança.

À Profa. Dra. Vera Lúcia C. G. Tramonte, do Departamento de Nutrição da UFSC, pela utilização do Lab. Ntr. Exp. e sugestões no processo de desnutrição.

Ao Técnico Gerson L. Faccin do Lab. Ntr. Exp. da UFSC, pela colaboração no manejo dos animais, pela amizade e troca de informações.

À Profa. Dra. Lúcia Sampaio (UNIFESP-EPM), pela realização das dosagens de ácido hialurônico.

À Profa. Dra. Terezinha de Jesus C. Neiva do ACL-UFSC, pelo auxílio prestado através de diálogo técnico-científico, pela amizade e incentivo constante.

À Profa. e colega de disciplina Patrícia Haas, pelo incentivo e principalmente por desenvolver a Disciplina de Citologia Clínica ACL-UFSC, com brilhantismo durante a minha ausência.

À Pós-Graduanda Rosângela Pivoto do Lab. Hem. Exp. da USP, pela colaboração no processo de desnutrição dos animais, fixação e preparação das peças para o exame histopatológico.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier, pela colaboração na execução do exame histopatológico.

À Profa. Dra. Andréa Trentin da Disciplina de Biologia Celular BEG-UFSC, pela valiosa colaboração em diversas etapas do trabalho.

Ao colega Giordano do LNH-UFSC, pelo companheirismo e incentivo principalmente nas etapas iniciais deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório: Rosângela, Adriana, Naná, Simone, Elaine, Angélica, Ana, Alexandre, Alvorita, Hye, Giordano, Ricardo, Marco, Marcos, Bianca, Cláudia e Bruno pela amizade, colaboração e trocas de informações. Valeu pela força!

À Rosângela, Adriana e Eliane, pela acolhida na cidade de São Paulo na fase final deste Trabalho.

Aos meus irmãos Clóvis, Bersan, Maurício, João, Enedina, Neuza, Miguel, Waldir e Zildo, pelo carinho, união e incentivo constante.

Aos professores e funcionários dos Departamentos de MIP e BEG e do HU da UFSC, pelo suporte instrumental oferecido em importantes etapas deste trabalho.

A todos os docentes e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da USP, que me receberam e me proporcionaram a capacitação docente.

À Universidade Federal de Santa Catarina, que através do Plano Institucional de Capacitação Docente (PICD) e CAPES, que ofereceu-nos a oportunidade de cursar o doutorado e pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Análises Clínicas, CCS, UFSC, em nome dos seus administradores (Chefes e Sub-Chefes), de todos os professores e funcionários, por viabilizarem o afastamento e pelo apoio.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	001
1.1 DESNUTRIÇÃO	001
1.2 EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO NA HEMATOPOIESE	002
1.3 BIOLOGIA DO MICROAMBIENTE HEMATOPOIÉTICO	007
1.3.1 FATORES DE CRESCIMENTO HEMATOPOIÉTICO	010
1.3.2 MATRIZ EXTRACELULAR	015
1.4 MATRIZ EXTRACELULAR E DESNUTRIÇÃO	025
2 OBJETIVOS	028
3 MATERIAIS E MÉTODOS	029
3.1 Animais	029
3.2 Rações	029
3.3 Indução da Desnutrição	031
3.4 Coleta de Sangue para Determinação de Proteínas Totais e Albumina Plasmáticas	031
3.5 Obtenção da Matriz Extracelular para Determinação de Fibronectina, Laminina e Trombospondina	032
3.6 Coleta e Processamento histológico de esterno dos camundongos	033
3.7 Diálise	033
3.8 Dosagem de Proteínas Totais da Matriz Extracelular	033
3.9 Análise de Moléculas da Matriz Extracelular	034
3.9.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida	034

3.9.2 Western Blott para Determinação de Fibronectina, Laminina e Trombospondina -----	034
3.9.3 Determinação de Fibronectina e Laminina da MEC por ELISA -----	036
3.10 ENSAIOS BIOLÓGICOS -----	036
3.10.1 Coleta de Matriz Extracelular para Ensaios de Adesão e Sobrevivência celular-----	036
3.10.2 Viabilidade Celular -----	037
3.10.3 Cultura de Células -----	037
3.10.4 Ensaio para Avaliar Adesão Celular sobre Proteínas da Matriz Extracelular-----	037
3.10.5 Ensaio para Avaliação da Capacidade da MEC da Medula Óssea Sustentar Proliferação e Sobrevivência Celular <i>in vitro</i> -----	038
3.10.6 Estudos para Avaliação da Influência da MEC da Medula Óssea Associada a Fatores de Crescimento sobre a Proliferação e Sobrevivência Celular <i>in vitro</i> -----	040
3.10.6.1 Ensaios de Interação da MEC a Fatores de Crescimento. -----	040
3.10.6.2 Ensaios de Ligação da MEC a Fatores de Crescimento -----	041
3.11 Análise Estatística -----	042
4 RESULTADOS -----	043
4.1 Processo de Desnutrição -----	043
4.1.1 Análise da Concentração Protéica das Rações -----	043
4.1.2 Peso Corpóreo -----	043
4.1.3 Consumo de Ração-----	043
4.1.4 Proteínas Totais e Albumina Plasmáticas -----	044
4.1.5 Avaliação Histopatológica da medula óssea-----	044
4.2 Expressão de Moléculas de Matriz Extracelular-----	049
4.2.1 Eletroforese de Proteínas da Matriz Extracelular da Medula Óssea em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)-----	049
4.2.2 Western Blott das Proteínas da Matriz Extracelular da Medula Óssea (Fibronectina, Laminina e Trombospondina) -----	052
4.2.3 Avaliação da concentração da Laminina e Fibronectina da MEC da Medula Óssea pelo Ensaio de ELISA -----	056

4.3 Ensaios Biológicos com a Matriz Extracelular da Medula Óssea -----	058
4.3.1 Padronização dos Ensaios de Proliferação Celular com FDC-P1 -----	058
4.3.2 Avaliação da Adesão das Células FDC-P1 sobre Proteínas da Matriz Extracelular-----	060
4.3.3 Avaliação <i>in vitro</i> da Capacidade das Proteínas da MEC Sustentar Proliferação e,ou Sobrevivência de Células FDC-P1 -----	061
4.3.4 Avaliação da Influência da MEC da Medula Óssea Associada a Fatores de crescimento sobre a Proliferação e Sobrevivência Celular <i>in vitro</i> -----	064
4.3.4.1 Avaliação da Interação da MEC a Fatores de Crescimento -----	064
4.3.4.2 Avaliação da Capacidade de Ligação da MEC a Fatores de Crescimento -----	065
 5 DISCUSSÃO -----	 069
 6 CONCLUSÕES -----	 083
 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	 084
 8 ANEXOS -----	 106
8.1 Padronizações e Soluções Utilizadas-----	106
8.2 Análise Descritiva dos Resultados -----	112

LISTA DE ABREVIATURAS

AH: Ácido Hialurônico

BFU-E: Unidade formadora de *burst* de eritrócito

CFU-GEMM: Unidade Formadora de colônia de granulócito, eritrócito, macrófago e megacariócitos

CFU-GM: Unidade Formadora de colônia de granulócito e macrófagos

CFU-M: Unidade Formadora de colônia de macrófagos

CFU-Meg: Unidade Formadora de colônia de megacariócitos

CS: Condroitin sulfato

CSF-S: Unidade Formadora de colônia esplênica

EHS: Engelbreth-Holm-Swarm

EPO: Eritropoetina

FDCEP-mix: Célula obtida da medula óssea de camundongo normal, imortalizada

FDCEP-P1: Célula progenitora da linhagem mielóide, clone da FDCEP-MIX

FGF: Fator de crescimento de fibroblastos

FN: Fibronectina

GAGs: Glicosaminoglicanos

G-CSF: Fator estimulador de colônias granulocíticas

GM-CSF: Fator estimulador de colônias granulocíticas e monocíticas

HS: Heparan sulfato

IL-3: Interleucina-3

KS: Keratan sulfato

LN: Laminina

M-CSF: fator estimulador de colônia de macrófagos

MEC: Matriz extracelular

PGCS: Proteoglicano condroitin sulfato

PGHS: Proteoglicano heparan sulfato

PGs: Proteoglicanos

SCF: Stem cell factor – Fator de célula tronco

TSP: trombospondina

RESUMO

As células sangüíneas originam-se da medula óssea através da célula tronco que sofre processo de proliferação, diferenciação e maturação no microambiente hematopoiético. O microambiente hematopoiético é uma estrutura altamente organizada composta de células estromais, moléculas da matriz extracelular (MEC) e citocinas. A desnutrição protéico-energética diminui a produção de células sangüíneas e interfere na defesa do organismo. Neste trabalho estudamos os efeitos da desnutrição protéica (dieta contendo 4% de caseína) sobre a MEC da medula óssea em camundongos. Avaliamos a composição da MEC através de SDS-PAGE 7,5% e Western blot para Fibronectina (FN), laminina (LN) e trombospondina (TSP). Verificamos a capacidade da MEC aderir e sustentar proliferação da célula mielóide FDC-P1, na ausência e na presença de citocinas (GM-CSF e IL3). Avaliamos também a capacidade de ligação destas citocinas na MEC. O perfil eletroforético mostrou diferenças nas proteínas da MEC do animal desnutrido em relação ao controle. Através da densitometria dos géis observamos nas amostras obtidas do animal desnutrido, maior intensidade nas bandas de peso molecular 220, 182, 108 e 56 KDa em relação ao controle. Em 72 KDa a banda foi mais intensa nas amostras dos animais controles. A banda de 60 KDa foi evidenciada apenas nas amostras obtidas dos animais desnutridos. As bandas de 123 e 49 KDa foram evidenciadas apenas nas amostras dos animais controles. A expressão de FN, LN e TSP foi maior nas amostras obtidas dos animais desnutridos. Os ensaios de adesão e proliferação na presença e ausência de citocinas não apresentaram diferenças significativas entre as amostras. Quando avaliamos a capacidade da MEC ligar-se ao GM-CSF, houve maior interação com a MEC proveniente do animal desnutrido do que a MEC do animal controle. O teste de ligação para o IL3 não mostrou diferenças entre as amostras. Esses achados sugerem que a desnutrição protéica induz modificações na MEC, alterando o microambiente hematopoiético.

Abstract

Blood cells have their origin at the bone marrow through the stem cell which undergoes a proliferation, differentiation and maturation process in the hematopoietic microenvironment. The hematopoietic environment is a highly organized structure formed by stromal cells, extracellular matrix (ECM) molecules, and cytokines. Protein-energy malnutrition reduces the production of blood cells, interfering with the defense of the organism. In the present work we have studied the effects protein malnutrition has on the ECM of bone marrow in mice. We have evaluated ECM composition by means of SDS PAGE 7,5% and Western blot for fibronectin (FN), laminin (LN) and thrombospondin (TSP). We assessed the capacity ECM has in adhesion and support of proliferation of the FDC-P1 myeloid cell both in the absence and in the presence of GM-CSF and IL3 cytokines. We have also measured the binding capacity of these cytokines in the ECM. The electrophoresis profile showed the existence of differences between the ECM proteins in the undernourished animal and the control. Using gel densitometry, we observed in samples from the undernourished animal a greater intensity of bands of 220, 182, 108, 60 and 56 KDa molecular weight as compared to control. At 72 KDa the band was more intense on samples from control animals. The 60 KDa band was evident only on samples taken from undernourished animals. The 123 and 49 KDa bands were evident on control animals only. Expression of FN, LN, and TSP was greater on samples from undernourished animals. Adhesion and proliferation assays, both in the presence and in the absence of cytokines, did not show significant differences among samples. When we evaluated the capacity ECM has to bind to GM-CSF, a greater interaction was seen with the ECM from the undernourished animal than the ECM from the control. Binding test for IL3 showed no differences existed among samples. Such findings suggest protein malnutrition causes alterations of the ECM, modifying the hematopoietic microenvironment.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Hematologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, recebendo auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Contamos com a colaboração do Prof. Dr. Márcio Alvarez da Silva, responsável pelo Laboratório de Neurobiologia e Hematologia Celular e Molecular da Universidade Federal de Santa Catarina, onde foram realizadas importantes etapas deste trabalho.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESNUTRIÇÃO

A desnutrição pode ter origem na deficiência ou ausência de qualquer nutriente e sua instalação e gravidade depende da causa, intensidade e duração da carência. Pode ser causada, primariamente, por dieta inadequada ou, secundariamente, por deficiência na absorção, por um aumento da utilização ou ainda, excreção excessiva de nutrientes. Assim, as formas de desnutrição podem ocorrer simultaneamente (STINNETT, 1983) e, desta maneira, terem quadros carenciais devidos à dietas quanti- e qualitativamente alteradas, originando tipos diversos de desnutrição. A primeira referência da síndrome protéico-calórica foi publicada em 1865 por Hinojosa no México (WATERLOW, 1996). No entanto, a deficiência essencialmente protéica foi definida apenas em 1935 por Williams e foi denominada de Kwashiorkor. Contudo, ainda hoje, a desnutrição protéico-calórica continua sendo causa de elevados índices de mortalidade e morbidade (SCHOFIELD & ASHWORTH, 1996, VEGA FRANCO, 1999).

A desnutrição protéico-calórica ou desnutrição protéico-energética é definida pela Organização Mundial da Saúde como "condição(ões) patológica(s) diversa(s) relacionada(s) com a perda, em várias proporções, de proteínas e calorias" (WHO, 1973), geralmente encontrada em crianças, recém-nascidos abaixo do peso para sua idade gestacional, pacientes hospitalizados, idosos, pessoas com anorexia resultante de neoplasias ou doenças crônicas e pessoas que fazem dietas radicais. Dependendo do grau de desnutrição protéico-energética surgem formas clínicas diversas desta síndrome o que frequentemente, ocasiona dificuldades e confusão na comparação de casos. Contudo, alguns autores reconhecem duas

síndromes: o Kwashiorkor e o Marasmus (WATERLOW & ALLEYNE, 1971; DE ANGELIS, 1977; FERRO-LUZZI & SPADONI, 1978), nas quais ocorrem, respectivamente, deficiência de proteínas e carência, tanto destas, como de calorias (WATERLOW & ALLEYNE, 1971), podendo haver sobreposição, em maior ou menor extensão, de sintomatologia como consequência do predomínio ora do Kwashiorkor, ora do Marasmus (WATERLOW & ALLEYNE, 1971, WATERLOW, 1996).

As desordens nutricionais não estão restritas apenas aos países em desenvolvimento. Embora não existam dados disponíveis precisos, a OMS estima que haja mais de meio bilhão de indivíduos sofrendo de desnutrição de intensidade variável entre moderada e severa e que destes, 10 milhões de pessoas, a maioria crianças, morrem anualmente (COTRAN et al., 1994).

No Brasil, a desnutrição apresenta uma distribuição desigual, sendo que os estados da região Norte e Nordeste, apresentam níveis elevados, entre 23% e 27,3%, de crianças desnutridas, comparando-se a países muito pobres da África, enquanto na região Centro-Sul o percentual de crianças desnutridas cai para 8% a 9%, aproximando-se dos níveis de países com sistemas de saúde e seguridade social como a Costa Rica e o Chile (MONTEIRO, 1995).

1.2 EFEITOS DA DESNUTRIÇÃO NA HEMATOPOIESE

A hematopoiese é um fenômeno complexo e altamente regulado, caracterizado pela contínua liberação de linfócitos (linfopoiese), outros leucócitos (granulo-monopoiese), eritrócitos (eritropoiese) e plaquetas (plaquetopoiese) para a circulação. O controle da proliferação, diferenciação e maturação destas células é influenciado por vários estímulos e pela interação molecular das células com o microambiente da medula óssea, que atuam nos diferentes níveis do processo da hematopoiese (SACHS, 1995). Em termos quantitativos a hematopoiese apresenta uma produção celular alta, em torno de 10^{12} de células sangüíneas/dia/Kg, em adultos. Durante a

ontogênese existem vários locais de formação das células hematopoiéticas. Estudos em camundongos e aves mostraram que durante a fase inicial de desenvolvimento embrionário a hematopoiese acontece na esplanctopleura paraaórtica (CUMANO et al, 1996), na aorta, gônadas e mesonéfrons (MEDVINSKY et al, 1996). Acredita-se que as células mais indiferenciadas do sistema hematopoiético, células tronco ("stem cells"), surgem nestas estruturas e nas ilhas do saco vitelino, entram na circulação embrionária e colonizam o fígado primitivo. O fígado fetal passa a constituir o principal local da hematopoiese durante os primeiros estágios do desenvolvimento embrionário, e posteriormente e em menor escala, baço e timo (DZIERZAK, et al, 1998). A partir do quinto mês gestacional (em humanos) e após o nascimento, a medula óssea passa a ser responsável pela produção das células sangüíneas. Porém, no camundongo adulto a hematopoiese é desenvolvida na medula óssea e baço. Os mecanismos que proporcionam essas mudanças dos locais de produção das células hematopoiéticas ainda não estão bem esclarecidos, podendo acontecer, em parte, pelas alterações no desenvolvimento das células hematopoiéticas (HOUSSAINT & HALLET, 1988) ou no microambiente hematopoiético (SLAPER-CORTENBACH et al.; 1987 FRIEDRICHLH et al., 1996). Desta maneira, há que considerar as interações célula-célula e célula-estroma que ocorrem tanto no microambiente indutor da hematopoiese (TRENTIN, 1971; MORANDAS & PRENANTT, 1978; NARDI & ALFONSO, 1999), como em outras localizações (TRENTIN, 1971; MORANDAS & PRENANTT, 1978); ação dos diferentes fatores de crescimento e interleucinas; ação hormonal - particularmente de estrógenos, andrógenos, hormônios tireoidianos, corticosteróides e a adrenalina; mediadores plasmáticos e celulares da resposta inflamatória e, obviamente, o estado nutricional do indivíduo (ATHENS et al., 1961; PETERS et al., 1972; CHANDRA, 1988). Estes fatores influenciam tanto diretamente como indiretamente a produção e liberação de células sangüíneas para a corrente circulatória, bem como a capacidade destas células executar as suas funções específicas.

O tecido hematopoiético, assim como todos aqueles que exibem alta taxa de renovação e proliferação celular, apresentam elevada exigência de nutrientes. As necessidades de material protéico para a hematopoiese poderiam justificar, por si só, a alta incidência de anemia e leucopenia, em seres humanos, nas situações de desnutrição (BORELLI, 1992). Entretanto, os achados relatados na literatura são muitas vezes conflitantes e podem ser devidos à presença de um quadro multicarenencial e frequentemente, à associação com outros processos patológicos.

O comprometimento da medula óssea em situação de desnutrição, vem sendo estudado desde 1925, quando JACKSON relata a presença de atrofia em elementos medulares. ASIRVADAM, 1948, verificou que a deficiência protéica era acompanhada por atrofia tanto da medula óssea como também do fígado e baço, com depleção de elementos mielóides e linfóides. Estudos histológicos da medula óssea revelaram uma marcada incapacidade, dos animais depletados, em aumentar a produção em situações de necessidade, como também em substituir células perdidas em hemorragia. ASCHKENASY, 1957, relata não haver em situação de desnutrição, aplasia no setor eritóide da medula óssea embora, tenha encontrado atrofia em órgãos linfóides. No entanto, os primeiros relatos sobre leucopenia sanguínea em desnutrição protéica devem-se a ASCHKENASY, 1946, e a KORNBEIG et al, 1946. Embora a resposta dos leucócitos seja variável, as evidências indicam que em situações em que a desnutrição não esteja associada a outras doenças, a leucopenia é a regra (FRIED et al., 1978; CATCHATOURIAN et al., 1980). Dietas hipoproteicas ou com deficiência de aminoácidos essenciais, têm efeito neutropênico e eosinopênico (ASCHKENASY, 1966a).

A carência de proteínas conduz a uma linfopenia sangüínea, com involução de linfonodos, e principalmente de timo e baço (CHANDRA, 1976; CHANDRA & CHANDRA, 1986; CHANDRA, 1991). Devemos lembrar que em outras espécies, outros órgãos além da medula óssea têm função hematopoiética (GEORGE et al., 1985) e, nos casos de roedores, o baço exerce papel importante (BANNERMAN, 1983). Achados de necrópsia em

humanos têm demonstrado significativa alteração no tamanho, peso, arquitetura e celularidade desses órgãos (CHANDRA, 1997). XAVIER em 1999, encontrou em medula óssea de camundongos desnutridos, uma acentuada hipoplasia com alterações arquiteturais associado à degeneração gelatinosa.

A severa desnutrição produz diversos efeitos a nível celular e alguns resultados experimentais indicam perda ou redução na proliferação celular de vários órgãos (ORTIZ, 1984) sugerindo-se que a desnutrição possa prolongar o tempo de proliferação das células na medula óssea (BETANCOURT et al., 1989). CHANDRA, 1980, encontrou em crianças desnutridas, diminuição da transformação blástica de linfócitos frente a mitógenos.

Lesões em órgãos de alta taxa de renovação protéica são uma característica em Kwashiorkor e algumas situações podem ser produzidas, experimentalmente, em animais. FRIED et al, 1978, verificaram que em camundongos submetidos à dieta isenta de proteínas e irradiação, em seguida sendo utilizados como receptores em ensaios de colônias esplênicas, apresentaram redução no número de unidades formadoras de colônias (CFU) - tanto no baço como da medula óssea - seguidos de redução das células maduras do sangue. SUDA et al., 1976, colocam que, em condições basais, a cinética celular nos animais desnutridos é normal apesar da redução do "pool" medular; porém, sob estimulação inflamatória, a resposta celular neutrofilica é menor nos animais desnutridos, devido talvez, a redução no "pool" de reserva da medula óssea.

FRIED et al., 1978 e ORTIZ, 1984 mostraram que a capacidade de proliferação da medula óssea e do baço em camundongos desnutridos está diminuída, havendo redução no número de células pluripotentes (CFU-S), ocorrendo também, prolongamento no tempo de proliferação das células da medula óssea, contudo, ASCHKENASY, 1975, relatou o encontro de celularidade normal. A produção das células mielóides encontra-se comprometida segundo SUDA et al, 1976 e FRIED et al., 1978; e mais recentemente, BORSATO & BORELLI, 1999, em ensaios clonogênicos

relatam redução do número de CFU-GM, nas culturas de progenitores hematopoiéticos obtidos da medula óssea de camundongos desnutridos, embora estes últimos ensaios tenham sido realizados *in vitro*, os autores consideraram um provável reflexo da hipoplasia observada *in vivo*.

A proliferação e diferenciação em células de mamíferos são eventos controlados por glicoproteínas extracelulares solúveis, conhecidas genericamente por citocinas (ARAI et al., 1990). Entre as principais citocinas regulatórias da hematopoiese, encontram-se: o fator de células tronco ("stem cell factor", SCF), interleucinas 1,2 (IL-1, IL-2), fatores de formação de colônias de granulócitos e macrófagos ("granulocyte-macrophage colony stimulating factor", GM-CSF), de macrófago (M-CSF) e de granulócitos (G-CSF) e fator de necrose tumoral (TNF) (METCALF, 1992), entre outros.

Existem trabalhos demonstrando os efeitos da desnutrição em relação à atuação das citocinas. Alguns dados existentes indicam redução de IL-1 (DRABIK et al., 1987) e de IL-2 (CHANDRA & CHANDRA, 1986, CHANDRA, 1997). Esta redução poderia ser um dos mecanismos pelos quais a desnutrição induziria a uma falha na imunocompetência (KLASSING, 1988). Entretanto, BRABLEY et al., (1990) encontraram concentrações normais para IL1 e para o TNF em mulheres desnutridas.

Estudos têm demonstrado que a desnutrição protéico-calórica pode alterar vários aspectos da resposta inflamatória. GARCIA & BARBIÉRI, 1986, observaram que a desnutrição protéica influencia a função fagocitária de neutrófilos. BORELLI et al, 1995, no modelo de lamínula implantada no tecido subcutâneo de camundongos desnutridos, observou hipoplasia medular e esplênica e redução na migração de células inflamatórias; SOUZA et al, 2000, observaram em camundongos submetidos a dieta hipoprotéica, alterações na adesão e atividade fungicida de macrófagos, frente a *Candida albicans*. BORELLI & NARDINELLI, 2000, constataram um decréscimo na capacidade do "burst" respiratório de macrófagos peritoniais, provenientes de camundongos com desnutrição protéico-calórica. Assim, vários mecanismos de defesa do hospedeiro podem estar comprometidos em estados de desnutrição protéico-calórica, predispondo o indivíduo às

infecções. A literatura (CHANDRA & CHANDRA, 1991) relata ainda que tanto seres humanos como animais desnutridos apresentam elevada incidência de processos infecciosos com maiores índices de mortalidade. Um número relativamente grande de estudos têm sido realizados na tentativa de compreender quais os mecanismos que levam a este aumento na susceptibilidade às infecções, dentre os quais destacamos o comprometimento do sistema imune específico e inespecífico, sendo este último o responsável pelas respostas iniciais do organismo frente a quaisquer tipos de agressões. BORELLI et al, 1998, encontraram alteração na expressão de fibronectina em macrófagos peritoniais, provenientes de camundongos submetidos à dieta hipoprotéica, e consequentemente modificações adesivas nestas células. Embora relatos na literatura (GARCIA & BARBIERI, 1986; BORELLI, et al 1992; BORELLI et al, 1998), mostrem que em processos carênciais ocorram alterações de migração e, ou adesão celular, muitos mecanismos comprometidos nesta função celular, permanecem obscuras.

A literatura nos dias atuais ainda necessita de maiores informações, sobre os efeitos da desnutrição no processo da hematopoiese. Observamos que, houve um avanço em relação ao conhecimento sobre a produção e função das células de defesa do organismo, no entanto, o que acontece com o microambiente envolvido na proliferação celular, nos estados de desnutrição, permanece obscuro.

1.3 BIOLOGIA DO MICROAMBIENTE HEMATOPOIÉTICO

Em mamíferos adultos, a hematopoiese suporta seu espaço natural primariamente na medula óssea. A produção de células sangüíneas em um padrão constante depende de componentes do microambiente presente na cavidade medular. Sob certas condições ou em determinados animais como os roedores, o baço também atua como órgão hematopoiético, indicando que no baço também existe condições de hematopoiese. Durante as últimas

três décadas estudos *in vitro* e *in vivo* permitiram avanços significativos na compreensão da biologia do microambiente. O microambiente hematopoiético é uma estrutura altamente organizada que regula a localização e fisiologia da “stem cell” hematopoiética. O microambiente hematopoiético é composto de células de estroma (fibroblastos, macrófagos, células endoteliais, adipócitos-like), células acessórias (linfócitos T, monócitos), e seus produtos (matriz extracelular e citocinas) (MAYANI et al., 1992), que fornecem suporte mecânico para adesão e desenvolvimento das células hematopoiéticas pluripotentes, assim como para células não hematopoiéticas, como as do sistema vascular da medula (OPAS, 1994). Além da manutenção estrutural do tecido, o microambiente também contém citocinas que influenciam a atividade hematopoiética, controlando a proliferação e diferenciação das células tronco (EAVES et al., 1991; BRACH & HERRMANN, 1991).

Desta forma os requerimentos para a hematopoiese são fornecidos pelas células do estroma medular e sua matriz extracelular que formam microambientes indutivos (TRENTIN, 1978; DEXTER & TESTA, 1980). O microambiente indutivo é mais usualmente aplicado aos fatores que atuam em associação com o estroma do que fatores que atuam a distância e que teriam um papel permissivo ao invés de regulatório (BENTLEY, 1982; METCALF, 1993). Portanto, o microambiente indutivo pode controlar a hematopoiese através da: (i) produção e secreção local de citocinas pelas células do estroma, (ii) co-localização de citocinas para as células-tronco nos locais de contato célula-célula e, ou célula-matriz extracelular ou (iii) estímulo direto pelo contato celular (METCALF, 1993b; OPAS, 1994; NARDI & AFONSO, 1999).

O conhecimento sobre as citocinas que regulam a diferenciação hematopoiética foi em grande parte obtido *in vitro* com o uso de populações celulares enriquecidas em células pluripotentes tratadas com citocinas purificadas ou recombinantes (TESTA, 1991; HOLTMANN & RESCH, 1995). Pouco ainda se sabe sobre a regulação e requerimentos de citocinas para a hematopoiese *in vivo*, uma vez que a indução da hematopoiese *in vitro*, com

o uso das citocinas recombinantes nem sempre representa o fenômeno *in vivo*. A necessidade do estroma medular para a manutenção da hematopoiese demonstra que o microambiente contém as citocinas necessárias para a auto renovação e sobrevivência das células tronco pluripotentes, assim como sua diferenciação para linhagens sanguíneas e que as citocinas produzidas pelo estroma agem em pontos específicos do complexo sistema de diferenciação hematopoiética (ARAI et al., 1990; OPAS, 1994).

Estudos realizados com células do estroma medular mantidas *in vitro* capazes de induzir a proliferação de células tronco hematopoiéticas, não demonstram níveis detectáveis, quando analisadas pelo “Northern Blot”, de citocinas como Interleucina-3 (IL-3) ou GM-CSF, capazes de atuar no controle da proliferação e diferenciação de células-tronco, assim como na geração de células precursoras mielóides (GREGORY et al., 1991). Os dados sugerem que: a produção e secreção de GM-CSF pelas células do estroma ocorra em níveis muito menores que a quantidade necessária para se obter a indução de colônias, *in vitro*, quando comparamos os requerimentos da citocina obtidos em situações experimentais. Algumas citocinas produzidas pelo estroma, como IL-3 e/ou G-CSF não são produzidas de modo constitutivo, devendo ter atuação em etapas específicas do desenvolvimento hematopoiético (EAVES et al., 1991). O GM-CSF pode controlar a hematopoiese em um estágio mais avançado na sua escala de diferenciação, enquanto a IL-3 atua nos estágios mais primitivos. Sugere-se que as citocinas produzidas estejam compartimentalizadas na superfície celular ou em componentes específicos da matriz extracelular regulando a hematopoiese e deste modo apesar da sua baixa produção, estas citocinas podem atuar com eficiência (ARAI et al., 1990).

Estudos *in vitro* sugerem que anormalidades do microambiente hematopoiético podem estar implicados nas manifestações de certas enfermidades hematológicas tais como anemia aplástica e leucemia mielóide crônica e aguda. Portanto, a caracterização da estrutura e função do microambiente hematopoiético humano pode ter importância na

compreensão e tratamento das diferentes enfermidades hematológicas (MAYANI et al., 1992).

1.3.1 FATORES DE CRESCIMENTO HEMATOPOIÉTICO

As citocinas constituem um grupo heterogêneo de peptídeos que atuam como mensageiros, ou reguladores, e sob essa nomenclatura envolvem os termos interleucinas, linfocinas, monocinas, interferons, fatores estimuladores de colônia e fatores de crescimento. As citocinas hematopoiéticas regulam o compartimento de células sangüíneas. Alguns fatores de crescimento foram denominados de fatores estimuladores de colônia (CSF) pela capacidade de estimularem a proliferação e formação de colônias celulares *in vitro* (DEXTER, et al., 1990). No entanto, atualmente, sabe-se que a proliferação, sobrevivência, diferenciação e maturação de progenitores hematopoiéticos são também regulados por uma combinação de fatores estromais da medula óssea e fatores de crescimento (DEXTER & SPOONCER, 1987). Desta forma a compartimentalização da hematopoiese, onde a interação citocina, MEC e célula progenitora hematopoiética formam verdadeiros “nichos hematológicos” (DEXTER & SPOONCER, 1987; LOWRY, 1995).

Certos fatores de crescimento hematopoiéticos possuem ação sobre linhagens mais restritas como o G-CSF, M-CSF, eritropoetina (EPO), e IL-5. Estas citocinas estimulam as divisões mitóticas finais e a maturação celular terminal dos progenitores hematopoiéticos diferenciados, progenitores estes que estão comprometidos com a produção celular, dentro de uma única linhagem sangüínea. Em alguns casos estes CSFs também ativam as funções efectoras das células maduras finais naquela linhagem. Além dos fatores linhagem específicas alguns fatores estimulam a proliferação de células progenitoras comprometidas com mais de uma linhagem, ou mais primitivas. Nesta classe encontram-se o GM-CSF, o SCF e a IL-3. A IL-3 tem ação sobre as CFU-GM, BFU-E, CFU-Meg e unidade formadora de colônia

de granulócito, eritrócito, macrófago e megacariócito (CFU-GEMM), caracterizando sua atividade também sobre progenitores mais primitivos já comprometidos com a linhagem mielóide. O SCF tem um modesto efeito independente, tendo, contudo, um potente efeito sinérgico com outras citocinas para os progenitores mais primitivos (LOWRY, 1995). Outros fatores de crescimento hematopoiético, IL-1 e IL-6, possuem pouca atividade estimulante de colônia intrínseca mas atuam com efeito sinérgico, em combinação com outros CSF, aumentando o desenvolvimento de colônias *in vitro* (MAZUR & COHEN, 1989; SOCOLOVSKY, et al, 1999), na verdade não existe citocina inteiramente linhagem específica (SOCOLOVSKY, et al, 1999).

Os fatores de crescimento hematopoiéticos, assim como outras citocinas, não apresentam atividade enzimática intrínseca. Eles exercem seus efeitos através da ligação a receptores específicos associados a membrana celular. Os receptores de citocinas são glicoproteínas, que ligam especificamente à citocinas e traduz seus sinais. Alguns receptores para os fatores de crescimento hematopoiético pertencem a família de receptores tirosina-quinase, como é o caso dos receptores para SCF e M-CSF. Entretanto, a maioria dos receptores fatores de crescimento hematopoiético, pertencem a superfamília de receptores de citocinas, entre estes estão a EPO, GM-CSF, G-CSF, IL-3, IL-1, IL-5, IL-6 e outros (SOCOLOVSKY, et al, 1999).

Os receptores de citocinas são glicoproteínas com um domínio extracelular N-terminal, um único domínio hidrofóbico atravessando a membrana e um domínio citoplasmático C-terminal. Todos os receptores deste grupo apresentam pelo menos uma região homóloga no domínio extracelular que é necessária à ligação do fator de crescimento (SOEDEBOBOK & TOWN, 1997).

O primeiro evento produzido por uma citocina quando se liga ao receptor é a indução da interação entre as cadeias do receptor. Alguns receptores de fatores de crescimento hematopoiéticos formam complexos heteroméricos envolvendo duas ou três cadeias diferentes do receptor,

sendo o caso dos receptores para as interleucinas 2,3 e 5 e GM-CSF. Outras estruturas de receptores, por exemplo dos receptores para G-CSF e EPO, formam complexos homodiméricos na ligação do fator de crescimento (BAGLEY et al, 1997). Embora estes receptores não apresentem atividade tirosina quinase intrínseca, sua ação está frequentemente associada com uma rápida fosforilação de proteínas celulares em resíduos de tirosina (WATANABE & ARAI, 1995; SOCOLOVSKY, et al, 1999).

Alguns fatores como IL-3, IL-5 e GM-CSF compartilham a mesma cadeia beta, no entanto a cadeia alfa é específica para cada fator. O uso compartilhado de subunidades dos receptores dentro das subfamílias de citocinas fornece a base molecular para pleiotropia (KISHIMOTO et al., 1994).

A associação da citocina com a primeira cadeia do receptor resulta em uma ligação de baixa afinidade, com uma conversão para uma ligação de alta afinidade ocorrendo após a interação deste primeiro complexo com a segunda cadeia do receptor (DANOVA & AGLIETTE, 1997). A ligação da citocina a cada cadeia do receptor é um processo sequencial, portanto, concentrações altas de uma determinada citocina, podem resultar em uma atividade antagonista.

O GM-CSF induz a um aumento na taxa de proliferação em progenitores comprometidos, *in vivo*, como demonstrado pelo aumento significativo no número de CFU-GM e percentual de precursores medulares reconhecidos morfológicamente em fase S. Foi demonstrado que o tratamento com GM-CSF quase triplica a produção medular de células grânulo-monocíticas. Embora a expansão das linhagens grânulo-monocíticas seja o efeito mais evidente da administração do GM-CSF, outras linhagens mielóides, como a eritróide e megacariocítica, também respondem ao tratamento (BURGESS & METCALF, 1980).

O tratamento com IL-3 afeta a proliferação da medula óssea por aumentar o percentual de progenitores em fase S do ciclo celular. O efeito é dose dependente, com várias células progenitoras apresentando diferentes graus de sensibilidade. Células progenitoras purificadas, provenientes de

pacientes tratados com IL-3, produzem maior número de colônias *in vitro* na presença de G-CSF, IL-5, GM-CSF. Isto indica que a IL-3 atua essencialmente como um *primer* da ação de outras citocinas (DANOVA & AGLIETTE, 1997).

Uma variedade de linhagens celulares ("*cell lines*") dependente de citocinas e derivadas de células leucêmicas, ou de culturas de medula óssea de longa duração, ou ainda por imortalização de célula primária hematopoiética, tem sido útil para o estudo de receptores e seus respectivos ligantes (SOCOLOVSKY, et al, 1999). Linhagens celulares mielóides originadas de medula óssea murina, tais como FDCP-mix, FDCP-1, DA-1, são dependentes de IL-3 e/ou GM-CSF (ARNAUD, et al, 1985), portanto, vem sendo empregadas como recursos valiosos para identificação de citocinas e outras moléculas biologicamente ativas (DELARCHE & CHOLLET-MARTIN, 1999). Estes ensaios, devido a alta sensibilidade, embora realizados *in vitro*, proporcionam investigações que seriam impossíveis pelos métodos imunológicos atuais.

As células precursoras de linhagens sanguíneas, assim como os fatores de crescimento que influenciam o seu desenvolvimento estão representados esquematicamente na figura 1.

Figura 1. Diferenciação das células mielóides e linfóides na hematopoiese. O esquema demonstra o papel das citocinas no controle das diferentes etapas da hematopoiese. O “pool” de células tronco pluripotentes se compartimentaliza na medula óssea e pode se auto renovar pela combinação de citocinas específicas (IL-1, IL-6, SCF), ou originar precursores linfóides e mielóides. A geração de precursores linfóides é pouco compreendida, enquanto que os precursores mielóides podem ser induzidos por IL-3 e GM-CSF (CLARK, et al, 1992; OGAWA, 1993). EPO eritropoetina, LT linfócito T, LB linfócito B, Ba basófilo, Eo eosinófilo, Neu neutrófilo, M monócito, P plaquetas, E eritrócito.

1.3.2 MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular (**MEC**) pode ser definida como a organização supramolecular de diversas proteínas estruturais e polissacarídeos, compreendendo colágenos, glicoproteínas não colagênicas, proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs), elastina e ácido hialurônico (SCOTT, 1992; SCHUPPAN & RÜHL, 1994), que preenchem os espaços extracelulares, dando suporte aos tecidos. As proteínas podem ser divididas em dois grupos principais: as estruturais - como o colágeno e a elastina, e as adesivas - como a fibronectina (FN) e a laminina (LN). Os principais tipos de moléculas da MEC da medula óssea estão listados na **tabela 1**. Já foi demonstrado que os componentes da MEC podem controlar eventos como adesão celular, migração e proliferação de diferentes células. As células do estroma hematopoiético depositam no meio extracelular componentes como colágeno tipo I e III (BENTLEY et al., 1984), fibronectina (FN), laminina (LN) (CAMPBELL et al., 1985), trombospondina (TSP) (LONG & DIXIT, 1990), hemonectina (PETERS et al., 1990), proteoglicanos e ácido hialurônico (KEATING & GORDON, 1988; SICZKOWSKIC et al., 1993), produzidos principalmente pelos fibroblastos e distribuídos em um emaranhado organizado em íntima associação com a superfície da célula que a produziu (ALBERTS, 1994). Estes componentes geram portanto a MEC do estroma medular.

Até recentemente considerava-se a matriz extracelular como sendo um suporte inerte destinado a estabilizar a estrutura física dos tecidos. Atualmente está claro que a matriz apresenta um papel muito mais ativo e complexo, regulando o comportamento das células em contato com a própria matriz, influenciando o desenvolvimento, a migração, a proliferação, função e a forma celular (KLEIN, 1995).

A célula tronco pluripotente depende de interações com os elementos do microambiente para a auto-renovação e diferenciação. Há uma particular necessidade da MEC e das citocinas produzidas pelas células do estroma. CAMPBELL et al., 1985, demonstraram que células de estroma medular

colocadas em placas previamente recobertas com uma preparação obtida de MEC da medula óssea, são capazes de se organizar rapidamente na cultura. No estroma organizado, se observou um estímulo na proliferação de células hematopoiéticas, cerca de oito vezes superior aos controles colocadas diretamente sobre o plástico da cultura. Este dado demonstra a importância da MEC na formação do microambiente medular.

As interações regulatórias entre o microambiente medular e as células progenitoras hematopoiéticas, parecem ser determinadas pelo reconhecimento mútuo e por processos de adesão celular. No curso da maturação das células hematopoiéticas há a expressão ordenada de glicoproteínas de membrana: as integrinas que determinam a sua interação com componentes de MEC (NATHAN & SPORN, 1991; HYNES, 1992). Mudanças nas propriedades citoadesivas das células progenitoras são capazes de modular diferentemente a resposta celular aos sinais de proliferação e diferenciação: células firmemente aderidas são mais sensíveis à exposição de citocinas (OGAWA, 1993; MOORE et al., 1994). Por outro lado a perda da adesão celular é responsável pela liberação das células maduras para a circulação (TAVASSOLI & MINGUELL, 1991; HARD & MINGUELL, 1993). As células hematopoiéticas precursoras expressam receptores para FN determinando sua ancoragem à matriz. Durante o desenvolvimento eritróide a expressão de integrinas para FN é perdida na fase de exonucleação da célula, resultando em perda da adesão celular ao estroma (TAVASSOLI & MINGUELL, 1991; CLARK et al., 1992). Estes dados demonstram o papel polifuncional da MEC do estroma na interação de células precursoras hematopoiéticas. A interação das células hematopoiéticas com este sistema dinâmico pode ser crítico para a amplificação celular e sua diferenciação em linhagens sanguíneas. Sugere-se que as citocinas produzidas estejam “compartimentalizadas” na superfície celular ou em componentes específicos da matriz extracelular regulando a hematopoiese, deste modo apesar da sua baixa produção, estas citocinas podem atuar com eficiência (Arai et al., 1990). Para demonstrar os efeitos

biológicos da MEC, são utilizadas também as linhagens celulares, FDGP-1 e DA-1 (Alvarez-Silva et al., 1993, 1996).

Tabela 1 – Componentes da MEC produzidos pela células estromais da medula óssea.

Família MEC	Componente	Referência
Glicoproteínas	Fibronectina	KLEIN, 1995; YOSHIKAWA, 1996
Não colagênicas	Laminina	KLEIN, 1995; GU, et al, 1999
	tenascina	KLEIN, 1995
	Hemonectina	PETERS et al, 1990
	Trombospondina	LONG & DIXIT, 1990
Proteoglicanos/	Ácido Hialurônico	KLEIN, 1995; OGURI et al, 1987
Glicosaminoglicanos	Heparan sulfato	KLEIN, 1995; OGURI et al, 1987
	Condroitin sulfato	KLEIN, 1995; OGURI et al, 1987
	Dermatan sulfato	KLEIN, 1995
Glicoproteínas	Colágeno tipo I	BENTLEY et al; 1984 KLEIN, 1995
Colagênicas	Colágeno tipo III	BENTLEY et al; 1984 KLEIN, 1995
	Colágeno tipo IV	KLEIN, 1995; FERNÁNDEZ & MIINGUELL, 1996
	Colágeno tipo V	KLEIN, 1995; FERNÁNDEZ & MIINGUELL, 1996
	Colágeno tipo VI	KLEIN, 1995; FERNÁNDEZ & MIINGUELL, 1996
	Colágeno tipo XIV	KLEIN, 1998.

Os colágenos fazem parte de uma grande família de proteínas cuja característica principal é a sua estrutura longa, rígida e que se organizam em uma fita-tripla helicoidal. A fita tripla é formada por três cadeias polipeptídicas de colágeno, chamadas cadeias α , as quais são enroladas umas nas outras, formando um tipo de corda supertorcida. Os colágenos

são ricos em prolina, a qual estabiliza a estrutura helicoidal, e em glicina, que por ser o menor aminoácido, compacta esta estrutura (ALBERTS et al, 1994).

Em um mesmo indivíduo existem colágenos estruturalmente e geneticamente distintos, sendo encontrado 19 tipos diferentes nos organismos vertebrados. Estas estruturas foram subclassificadas (ALBERTS et al, 1994, MAYANI et al, 1993): a) Colágenos tipos I, II, III, V e XI, constituem os colágenos fibrilares; b) Colágenos IV (colágeno de membrana basal), VIII e X, são formadores de rede; c) Colágenos tipos IX, XII e XIV representam os colágenos associados a fibrilas com tripla hélice interrompida; e existem ainda outros colágenos como os tipos VI, VII e XIII. Os colágenos mais abundantes no organismos são o tipo I, presente na pele, tendão, ossos e pigmentos, o tipo II presente em cartilagens e o tipo IV importante constituinte da membrana basal.

Na medula óssea, existe deposição de colágenos para formar a MEC, graças à síntese realizada principalmente por fibroblastos e célula endotelial que fazem parte do microambiente hematopoiético (MAYANI et al, 1992). Vários tipos de colágenos, incluindo o tipo I, III, IV e VI são produzidos pelas células estromais de medula óssea (KLEIN, 1995, FERNÁNDEZ & MIINGUELL, 1996). Recentemente KLEIN et al, em 1998, demonstraram a presença do colágeno tipo XIV, em material obtido de medula humana, através de técnicas de imunofluorescência e “imunobloting”. NILSSON et al, em 1998, mapearam a distribuição de proteínas da MEC em femur de camundongo. Os autores demonstraram que no endóstio localizavam-se colágenos tipos I e IV, onde as células tronco hematopoiéticas apresentam maior afinidade. No perióstio detectaram colágenos tipos III e IV. Nos vasos da medula óssea encontraram apenas o tipo IV e no osso colágenos tipos I e IV.

Colágenos tipos I e VI possuem propriedades adesivas para célula hematopoiética, e a natureza do receptor aparentemente não está relacionada com a via integrina, sendo provavelmente um proteoglicano transmembrânico, possivelmente o heparan sulfato (KLEIN, 95). Estes dados

demonstram a importância da MEC na distribuição das células hematopoiéticas na medula óssea.

A fibronectina é a mais freqüente glicoproteína adesiva do organismo encontrada na MEC, em diversos fluídos corporais como plasma, líquidos amniótico, seminal e sinovial (ALBERTS, et al., 1994). Sua molécula é constituída de duas unidades de cadeias peptídicas de 200 a 250 kDa, unidas por pontes de dissulfeto próximas à extremidade carboxiterminal, contém seqüência RGD (seqüência dos aminoácidos: arginina, glicina, ácido aspártico) e apresenta vários domínios globulares ligados por cadeias polipeptídicas flexíveis, sendo que cada domínio possui uma especificidade de ligação (YAMADA, 1983). A seqüência RGD é a parte principal do sítio de ligação celular. A FN pode ser sintetizada pelas células estromais da medula óssea (KLEIN, 1995), sendo ainda encontrada como produto de secreção de alguns tipos de células mantidas em cultura. Macrófagos humanos (ALITALO, 1980) e de camundongos (JOHANSON, 1980) secretam fibronectina sem contudo, depositá-la em torno de si, diferentemente do fibroblasto. ALITALO & JOHANSON, 1980, que observaram que os macrófagos mantidos em cultura secretam fibronectina para o meio. JOHANSON, 1980 propuseram que a FN promoveria a diferenciação dos monócitos em macrófagos, no local da agressão tecidual.

Devido ao processo pelo qual seqüências de introns são removidas por excisão de moléculas de RNA, no núcleo, durante a formação do RNA mensageiro ("splicing alternativo"), a FN existe em uma variedade de isoformas (FRENCH-CONSTANT, 1995). Esta molécula está presente na forma solúvel no plasma, e na forma insolúvel na MEC das células do tecido conectivo e na membrana basal (HYNES, 1990). Fibronectina está envolvida na adesão e maturação da linhagem de eritrócitos (KLEIN, 1995). Os processos de adesão também envolvem a participação de receptores específicos para células hematopoiéticas. Muitas proteínas de superfície com funções adesivas podem ser identificadas nas células hematopoiéticas. Adesão da célula progenitora para FN via integrina $\alpha 5 \beta 1$ pode controlar o

crescimento da célula hematopoiética, inibindo apoptose da célula primitiva (YOSHIKAWA & SAKIHAMA, 1996) ou controlando a hematopoiese negativamente. O controle negativo na hematopoiese pode inibir proliferação citocina-induzida de linhagem mielóide (KLEIN, 1995).

A Laminina é uma outra glicoproteína importante da matriz extracelular na medula óssea. A LN é o maior componente não colagenoso da membrana basal. Um protótipo de LN bastante conhecido é a molécula laminina-1 derivada de tumor murino EHS (Engelbreth-Holm-Swarm), a qual consiste de três cadeias de polipeptídeos, $\alpha 1$ (400kDa), $\beta 1$ e $\gamma 1$ (com aproximadamente 220kDa), que se organizam na forma de uma cruz assimétrica e mantida unida através de pontes de dissulfeto (CHUNG, 1995). Até o momento já foram propostos 11 variantes para a LN (GU et al, 1999), sendo provavelmente tecido específica e funcionalmente diferentes. Assim como para FN, uma variedade de atividades biológicas foram descritas para LN. Estas atividades incluem interações com colágeno tipo IV, entactina, e proteoglicano heparan sulfato, ligação para MEC e regulação de desenvolvimento celular e diferenciação (KLEIN, 1995, YUCHENCO ET AL, 1994). NILSON et al, 1999, analisaram a localização da LN em cortes histológicos da medula óssea. Os autores demonstraram que a deposição de laminina é intensa nos sinusóides, vasos e arteríolas, fraca na medula central e ausente no endósteo. Entretanto, a composição e função da LN na medula óssea, não estão totalmente esclarecidas. Ensaio de imunohistoquímica, Western blot e imunoprecipitação realizados em cortes de tecido da medula, ou em cultura de longa duração, ou em extrato de estroma da medula, detectaram a presença de laminina-1, sendo que a reação foi positiva para cadeia $\beta 1$ e $\gamma 1$, mas não para $\alpha 1$ (KLEIN, 1995). Ensaio realizado com a laminina-1 derivada de tumor murino EHS, mostraram uma adesão muito fraca para células de leucemia mielóide crônica, e para as células progenitoras hematopoiéticas (UFB-E e UFC-GM) a adesão foi maior, porém ineficaz (KLEIN, 1995). Recentemente, GU et al, em 1999, mostraram através de análise de Northern blot, a presença de

laminina-2, laminina-8 e laminina-10 na medula óssea. Ensaios *in vitro* utilizando célula hematopoiética multipotente FDCP-Mix, mostraram maior adesão para laminina-10, do que para laminina-1 (GU et al, em 1999). Maiores investigações são necessárias para avaliar a natureza e função da laminina no microambiente hematopoiético.

A trombospondina também é uma glicoproteína multifuncional. Sua estrutura é homotrimérica de 450 Kda, consistindo de subunidades idênticas as quais são covalentemente entrelaçadas em seus grupamentos amino-terminais por pontes de dissulfetos, e contém uma sequência RGD no grupamento carboxiterminal de cada subunidade. Esta molécula é sintetizada e secretada por uma variedade de células incluindo plaquetas, fibroblastos, célula de músculo liso e célula endotelial e está envolvida na adesão celular e ligação par outros componentes como GAGs sulfatados, fibrinogênio e FN (BORNSTEIN, 1992, LAWLER & HYNES, 1987). A TSP é abundante no microambiente da medula óssea e pode agir como ligante adesivo para o desenvolvimento de células hematopoiéticas (KLEIN, 1995). Células progenitoras hematopoiéticas (CFU-GEMM) e progenitores comprometidos (BFU-E, CFU-GM) adere para TSP. Durante diferenciação, os granulócitos quanto mais maduros menos adesão para TSP; os eritroblastos enquanto desenvolvem, perdem a capacidade adesiva indicando que os receptores para TSP são reguladores negativos para células hematopoiéticas (LONG et al, 1990). Proteoglicanos ligados na membrana celular podem mediar adesão para regiões do grupamento amino terminal nas subunidades de TSP (ASCH, et al, 1990). Ensaios com a célula HL60 demonstrou que os receptores para TSP são regulados durante a diferenciação celular, aumentando a expressão dos receptores no processo de maturação (SUGAHARA et al, 1994).

A TSP em combinação com a citocina, SCF, pode agir sinergisticamente na adesão de células progenitoras hematopoiéticas, provavelmente favorecendo a formação de colônia (LONG et al, 1990). Estes dados sugerem que uma citocina específica associada com um componente

da MEC pode atuar como um sinal complexo comum para o desenvolvimento da hematopoiese.

Proteoglicanos (PGs) envolvem uma extensa família de moléculas contendo uma ou mais cadeias polissacarídicas sulfatadas: os glicosaminoglicanos (GAGs), que encontram-se ligadas de modo covalente a um núcleo protéico (GALLAGHER, 1989a). Os GAGs podem associar-se às diversas proteínas oriundas do complexo de Golgi ou já presentes na membrana celular, formando PGs. Os quatro principais grupos de GAGs: ácido hialurônico (AH), condroitin sulfato (CS), heparan sulfato (HS) e heparina e o keratan sulfato (KS), distinguem-se por seus resíduos de açúcar, pelo tipo de ligação entre seus resíduos e pelo número e localização de seus grupos sulfato. Com exceção do AH, todos os outros encontram-se associados às proteínas formando proteoglicanos (KOLSET & GALLAGHER, 1990).

A importância dos PGs para a hematopoiese foi primeiramente demonstrada de maneira indireta por SPOONCER et al (1983): a adição de beta D-xilosídeos em culturas de medula óssea foi capaz de induzir um aumento no número das células de medula óssea, com aumento no número das células tronco pluripotentes, das precursoras e também de células maduras. O xilosídeo atua como “promotor” artificial para a síntese da cadeia do GAG, que pode ser alongado na ausência da parte protéica da molécula. As cadeias de GAGs são assim secretadas sob a forma solúvel em grandes quantidades. Ao se perturbar a síntese do PG com o xilosídeo, perturbamos as interações célula-microambiente, onde proteoglicanos parecem desempenhar papel importante na regulação da hematopoiese. OGURI et al., 1987, demonstraram que aproximadamente 79% do conteúdo de GAGs da medula óssea consiste em CS, localizado exclusivamente na MEC, 16% de AH e 5% de HS.

As citocinas são moléculas de glicoproteínas que agem como fatores de diferenciação e proliferação celular em mamíferos (ARAI et al., 1990). GORDON et al. (1987) demonstraram que o GM-CSF recombinante (GM-

CSFr) e o GM-CSF purificados são capazes de se ligar *in vitro* a uma preparação de GAGs obtida da matriz extracelular de medula óssea. Neste trabalho se demonstrou que as citocinas não se ligam aos GAGs obtidos de uma preparação de fígado fetal (os GAGs foram obtidos de fígados com eritopoiese ativa). Este resultado sugere que há especificidade tecidual na ligação GAG-citocina. Os autores concluíram que uma importante função para os GAGs da matriz extracelular da medula óssea pode ser a de compartimentalizar as citocinas produzidas localmente pelas células do estroma e “apresentá-las” sob forma biologicamente ativa para as células progenitoras hematopoiéticas (KEATING & GORDON, 1988).

O proteoglicano HS (PGHS) da matriz medular deve atuar em sinergismo com citocinas no controle da hematopoiese, uma vez que a produção de linhagens sanguíneas específicas é controlada pela interação das células progenitoras com citocinas específicas (KOURY & BOUDURANT, 1993; METCALF 1993). A associação da citocina com o PGHS, pode ter diversas funções. SAKSELA et al., (1988) demonstraram que a interação do Fator de Crescimento de Fibroblasto (FGF) com HS é capaz de protegê-lo da degradação enzimática, portanto a estabilização das citocinas hematopoiéticas pode ser resultante da interação com HS. Uma outra função seria a de concentrar a citocina hematopoiética na sua forma biologicamente ativa, aumentando a sua concentração local, impedindo ou dificultando assim sua difusão através do tecido (KEATING & GORDON, 1988).

A produção local de GM-CSF em baixas concentrações, pelo estroma medular, como determinado pelos estudos de RT-PCR, sugere a validade do modelo da formação do complexo citocina-PGHS (ALVAREZ-SILVA, 1996). Possivelmente, o complexo pode acumular-se dentro da MEC, sendo assim concentrado localmente, protegido da degradação enzimática. A alta concentração local da citocina associada com PGHSs pode, dentro do microambiente indutivo, ser suficiente para manutenção da hematopoiese em seus níveis normais. Podemos inferir que este controle rígido seja um dos passos regulatórios da hematopoiese. Estudos de LUIKART et al., 1990,

parecem apoiar esta teoria. Os autores demonstraram que a maturação de células de leucemia promielocítica humana (HL-60) é mediada pelo PGHS extraído da MEC da medula humana. É provável que a preparação de MEC obtida, estivesse associada com citocinas.

BRUNO et al., 1995 trabalharam com PGHS, trombospondina e citocinas e, concluíram que PGHS cooperativamente interage com ambos, fatores de crescimento e proteínas da MEC, desta forma aumenta a localização da célula progenitora dentro do microambiente hematopoiético.

Os proteoglicanos exercem importância na apresentação de citocinas no microambiente medular podendo ser feita através de moléculas de heparan sulfato proteoglicanos, presentes na matriz extracelular ou na membrana do estroma, permitido assim, um rígido controle para a hematopoiese (LOWRY, 1995, ALVAREZ-SILVA et al., 1993; ALVAREZ-SILVA & BOROJEVIC, 1996). A colocação de citocinas-PGs pode ser responsável pela compartimentalização espacial exata do microambiente hematopoiético (ALVAREZ-SILVA et al., 1994).

O ácido hialurônico (**AH**), é um GAG também produzido pelas células estromais da medula óssea, é o único GAG que não forma PG e não é sulfatado (GALLAGHER et al, 1983). O papel do AH, na hematopoiese é menos conhecido. SICZKOWSKI et al, 1993, mostrou que culturas de células estromais tratadas com metilprednisona, reduzem a síntese de ácido hialurônico, embora não afetassem a produção dos PGs sulfatados. Este estroma alterado exibiu uma maior capacidade de ligar e estimular células formadoras de colônia hematopoiética. Embora o exato efeito molecular ainda seja assunto de especulação, SICZKOWSKI observou que o PGCS e ácido hialurônico em determinados níveis exercem efeito agregante, sugerindo que o AH regula a disponibilidade do PGs sulfatados para interação com componentes da MEC e que HA livre não tem capacidade para ligar-se a fibronectina e colágeno, sem antes estar ligado ao PGCS. Assim a quantidade de AH produzido pelas células estromais pode ser um processo inicial para a organização da MEC. Trabalhos mais recentes

(KHALDOYANIDI et, 1999) demonstram a importância do AH no microambiente da medula óssea através do tratamento de culturas de medula óssea de longa duração com hialuronidase (enzima que degrada AH). Na cultura tratada houve redução da produção de células maduras e progenitoras e a adição de AH exógeno reverteu processo, indicando que o AH participa da ativação da sinalização celular através de seu receptor CD44. O AH também participa da liberação de citocinas no estroma medular (KHALDOYANIDI et, 1999).

1.4 MATRIZ EXTRACELULAR E DESNUTRIÇÃO

A interação parênquima-matriz tem papel relevante na manutenção da homeostase, particularmente nos tecidos hematopoiéticos. Os estudos relacionados anteriormente sobre desnutrição e hematopoiese, mostram evidências a respeito de alterações na produção e/ou distribuição de proteínas da MEC. No entanto, ainda dispomos de poucos registros a respeito desse assunto. LIRA et al, 1993, em estudo histológico em timo obtido da necrópsia de crianças desnutridas, através de análise ultraestrutural e imunohistoquímica, observaram um aumento na densidade da MEC. Esta matriz densa contendo FN, colágeno tipo IV e LN, foi considerada responsável pela depleção dos timócitos, ocasionando morte de células já consignadas. REIF et al., 1993, analisaram quantitativamente a MEC hepática pelo ensaio "DOT BLOT" para os mesmos componentes elucidados na referência anterior e observaram que tanto o peso orgânico como os componentes da matriz diminuíram, porém na relação proteína/tecido não houve diferenças significativas, sugerindo que o principal efeito foi a infiltração gordurosa causando esteatose hepática, mas que a MEC foi preservada. No entanto, nos trabalhos anteriores realizados pelo grupo não foi observado histologicamente a presença de esteatose, em ratos (GARCIA & BARBIERI, 1986) e camundongos (BORELLI et al, 1995). GARCIA, 1992, evidenciou em baço de camundongos mantidos sob dieta

hipoprotéica sinais de fibroplasia ao redor da polpa branca. XAVIER, 1999, encontrou em camundongos desnutridos, espessamento da MEC esplênica, às custas do aumento de colágeno, elastina e fibronectina, e degeneração gelatinosa da medula óssea.

Para outros tecidos não hematopoiéticos, também são escassas as referências envolvendo estudos sobre desnutrição e MEC. Em relação aos proteoglicanos e desnutrição encontramos alguns trabalhos realizados através análises cromatográficas os quais referem-se aos aspectos bioquímicos da mineralização óssea, inferindo que a desnutrição leva a síntese de proteoglicanos de peso molecular mais elevado e isso acarretaria uma inibição da calcificação (MAIWA, et al., 1990; AXELSSON et al., 1990). GRESSENS et al, 1997, estudou os efeitos da desnutrição sobre o cérebro durante o desenvolvimento intra-uterino em ratos; os autores encontraram alterações arquiteturais e produção retardada de AH, que normalizou-se na vida adulta e aumento de MAP-1 (proteinoquinase ativada por mitógeno-1, enzima envolvida na cascata de sinalização celular), que manteve-se alterada.

BORELLI et al, 1995, em modelo de desnutrição experimental, encontrou hipoplasia da medula óssea e retardo na mobilização de células inflamatórias frente a implantes de lamínulas subcutâneas. Diante destes resultados, os autores levantaram hipóteses em relação à alterações a nível do microambiente hematopoiético, sugerindo possíveis modificações na adesão, migração e liberação de células de defesa da medula óssea para o sangue periférico e tecidos. Estes achados, somados as modificações arquiteturais na medula óssea encontradas por XAVIER em 1999, serviram de base para a elaboração de um projeto tendo como objetivo avaliar alguns aspectos relacionados ao microambiente indutor da hematopoiese, em modelo de desnutrição.

A relevância da compreensão das conseqüências da deficiência calórico-protéica, se deve ao alto índice desta enfermidade entre a população, esta deficiência pode ser decorrente tanto da dieta quanto de outros fatores desencadeantes, tais como: pacientes hospitalizados em

geral, pacientes portadores de leucemias sob quimioterapia (YU, et al, 2000), com imunodeficiência adquirida (AIDS) (BELL, et al, 1997), com anorexia, idosos (LOUAY OMRAN & MORLEY, 2000), e outros. Por outro lado, um estudo abordando aspectos do microambiente hematopoiético em modelo de hipoplasia da desnutrição, pode abrir possibilidades para a compreensão dos mecanismos regulatórios da hematopoiese. Este estudo tem como propósito iniciar algumas investigações relacionadas à MEC da medula óssea. Considerando que, as moléculas da MEC participam dinamicamente do microambiente indutor da hematopoiese, pequenas modificações nestas moléculas poderiam resultar em desequilíbrio do sistema.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar os efeitos da desnutrição protéica sobre a MEC da medula óssea de camundongos submetidos, experimentalmente, à desnutrição protéica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Quantificar as proteínas da MEC (FN, LN e TSP), provenientes da medula óssea dos animais desnutridos.
- 2- Avaliar a capacidade da MEC proveniente dos animais desnutridos em sustentar proliferação e, ou sobrevivência de células hematopoiéticas *in vitro*.
- 3- Avaliar a capacidade da MEC proveniente dos animais desnutridos em modular os efeitos biológicos do IL-3 e GM-CSF, em relação à proliferação de células mielóides *in vitro*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Em nosso modelo de desnutrição experimental foram utilizados, no total 133 camundongos Swiss Webster (*Mus domesticus*), machos, de 2 a 3 meses de idade, provenientes de colônias mantidas pelo Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina.

3.2 Rações

Utilizamos a caseína (IKAB Chemical B.V. Germany) como fonte protéica das rações, por ser considerada a fonte mais completa, pela variedade de aminoácidos presentes e facilidade de absorção (IN93). A ração contendo 20% de caseína foi considerada como basal (FRIED, 1978) e destinada a alimentar os animais do grupo controle (QUADRO 1, RAÇÃO I) e a ração hipoprotéica, contendo 4% de caseína (MUÑOZ, 1981) foi destinada ao grupo desnutrido (QUADRO I, RAÇÃO II). A mistura salina e a mistura vitamínica foram preparadas de acordo com as recomendações da IN93 (REEVES et al, 1993). As rações foram produzidas em nosso laboratório na forma de granulado e conservadas em congelador a -4°C até o momento de uso. A concentração protéica presente nas rações foi analisada pela determinação do nitrogênio através do método micro-Kjeldhal, segundo Normas Técnicas do Instituto Adolfo Lutz, 1967.

QUADRO 1

Composição Percentual das Rações

COMPONENTES	RAÇÃO I (CONTROLE)	RAÇÃO II (HIPOPROTEICA)
CASEÍNA	20	4
MISTURA SALINA	4	4
MISTURA VITAMÍNICA	1	1
SACAROSE	10	10
ÓLEO DE SOJA	8	8
FIBRA (CELULOSE)	1	1
AMIDO q.s.p.	100	100

As rações foram complementadas com 0,15% de metionina e 0,2% de colina. Acrescentamos às rações 1% de ácido bórico como conservante.

Mistura salina -

Fosfato de Cálcio*:473,0 g; Carbonato de Cálcio*:166,0 g; Fosfato de Sódio (dibásico)*:116,0 g; Cloreto de Sódio*: 66,0 g; Cloreto de Potássio*:116,0 g; Sulfato de Magnésio*: 50,0 g; Sulfato de Manganês*: 4,17 g; Citrato Férrico Amoniacal*: 3,33g; Carbonato de Zinco*: 2,17g; Sulfato de Cobre*: 0,17g; Iodeto de Potássio*: 0,17g; Sacarose q.s.p.:1000 g

Mistura Vitamínica -

Cloridrato de Tiamina**:0,5 g; Riboflavina**:0,6 g; Pantotenato de Cálcio**:1,5g; Vitamina B12**:0,0025 g; Vitamina B 6**:0,6 g; Vitamina A**:400 UI; Vitamina D (D3)**:100 UI; Vitamina E*:7,5 UI; Vitamina K (K3)*:0,075g UI; Biotina**:0,02 g; Acido Fólico**:0,2 g; Acido Ascórbico*:100,0g; Acido Nicotínico*:3,0 g; Inositol+:100,0 g; Bitartarato de Colina+:2,5g; Acido Para-aminobenzóico*:10,0 g; Sacarose q.s.p.:1000,0 g

* Merck Chemical S.A.

** Sigma Chemical Company, USA.

+ Botica Veado D'Ouro, São Paulo, Brasil.

3.3 Indução da Desnutrição

Após pesagem prévia, os animais foram distribuídos em gaioleiros metabólicos. Inicialmente os animais passaram por um período de adaptação ao isolamento e a ração experimental, sendo que nesta fase os dois grupos receberam a ração controle, durante aproximadamente 15 dias. Após este período de adaptação, os animais foram separados em 2 grupos: Grupo Nutrido ou Controle (C), que recebeu ração contendo 20% de caseína (Ração I) e o Grupo Desnutrido (D), alimentado com ração contendo 4% de caseína (Ração II). O peso dos animais e seu consumo de ração foram monitorados a cada 48 horas durante todo o experimento, adaptação e desnutrição (aproximadamente 4 semanas). Os dois grupos permaneceram sob as mesmas condições ambientais (temperatura de 20°C e ciclo de luz de 12 horas), recebendo água e as respectivas rações "ad libitum". A avaliação do estado nutricional dos animais foi feita através da determinação do peso corporal, do consumo de ração, determinação das concentrações de proteína e albumina plasmáticas.

A coleta das amostras foi realizada após perda de peso corporal, nos animais do Grupo Desnutrido, de cerca de 20% do peso inicial, que aconteceu por volta de 14 dias recebendo a dieta hipoprotéica.

3.4 Coleta de Sangue para a Determinação Proteínas Totais e Albumina plasmáticas

As amostras de sangue dos camundongos, previamente anestesiados com éter etílico, foram obtidas através de punção cardíaca, utilizando-se heparina (Liquemine®) 50 UI/ml como anticoagulante. O sangue foi posteriormente centrifugado e o plasma separado e utilizado para a determinação proteínas plasmáticas pelo método do Biureto (GORNALL et al., 1949), e a albumina através do corante verde de bromo cresol. As

amostras foram processadas em duplicatas e as leituras realizadas em Cobas Mira, (Roche).

3.5 Obtenção da Matriz Extracelular para Determinação de Fibronectina, Laminina e Trombospondina.

Para obtenção da MEC, três soluções foram avaliadas na fase de padronização (Guanidina, PETERS et al, 1995; Uréia, ALVAREZ-SILVA et al, 1996; PBS, PETERS et al, 1995, todas acrescidas de inibidores de proteases), e optamos pela solução contendo PBS recomendada por PETERS et al, 1995, por demonstrar através de eletroforese, maior rendimento na extração de proteínas de 180 a 220 kDa. A MEC da medula óssea foi obtida dos femures como descrito por PETERS et al, 1995. Nos animais previamente anestesiados, após a coleta de sangue descrita no item anterior, e após deslocamento cervical, a MEC foi obtida através da lavagem do canal medular com PBS 0,02M (0,5 mM de fosfato ácido de sódio; 1,9 mM de fosfato dibásico de sódio; 17,9 mM de cloreto de sódio), pH 7,3, contendo 10 mM de ácido capróico, 1 mM de benzamidina-HCL, 1 mM de metilsulfonilfluoreto (PMSF), (todos da Sigma Chemical Co., USA), a 4°C, empregando-se por volta de 20 µl da solução por femur. As preparações foram centrifugadas a 2500g por 15 minutos (4°C), recolhendo-se o sobrenadante contendo proteínas solúveis da MEC. Uma vez que a medula óssea presente em camundongos é relativamente pequena, constituímos “pool” com os sobrenadantes obtidos de grupos de 5 a 10 animais. As amostras foram dialisadas, acondicionadas em tubos plásticos e mantidas em freezer -20°C até o momento do uso.

3.6 Coleta e processamento histológico de esterno dos camundongos.

Para avaliação em microscopia de luz, os tecidos colhidos dos animais experimentais foram imersos em fixador Carnoy, permanecendo nessa solução por 60 minutos, sendo em seqüência transferidos para solução de álcool 70° até processamento de cortes histológicos. Em seguida foi realizada a coloração de rotina Hematoxilina e Eosina. Esta etapa foi processada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, pelo prof. Dr. José Guilherme Xavier.

3.7 Diálise

Os sobrenadantes obtidos no item 3.5 foram transferidos para membranas de diálise (Sigma®) com poro de exclusão de 12.000 dalton e dialisados contra PBS seguidas por três trocas no período de 24 horas, a 4°C. O extrato dializado foi aliquotado e mantido em freezer -20°C até o momento do uso.

3.8 Dosagem de Proteínas Totais da Matriz Extracelular.

Após diálise, a dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método de BRADFORD et al, 1997, sendo utilizada albumina bovina (Sigma®) como padrão.

3.9 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

3.9.1 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) foi realizada sobre um gel de alinhamento de 4% e de 7% para o gel de separação de acordo com o sistema de LAEMMLI (LAEMMLI, 1970) . As amostras de MEC obtidas conforme itens **3.4** e **3.5** tanto de animais controles como desnutridos foram preparadas com tampão contendo dietildeitol (DDT), glicerol, SDS na proporção de 1 parte de tampão para 4 partes das amostras, deixando-se em ebulição durante 5 minutos. As amostras foram então aplicadas no gel e mantidas por 3 horas em cuba de corrida e transferência Mini-V8.10 da Gibco BRL, utilizando-se 100 volts e 50 mA através da fonte Gibco BRL-250EX. O gel foi corado com 0,2% de azul de coomassie R-250 (Sigma®) durante 30 minutos, e descorado, durante 12 horas com solução contendo 50% de metanol e 10% de ácido acético. A determinação do peso molecular foi realizado com base na migração obtida pelas frações utilizando-se padrões de calibração (Pharmacia Biotech, SP). Foram aplicadas em cada poço, 45µg de proteína obtida da matriz da medula.

3.9.2 Western Blott para Determinação de Fibronectina, Laminina e Trombospondina

A transferência elétrica das proteínas da MEC presentes no gel SDS-PAGE para membrana de nitrocelulose foi realizada em cuba de corrida e transferência Mini-V8.10 da Gibco BRL por 1h e 30 minutos utilizando-se fonte Gibco BRL-250 EX a 145 mA e 40 Volts (TOWBIN et al, 1979). A transferência foi realizada com 45 µg de proteínas/poço, corridas em tiras de SDS-PAGE. O padrão de calibração da Gibco® (Bench Mark Prestained

Protein Ladder) pré-corado foi utilizado para monitorar o sistema de transferência. A membrana de nitrocelulose foi removida e incubada por 1 hora a temperatura ambiente em tampão Tris com tween (TBS-T) pH 7,5 contendo 5% de leite desnatado em pó molico. A seguir realizou-se a imunoidentificação: anticorpos primários de coelho ou anti-fibronectina (DAKO–A 0245, na diluição 1:5000), ou anti-laminina, (anticorpo gentilmente cedido pelo prof. Dr. Vivaldo Moura Neto, UFRJ, na diluição 1:500), ou ainda anti trombospondina, (anticorpo cedido gentilmente pela profa. Dra. Verônica Morandi, UFRJ, na diluição de 1:750), foram incubados durante 12 horas a 4°C. Após a incubação as membranas foram lavadas com TBS-T; incubou-se durante 2 horas a 37°C com o anticorpo secundário anti-coelho IgG-biotinilado (B-7389, Sigma®, na diluição de 1:3000) e finalmente estreptoavidina peroxidase (E-2886, Sigma®, na diluição 1:3000) por 1 hora a temperatura ambiente. A imunodeteção foi realizada pelo método de luminescência (ECL, Amersham Life Science, UK). Os reagentes foram incubados durante 1 minuto sobre a nitrocelulose e a película X-Omat film (Sigma®) foi exposta por 30 segundos. Alternativamente a membrana foi lavada com TBS-T e submetidas a reação DAB (diaminobenzamida, Sigma®), por aproximadamente 2 minutos.

Análise Densitométrica

A análise densitométrica foi realizada através de imagens obtidas de “scanner” dos gels de SDS-PAGE ou com filmes de raio X do “Western blot”, ou ainda das membranas reveladas com DAB em Microsoft Photo Editor Scanner. As imagens foram analisadas e a área das bandas quantificadas com Scion Image Program of National Institutes of Health, modificado para Windows. Realizamos uma curva padrão linear com 0,5 – 5 µg de albumina (Fração V, Sigma), fibronectina (1,5 µg Gibco) laminina (1µg, Gibco) e a concentração de proteína obtida por análise densitométrica foi calculada com o programa graphPad Prism, com intervalo de confiança de 95%.

3.9.3 Determinação de Fibronectina e Laminina da MEC pelo Ensaio de ELISA

A MEC obtida conforme o descrito nos itens **3.4** e **3.5**, tanto de animais controles como desnutridos foi incubada a 4°C por 12 horas com volume total de 50µl/poço. Posteriormente a preparação foi lavada 2 vezes com PBS pH7,5, em seguida foi incubada com 100µl/poço em solução de bloqueio (PBS com 0,05% de tween pH 7,5 contendo 1% de leite desnatado em pó molico) por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir realizou-se a imunoidentificação: o anticorpo primário de coelho anti-fibronectina (DAKO®–A0245, na diluição 1:5000), ou anti-laminina, (cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto, UFRJ, na diluição 1:500) foi incubado durante 2 horas. Posteriormente lavou-se três vezes com PBS-T (Tween), e incubou-se com o anticorpo secundário anti-coelho IgG-peroxidase (Sigma®, diluição 1:3000) por 1 hora. A imunodeteção foi realizada pelo peróxido de hidrogênio e OPD. Paralelamente realizou-se uma curva padrão incubando-se fibronectina ou laminina (Gibco®) na faixa de 5 a 100ng/poço. Os testes foram realizados em triplicata e a reação foi quantificada em leitor de ELISA ELx 800 Bio Tek instruments a 490 nm. Para calcular as concentrações das amostras realizamos a curva de regressão linear através do Instat-2.

3.10 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.10.1 Coleta de Matriz Extracelular para Ensaios de Adesão e sobrevivência celular.

A extração das moléculas de MEC para os ensaios biológicos (Adesão e viabilidade) foi realizado conforme item **3.5**, porém adicionado-se apenas aprotinina (Sigma®) na proporção de 1µg/ml de PBS, como inibidor de protease. Importante salientar que para estes ensaios, o material foi colhido em ambiente estéril através de fluxo laminar.

3.10.2 Viabilidade Celular das Culturas:

A viabilidade das culturas durante a preparação das células para o experimento foram monitoradas através do teste de exclusão do Trypan Blue 1%.

3.10.3 Cultura de Células

A linhagem celular FDC-P1 (ATCC, CRL12103, linhagem mielóide murina) utilizada neste trabalho foi obtida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas, *in vitro*, em número de $3-10 \times 10^5$ células/ml em garrafas de cultura (Costar, Cambridge, MA) contendo meio Dulbecco's de alta concentração de glicose e contendo glutamina (DMEN, Sigma®, ST Louis, MO), tamponado com 2g/l de HEPES e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cutilab, Brasil). Sendo a FDC-P1 dependente de citocinas foi mantida com 10% de meio condicionado da linhagem celular WEHI-3B como fonte de IL₃. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ com trocas de meio de cultura a cada 72 horas. Trabalhamos com células provenientes de aproximadamente 4 trocas de meio.

3.10.4 Ensaios para Avaliar Adesão Celular sobre Proteínas da Matriz Extracelular

Para os ensaios de adesão celular utilizamos o extrato obtido a partir do protocolo item **3.10.1** contendo as proteínas solúveis da MEC. Como modelo utilizamos a célula FDC-P1, linhagem mielóide. A MEC foi então pré-incubada em placas de 96 poços em concentrações de 0,1 a 5µg de proteínas totais, obtidas da MEC proveniente da medula óssea do femur de animais do Grupo Controle e Desnutrido, durante 12 horas a 4°C. Os poços foram então lavados com PBS pH7,4 e incubados por 1 hora a 37°C, com

100 µl de albumina bovina 2% (BSA) (Sigma®, St Louis, MO) em PBS pH 7,4 e posteriormente lavados com PBS pH 7,4. Adicionou-se 50µl de uma suspensão de 10^5 células/ml (DMEM, D5523, Sigma® Chemical Company, USA) a cada um dos poços, sendo então as placas mantidas durante 3 hs, a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. Após esse período, as células não aderentes foram removidas com três lavagens sucessivas de PBS pH 7,4. As células aderentes foram então fixadas com 30µl de paraformaldeído 4% (Sigma®, St. Louis, MO) por 10 minutos em temperatura ambiente e coradas com 50µl de cristal violeta 0,5% (Merck®, S.A, Indústrias Químicas) em 20% de metanol (Merck®, S.A, Indústrias Químicas) (SHIOYA et al.,1995). A seguir, as placas foram novamente lavadas por três vezes com PBS pH 7,4 e o corante eluído com 50µl de citrato de sódio 0,1 M, pH 4,2 em 50% de etanol (SEGAT et al, 1994). A absorbância de cada poço foi determinada utilizando leitor de ELISA ELx 800 Bio Tek instruments com filtro de 540nm.

3.10.5 Ensaio para Avaliar a Capacidade da MEC da Medula Óssea em Sustentar Proliferação e Sobrevivência Celular *in vitro*.

Para os ensaios de proliferação e sobrevivência celular utilizamos o ensaio colorimétrico com base na redução do sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromo tetrazolio, Sigma®) pela desidrogenase mitocondrial para um produto de reação MTT-formazan de cor azul escuro (MOSMANN, 1983).

a) Ensaios utilizando proteínas da MEC fixadas a substrato plástico: Placas de 96 poços (NUNC™) foram **pré-incubadas com MEC** obtida da medula óssea do animal controle e do desnutrido em concentrações que variaram de 0,1 a 5 µg em cada poço e mantidas durante 12 horas a 4°C. Os poços foram então lavados com PBS, pH 7,4 e adicionou-se $2,0 \times 10^4$ /células da linhagem FDC-P1 viáveis em cada poço. Todo experimento foi realizado em condições assépticas. As placas foram

incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂ durante 72 horas. Após esse período, foi adicionado 10 µl de MTT por poço e as placas foram incubadas novamente na estufa de CO₂ durante 4 horas. Posteriormente, foi adicionado SDS a 10% em PBS contendo 0,4N de HCL. Depois de 12 horas a absorbância de cada poço foi determinada utilizando leitor de ELISA ELx 800 Bio Tek Instruments com filtro 540 nm. Como controle positivo do experimento, utilizou-se 500 pg/ml de IL3r (RD Systems) de camundongo e 2,0 X 10⁴ célula/poço e como controle negativo, incubamos a apenas a suspensão de células. A proliferação celular foi expressa em termos de absorbância. Os testes foram realizados em quadruplicata.

b) Ensaio utilizando proteínas da MEC em solução. Nas placas de 96 poços (NUNC™) incubou-se 2,0 X 10⁴ /células da linhagem FDC-P1 viáveis em cada poço, **a seguir adicionou-se MEC** obtida da medula óssea de animais controles e desnutridos em concentrações que variaram de 0,1 a 2,0 µg. Todo experimento foi realizado em condições assépticas. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂ durante 72 horas. Após esse período, foi adicionado 10 µl de MTT em cada poço e as placas incubadas novamente na estufa de CO₂ durante 4 horas. Posteriormente, foi adicionado SDS a 10% em PBS contendo 0,4 N de HCL. Depois de 12 horas a absorbância de cada poço foi determinada utilizando leitor de ELISA ELx 800 Bio Tek Instruments com filtro 540 nm. Como controle positivo do experimento, utilizou-se 500 pg/ml de IL3r (RD Systems, de camundongo) e 2,0 X 10⁴ célula/poço e como controle negativo, incubamos a apenas a suspensão de células. A proliferação celular foi expressa em termos de absorbância. Os testes foram realizados em quadruplicata.

3.10.6 Estudos para Avaliar a Influência da MEC da Medula Óssea associada a Fatores de Crescimento sobre a Proliferação e Sobrevivência Celular *in vitro*

3.10.6.1 Ensaio de Interação da MEC a Fatores de Crescimento

a) Ensaio de interação dos fatores de crescimento com a MEC fixa ao substrato plástico: Placas de 96 poços (NUNC™) foram **pré-incubadas com MEC** obtida da medula óssea de animal controle e desnutrido em concentrações que variaram de 0,1 a 1 µg em cada poço e mantidas durante 12 horas a 4°C. Os poços foram então lavados com PBS, pH 7,4 e adicionou-se $2,0 \times 10^4$ /células da linhagem FDC-P1 viáveis em cada poço. Todo experimento foi realizado em condições assépticas. A seguir foi acrescentado GM-CSFr ou IL3r, nas concentrações de 10 ou 500 pg/poço. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂ durante 72 horas. Após esse período, foi adicionado 10 µl de MTT por poço e as placas incubadas novamente na estufa de CO₂ durante 4 horas. Posteriormente, foi adicionado SDS a 10% em PBS contendo 0,4N de HCL. Depois de 12 horas a absorbância de cada poço foi determinada utilizando leitor de ELISA ELx 800 Bio Tek Instruments com filtro 540 nm. Como controle positivo do experimento, utilizou-se 500 pg/ml, GM-CSFr e, ou IL3r (RD Systems de camundongo) e $2,0 \times 10^4$ célula/poço e como controle negativo, incubamos apenas a suspensão de células. A proliferação celular foi expressa em termos de absorbância. Os testes foram realizados em quadruplicata.

b) Ensaio de interação dos fatores de crescimento com a MEC solúvel: Nas placas de 96 poços (NUNC™) incubou-se $2,0 \times 10^4$ /células da linhagem FDC-P1 viáveis em cada poço, **a seguir adicionou-se MEC** obtida da medula óssea de animal controle e desnutrido nas concentrações de 0,1 e 0,5 µg de proteína total. Todo experimento foi realizado em condições

assépticas. A seguir foi acrescentado 10pg IL3r. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂ durante 72 horas. Após esse período, foi adicionado 10 µl de MTT por poço e as placas foram incubadas novamente na estufa de CO₂ durante 4 horas. Posteriormente, foi adicionado SDS a 10% em PBS contendo 0,4N de HCL. Depois de 12 horas a absorbância de cada poço foi determinada utilizando leitor de ELISA ELx 800 Bio Tek instruments com filtro 540nm. Como controle positivo do experimento, utilizou-se 500 pg/ml de IL3r (RD Systems) de camundongo e 2,0 X 10⁴ célula/poço e como controle negativo, incubamos apenas a suspensão de células. A proliferação celular foi expressa em termos de absorbância. Os testes foram realizados em quadruplicata.

3.10.6.2 Ensaios de Ligação da MEC a Fatores de Crescimento

A MEC, obtida da medula óssea de animal controle e desnutrido, foi pré-incubada na placa de 96 poços na concentração de 1µg em cada poço durante 12 horas a 4°C com objetivo de formar um filme no fundo do poço, após este período de adesão da MEC sobre a placa, lavamos três vezes com PBS, em seguida adicionamos 500 pg/ml de GM-CSFr ou IL3r (RD Systems, de camundongo) sobre a MEC. Incubamos durante 2 horas a 37°C. As placas foram então lavadas e adicionamos 2,5 X 10⁴ células em cada poço. Todo experimento foi realizado em condições assépticas. Incubamos em estufa a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂ durante 72 horas. Após esse período, foi adicionado 10 µl/poço e as placas foram incubadas novamente na estufa de CO₂ durante 4 horas, e posteriormente adicionado SDS a 10% em PBS contendo 0,4N de HCL. Depois de 12 horas a absorbância de cada poço foi determinada utilizando leitor de ELISA com filtro 540nm. Como controle positivo do experimento, utilizamos 500 pg/ml citocinas recombinantes, GM-CSF e IL3 (RD Systems) de camundongo e 2,0 X 10⁴ célula/poço, e como controle negativo, incubamos apenas a suspensão

de células. A proliferação celular foi expressa em termos de absorbância. Os testes foram realizados em quadruplicata.

3.11 Análise estatística.

A análise estatística foi realizada empregando-se o Programa INSTAT-2. A verificação dos níveis de significância foi feita através do teste *t* de student e o teste não paramétrico Mann-Whitney. Foram considerados significativos os níveis obtidos a partir de $p < 0.05$.

NOTA: Para facilitar a visualização todos os gráficos e demais resultados foram apresentados nos seus valores médios e desvios padrão, independente do teste estatístico aplicado.

4 RESULTADOS

4.1 Processo de Desnutrição

4.1.1 Análise da Concentração Protéica das Rações

Os resultados, em valores médios, da análise da concentração protéica das rações empregadas para alimentar os grupos de animais utilizados nos ensaios foram em média de 16,96 % a 19,30% para a ração I e 3,26 a 5,32% para a ração II, n=4.

4.1.2 Peso Corpóreo

Os animais desnutridos apresentaram significativa perda de peso corpóreo, passando de $37,77\text{g} \pm 2,38$ no início da desnutrição para $27,95\text{g} \pm 0,44$ no final do experimento (26% de perda). Enquanto que os animais controles praticamente mantiveram o seu peso (Figura 2).

4.1.3 Consumo de Ração

Os animais alimentados com a Ração II (hipoprotéica), apresentaram consumo diário menor que os controles. Os animais desnutridos tiveram um consumo diário que variou de $3,5\text{g} \pm 0,68$ a $1,6\text{g} \pm 0,87$, sendo o menor consumo no final do experimento, enquanto que os animais controles tiveram um consumo que variou de $2,5\text{g} \pm 0,52$ a $4,95\text{g} \pm 0,76$ (Figura 3).

4.1.4 Proteínas Totais e Albumina Plasmáticas

Os animais Desnutridos demonstraram valores médios significativamente inferiores tanto para proteínas totais como para albumina quando comparados aos respectivos controles. O grupo desnutrido apresentou $4,72\text{g/dL} \pm 1,17$ de proteínas totais e $2,34\text{g/dL} \pm 0,82$ de albumina e o grupo controle apresentou $5,95\text{g/dL} \pm 0,40$ e $3,10\text{g/dL} \pm 0,42$ respectivamente (Figura 4).

4.1.5 Avaliação Histopatológica da Medula Óssea

Os animais desnutridos demonstraram uma acentuada redução na celularidade medular (Figuras 5 e 6). Nos seios venosos observou-se marcada dilatação, assemelhando-se a “lagos medulares” de material fracamente acidofílico. Em associação, observou-se uma marcação acidofílica disposta entre os elementos hematopoiéticos, constituindo provavelmente a chamada degeneração gelatinosa da medula óssea.

Figura 2 - Curva de peso médio dos camundongos submetidos ao processo de desnutrição. Valores monitorados a cada 48 horas durante um período de 14 dias. A diferença da variação do peso corpóreo entre camundongos pertencentes ao grupo controle (n=64) e grupo desnutrido (n=69), foi significativa $p < 0,0001$, no final do experimento (Teste t de Student paramétrico). O valor de n representa o número de animais em 5 experimentos independentes.

Figura 3 – Resultado, em valores médios do consumo diário de ração de camundongos submetidos ao processo de desnutrição. Valores monitorados a cada 48 horas durante período de 14 dias. A diferença entre o consumo de ração hipoprotéica (4% de caseína) nos animais desnutridos e animais controle (20% de caseína), foi significativa $p=0,0152$ (Teste de Mann-Whitney). Curva representativa de 4 experimentos independentes.

Figura 4 - Concentração de proteínas totais e albumina no soro dos animais submetidos às dietas 20% de caseína (Grupo Controle) e dieta hipoproteica com 4% de caseína (Grupo Desnutrido). Os resultados representam o valor médio de 19 amostras de soro, colhidas de camundongos de cada grupo experimental. Todos resultados apresentam diferenças significativas aplicando-se teste *t* de Student ($p=0,0089$ para proteínas totais e $p=0,0262$ para albumina).

4.1.5 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA

Figura 5 – Corte histológico de esterno de camundongo controle em coloração Hematoxilina Eosina (HEX40).

Figura 6 – Corte histológico de esterno de camundongo desnutrido em coloração Hematoxilina Eosina (HEX40), mostrando hipoplasia medular com degeneração gelatinosa.

4.2 Expressão de moléculas de Matriz Extracelular

4.2.1 Eletroforese de proteínas da Matriz Extracelular Celular da Medula Óssea em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para análise do perfil de proteínas totais solúveis da MEC obtida dos extratos da medula óssea de camundongos desnutridos e controles, foi realizada SDS-PAGE 7,5% (Figura 7). Considerando-se que a concentração de proteínas totais aplicadas nos poços do gel SDS-PAGE foi a mesma para ambos os grupos experimentais, a intensidade das bandas pode refletir o aumento ou redução na expressão de proteínas específicas, dos animais desnutridos em relação ao controle. O peso molecular das bandas obtidas de SDS-PAGE foram determinados e a intensidade das bandas foram medidas através da densitometria (Tabela 2).

Na Tabela 2 observamos que ocorre sobreposição de bandas de peso molecular aproximado de 220, 200, 182, 144, 127, 108, 72 e 56 kDa nas amostras dos animais desnutridos e controles, no entanto houve diferenças quantitativas. Ainda na Tabela 2 verificamos que na eletroforese em SDS-PAGE da MEC da medula óssea obtida de animais controles há presença de proteínas com peso molecular em torno de 123 e 49 kDa, proteínas estas ausentes na MEC obtida de animais desnutridos. Entretanto, no extrato oriundo da medula óssea de animais desnutridos verificamos a presença da banda com 60 kDa (tabela 2), proteína esta ausente na MEC da medula óssea de camundongos controles.

Figura 7: Perfil eletroforético em SDS-PAGE obtido de proteínas da MEC da medula óssea de camundongos desnutridos (**D1, D2 e D3**), controles (**C1, C2, C3 e C4**) de diferentes grupos de animais e padrão de peso molecular (**P**). Em cada poço de SDS-PAGE foi aplicado 45µg de proteínas totais. Após a corrida as bandas foram medidas e o peso molecular determinado. Nós observamos diferenças na intensidade das bandas protéicas entre os grupos analisados. Perfil representativo de três experimentos independentes.

Tabela 2: Expressão das proteínas da MEC da medula óssea de camundongos dos grupo controles e desnutridos.

Peso Molecular (KDa)	MEC Controle (cm²)	µg/45µg	MEC Desnutrido (cm²)	µg/45µg
220	0,06	0,12	0,34	1,25
200	0,15	0,48	0,61	2,33
182	0,35	1,28	0,90	3,54
144	0,38	1,41	0,34	1,25
127	0,19	0,64	0,34	0,25
123	0,26	0,93	-	-
108	0,50	1,89	0,98	3,83
85	0,14	0,44	0,12	0,36
72	0,49	1,85	0,23	0,87
60	-	-	0,57	2,17
56	5,01	20,02	5,55	22,20
49	0,63	2,41	-	-

Dados obtidos a partir da análise densitométrica da SDS-PAGE, figura 7. As bandas foram medidas e o peso molecular determinado através de medida densitométrica. Os resultados são expressos como área das bandas (cm²). A padronização foi realizada através de curva padrão de albumina (0,5–5µg). Os resultados são expressos como concentração (µg) por 45µg de proteína total aplicada em cada poço de SDS-PAGE. Ausência de bandas foi indicada por símbolo (-). MEC controle indica as proteínas obtidas da medula óssea de camundongos controle. MEC desnutrido indica proteínas obtidas da medula óssea de camundongos desnutridos. Perfil representativo de 3 experimentos independentes.

4.2.2 “Western Blott” das Proteínas da Matriz Extracelular da Medula Óssea

Estudamos, nos extratos obtidos da medula óssea de animais desnutridos e controles a expressão de fibronectina, laminina e trombospondina. Na Figura 8A, apresentamos a imagem do “Western blot” para fibronectina, onde observamos diferenças na concentração em amostras obtidas de animais desnutridos e controles. A amostra da MEC obtida de animais desnutridos apresentou aumento na concentração de fibronectina em relação ao grupo controle como demonstrado por análise densitométrica (Figura 8B). As análises do “Western blot” demonstraram que a concentração de fibronectina foi 0,63 μg na amostra do Grupo Desnutrido (com um aumento de 161%) e de 0,39 μg na amostra controle, (95% de Intervalo de Confiança do método de análise densitométrica).

Na Figura 9A apresentamos o “Western blot” para laminina obtida a partir da matriz extracelular da medula óssea. Também para a laminina a concentração diferiu em função do estado nutricional dos animais. Os animais pertencentes ao Grupo Desnutrido apresentaram maior concentração de laminina em relação ao Grupo Controle (Figura 9B). A concentração do “Western blot” para laminina foi 2,44 μg na amostra da camundongo desnutrido (com um aumento de 4 vezes) e 0,51 μg na amostra controle (95% de Intervalo de Confiança).

Na Figura 10A apresentamos o “Western blot” para trombospondina. Também para a trombospondina a concentração da mesma diferiu em função do estado nutricional dos animais. Os animais pertencentes ao Grupo Desnutrido apresentaram maior concentração de trombospondina em relação ao Grupo Controle (Figura 10B). As medidas densitométricas do “Western blot” para trombospondina foram demonstradas em percentuais. No “pool” obtido de camundongos desnutridos a área do pico foi 35% superior à aquela obtida da amostra controle (95% de Intervalo de Confiança).

Figura 8: Western Blot de extratos da matriz extracelular contra fibronectina (Fig 8A) e análise densitométrica (Fig 8B). Em cada poço de SDS-PAGE foi aplicado 45µg de proteína extraído da MEC da medula óssea de animais desnutridos (D) e controle (C). A linha P se refere à reação com 1,5µg de fibronectina comercial (Gibco®) Fig 5A. Medidas densitométricas foram realizadas e as diferenças na área das bandas são demonstradas. Na Fig 5B a linha sólida refere-se à amostra controle. A linha tracejada refere-se à amostra de animais desnutridos. Perfis similares foram obtidos em cinco experimentos diferentes realizados com o extrato de MEC (controle e desnutrido). Perfil representativo três grupos diferentes de camundongos controles e desnutridos com resultados similares.

Figura 9: Western Blot de extratos da matriz extracelular contra laminina (Fig 9A) e análise densitométrica (Fig 9B). Em cada poço de SDS-PAGE foi aplicado 45 μ g de proteína extraída da MEC da medula óssea animais desnutridos (D) e controle (C). A linha P se refere à reação com 1,5 μ g de laminina comercial (Gibco®). Medidas densitométricas foram realizadas e as diferenças na área das bandas são demonstradas. A linha sólida refere-se à amostra controle. A linha tracejada refere-se à amostra de animais desnutridos. Perfil representativo de dois grupos diferentes de camundongos controles e desnutridos com resultados similares.

Figura 10: Western Blot de extratos da matriz extracelular contra trombospondina (Fig 10A) e análise densitométrica (Fig 10B). Em cada poço de SDS-PAGE foi aplicado 45 μ g de proteína extraída da MEC da medula óssea de animais desnutrido (D) e controle (C). Medidas densitométricas foram realizadas e as diferenças na área das bandas são demonstradas. Na Fig 7B a linha sólida refere-se às amostras controles. A linha tracejada refere-se à amostra de animais desnutridos. Perfis similares foram obtidos em dois experimentos independentes realizados com o mesmo extrato de MEC (controle e desnutrido).

4.2.3 Avaliação de Laminina e Fibronectina nas Amostras de MEC da Medula Óssea pelo Ensaio de ELISA

A curva padrão para fibronectina e laminina foi realizada, através de amostras purificadas (Gibco®) utilizando-se a faixa de 5 a 100 ng/poço (Figura 11).

O Grupo Desnutrido apresentou valores para fibronectina ($80,31 \text{ ng} \pm 7,04$) e laminina ($89,70 \pm 10,12$) significativamente maiores que o Controle ($57,29 \text{ ng} \pm 5,65$ e $59,91 \text{ ng} \pm 14,93$, respectivamente) (Figura 12).

Figura 11 Curva padrão para o ensaio de ELISA para laminina (LN) e fibronectina (FN) utilizando concentrações variadas de proteínas purificadas (5 a 100 ng/poço).

Figura 12 Resultados, em valores médios e desvio padrão de fibronectina (FN) e laminina (LN), da MEC da medula óssea de camundongos controle e desnutrido pelo ensaio de ELISA. Aplicamos 5 μ g de proteínas totais por poço. Valores médios de três experimentos independentes realizados em triplicata. Para efetuar os cálculos realizamos a curva de regressão linear utilizando os dados da figura 11. Teste de Mann-Whitney considerou as diferenças significativas $p < 0,05$ entre Grupo Controle e Desnutrido.

4.3 Ensaio Biológicos com a Matriz Extracelular da Medula Óssea.

4.3.1 Padronização dos ensaios de Proliferação Celular com FDC-P1

Conforme item **3.8.2 e 3.8.3**, realizamos ensaios prévios para padronização de proliferação utilizando a linhagem FDC-P1 frente a meio condicionado obtido de cultivo de célula WeHi-3B e a IL-3 e GM-CSF. Como podemos observar na Figura 13 e 14, as células FDC-P1 são dependentes de IL-3 e, ou GM-CSF.

PADRONIZAÇÃO DO CULTIVO DA CÉLULA FDC-P1

Figura 13 - Resultado da curva de crescimento da célula FDC-P1 pelo método do azul de tripan frente a citocinas. ◆ Cultivo com $5,0 \times 10^4$ células/poço, estimulado com meio condicionado (MC) obtido da célula WeHi-3B, a cada 48 horas. ■ Cultivo com $5,0 \times 10^4$ células/poço, estimulado com IL_{3r} apenas no início do cultivo (T0); ▲ $5,0 \times 10^4$ na ausência de citocinas. As culturas foram monitoradas a cada 24 horas pelo período de 72 horas de incubação, através da contagem de células viáveis em câmara de contagem. O experimento foi realizado em quadruplicata.

Fig 14 Curva de proliferação da célula FDC-P1 pelo método do MTT em concentrações variadas de GM-CSF e IL_{3r} avaliadas após 72 horas de incubação ($2,0 \times 10^4$ células/poço). Controle negativo foi realizado na ausência de citocinas. O experimento foi realizado em placas de 96 poços, em quadruplicata.

4.3.2 Avaliação da Adesão das Células FDC-P1 sobre Proteínas da Matriz Extracelular

Verificamos na **figura 15** que as proteínas solúveis da MEC da medula óssea, obtidas tanto do animal controle como do desnutrido apresentam capacidade adesivas. Observando as concentrações de MEC testadas, nota-se que as concentrações menores foram mais eficientes em promover a adesão das células FDC-P1. A intensidade de adesão para a MEC obtida dos diferentes grupos de animal não demonstraram diferenças significativas.

Figura 15 - Resultados médios do ensaio de adesão com a célula FDC-P1, realizado sobre a MEC da medula óssea. MEC Nutrido: 10^5 células/poço plaqueada sobre a MEC do animal controle. MEC Desnutrido: 10^5 células/poço plaqueada sobre a MEC do animal desnutrido. Controle Positivo: 10^5 células/poço plaqueada sobre 0,5 μ g de laminina, fibronectina e colágeno (Gibco®). As amostras foram processadas em triplicata, tendo sido realizado 3 experimentos independentes. Não houve diferenças significativas entre os ensaios utilizando MEC Nutrido e MEC desnutrido (teste de Mann-Whitney).

4.3.3 Avaliação *in vitro* da Capacidade das Proteínas da MEC Sustentar Proliferação e/ou Sobrevivência de Células FDC-P1.

a) Ensaios utilizando proteínas da MEC fixadas a substrato plástico.

Verificamos na Figura 16 que proteínas da MEC provenientes de animais desnutridos, na ausência de citocinas, apresentaram uma tendência a induzir maior de proliferação e/ou sobrevivência de células FDC-P1 do que as proteínas da MEC controle. Este padrão se reproduziu em todas as concentrações analisadas, embora esta diferença não seja significativa. Verificamos que as concentrações menores de proteínas da MEC foram mais eficientes em promover proliferação. Interessante observar, que a presença de proteínas da MEC, independentemente do grupo de animal, modifica sensivelmente a sobrevivência celular, visto que células cultivadas diretamente sobre a placa (controle negativo) não sobreviveram. Desse modo demonstra-se que as amostras são biologicamente ativas, capazes de favorecer a sobrevivência de células mielóides *in vitro*.

b) Ensaios Comparando MEC fixadas a substrato plástico com MEC Solúvel no Meio de Cultura. Como podemos observar no gráfico 17 a MEC proveniente dos animais desnutridos apresentou uma tendência a induzir maior de proliferação e/ou sobrevivência de células FDC-P1 do que as proteínas da MEC controle. Este padrão se reproduziu tanto na forma fixa quanto na solúvel, em todas concentrações testadas, embora essa diferença não seja significativa. As proteínas da MEC fixadas ao substrato promoveu índices de proliferação celular significativamente superiores em relação à forma solúvel, independentemente do estado nutricional dos animais.

Figura 16 - Resultados médios do ensaio de MTT com a célula FDC-P1, realizado sobre a MEC da medula óssea fixada ao substrato plástico (poliestireno). MEC Nutrido: 2×10^4 células/poço plaqueada sobre a MEC do animal controle. MEC Desnutrido: 2×10^4 células/poço plaqueada sobre a MEC do animal desnutrido. Controle Positivo: 2×10^4 células/poço e 500 pg/ml de IL3r. Controle Negativo: 2×10^4 células/poço na ausência de MEC e citocina. As amostras foram processadas em quadruplicata, tendo sido realizado 4 experimentos independentes. * Diferença significativa ($p < 0,0001$, teste de Mann Whitney), entre o controle negativo e os testes MEC nutrido e desnutrido. Não houve diferenças significativas entre os ensaios utilizando MEC Nutrido e MEC desnutrido.

Figura 17 Resultados médios do ensaio de MTT com a célula FDC-P1, realizado sobre a MEC da medula óssea fixada ao substrato plástico (poliestireno) e solúvel no meio de cultura. MEC Nutrido fixa: 2×10^4 células/poço plaqueada sobre a MEC do animal controle fixada ao substrato plástico. MEC Desnutrido fixa: 2×10^4 células/poço plaqueada sobre a MEC do animal desnutrido fixada ao substrato plástico. MEC Nutrido Solúvel: 2×10^4 células/poço acrescidas de MEC na forma solúvel do animal controle. MEC Desnutrido Solúvel: 2×10^4 células/poço acrescidas de MEC na forma solúvel do animal desnutrido. As amostras foram processadas em quadruplicata. * Diferença significativa ($p < 0,05$, teste de Mann Whitney), entre os testes MEC fixa e MEC solúvel. Não houve diferenças significativas entre os ensaios utilizando MEC Nutrido e MEC desnutrido.

4.3.4 Avaliação da Influência da MEC da Medula Óssea associada a Fatores de Crescimento sobre a Proliferação e Sobrevivência Celular *in vitro*

4.3.4.1 Avaliação da Interação da MEC a Fatores de Crescimento

A proliferação da célula FDC-P1 sobre a MEC da medula óssea (0,1 e 0,5µg) proveniente de animais controles e desnutridos com 10 pg de IL-3r (subdose), tanto na forma fixa ao substrato plástico como na forma solúvel no meio de cultura, foi praticamente similar para os dois grupos estudados (Figura 18). Os poços incubados com 10pg/ml de IL-3r na ausência de MEC, apresentaram uma proliferação celular, significativamente inferior aos que foram incubados com a citocina e MEC (Figura 18). Demonstrando assim um provável efeito sinérgico da MEC.

A proliferação da célula FDC-P1 sobre 1µg de MEC fixa ao substrato plástico, associada a 500pg/ml de GM-CSFr (dose máxima), foi discretamente superior nos poços incubados com MEC do animal desnutrido, quando comparadas com MEC do animal controle (Figura 19). Para o mesmo experimento com 500pg de IL-3r/ml, a resposta foi inversa, apresentou maior proliferação quando associado à MEC controle. As diferenças não foram significativas. Nestes experimentos incubamos alternativamente FDC-P1 com 500 pg/ml de GM-CSFr ou IL-3r, na ausência de MEC. Interessantemente as citocinas incubadas com a MEC não aumentou a resposta, inclusive diminuiu discretamente a proliferação (figura 19).

4.3.4.2 Avaliação da Capacidade de Ligação da MEC a Fatores de Crescimento

Para avaliar a ligação das citocinas com a MEC, pré-incubamos a MEC da medula óssea tanto de animais nutridos como desnutridos com 500 pg/ml de IL-3r ou GM-CSFr e após incubação de 2 horas a 37°C, a preparação foi lavada para retirar-se as citocinas que não ligaram-se à MEC. Os resultados (Figura 20), mostram que a sobrevivência e/ou proliferação da célula FDC-P1, foi significativamente superior nas amostras incubadas com MEC do animal desnutrido pré-incubadas com GM-CSFr, quando comparadas com MEC do animal controle. Em relação ao IL-3 a proliferação também foi superior nas amostras incubadas com MEC do animal desnutrido, no entanto sem diferenças significativas (Figura 20).

Figura 18 Resultados médios do ensaio de proliferação da célula FDC-P1 (2×10^4 células/poço), pelo teste do MTT, realizado com MEC da medula óssea, associado a 10 pg/ml de IL-3r. Experimento realizado com MEC proveniente de camundongos controle (MEC Nutrido) e desnutrido (MEC Desnutrido), fixa no substrato plástico e solúvel no meio de cultura. No controle positivo as células foram incubadas na presença de 500 pg de IL-3/ml. No controle negativo, as células foram incubadas na ausência de MEC e citocinas. No controle do experimento as células foram incubadas com MEC do animal controle (MEC Nutrido) ou com 10 pg de IL3r. As amostras foram processadas em quadruplicata. * Diferenças significativas com $p < 0,05$ (Mann-Whitney).

Figura 19 Resultados médios do ensaio de proliferação da célula FDC-P1 (2×10^4 células/poço), pelo teste do MTT, realizado com $1\mu\text{g}$ MEC da medula óssea associado a 500 pg/ml de citocinas (dose máxima). Experimento realizado com MEC fixa no substrato plástico, proveniente de camundongos controle (MEC Nutrido) e desnutrido (MEC Desnutrido), na presença de IL-3r ou GM-CSFr. No controle positivo as células foram incubadas apenas na presença de IL-3r ou GM-CSFr. As amostras foram processadas em quadruplicata, tendo sido realizado 2 experimentos independentes. As diferenças não foram significativas pelo teste de Mann-Whitney.

Figura 20: Resultados médios do ensaio de proliferação da célula FDC-P1 (2×10^4 células/poço), pelo teste do MTT. Ensaio de ligação da citocina na MEC. O ensaio foi realizado sobre um substrato constituído de $1 \mu\text{g}$ de MEC obtida de medula óssea de camundongos controles (MEC Nutrido) e desnutridos (MEC Desnutrido) e pré-incubadas com 500 pg/ml de GM-CSFr ou IL-3r. Após incubação a MEC foi lavada com PBS e utilizada como substrato para proliferação celular. No controle positivo as células foram incubadas apenas na presença de IL-3r ou GM-CSFr, e no controle negativo as células foram incubadas na ausência de MEC e citocinas. As amostras foram processadas em quadruplicata, tendo sido realizado 2 experimentos independentes. * Diferença significativa, $p < 0,005$ e + $p = 0,0650$ pelo teste de Mann-Whitney.

5 DISCUSSÃO

A desnutrição protéica não está limitada apenas aos países em desenvolvimento, onde a apresentação severa do Kwashiorkor e, ou Marasmus tem uma conotação mais importante. Variados graus da desnutrição são observados também em países industrializados, principalmente em indivíduos hospitalizados, decorrentes de certas enfermidades (SCHOFIELD & ASHWORTH, 1996) como neoplasias (BELL, et al, 1997), AIDS (YU, et al, 2000) e anorexia (SCHOFIELD & ASHWORTH, 1996). Em todas as situações citadas o binômio resistência do hospedeiro versus imunidade é fundamental. Portanto um estudo envolvendo aspectos bioquímicos e biológicos do tecido hematopoiético da medula óssea pode oferecer grande contribuição no campo da hematopoese/resposta imunológica.

O modelo experimental, indução da desnutrição protéica em camundongos, foi indispensável considerando o material necessário para pesquisa (medula óssea) e a dificuldade em isolar os elementos nutricionais envolvidos nos estados de carência da população. Geralmente existem sobreposições tanto das deficiências nutricionais como das patologias que induzem estas deficiências.

Os animais submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram acentuada redução no consumo de ração. Segundo GIETZEN et al., 1992, e GIETZEN et al., 1998, os animais possuem mecanismos que oferecem vantagens para a seleção de uma dieta balanceada que proporcione todos os seus requerimentos nutricionais. Quando dietas que resultam em deficiência de aminoácidos essenciais são oferecidas a ratos, a redução da concentração destes aminoácidos é reconhecida em áreas cerebrais específicas. Esta fase de reconhecimento da deficiência está associada a diminuição localizada do

aminoácido limitante, norepinefrina e AMP cíclico e ainda alterações na síntese protéica. O reconhecimento da deficiência induz a aversão ao alimento mediada em parte pela serotonina à nível do vago. A redução na ingestão de alimentos pode derivar também de transtornos hipotalâmicos, determinados por lesões locais e de distúrbios psicogênicos, como o identificado na anorexia nervosa (WATERLOW, 1996). Esse comportamento em relação à redução na ingestão da ração hipoprotéica, é uma resposta que vem se repetindo em outras pesquisas realizadas em nosso laboratório (BORELLI et al, 1995, XAVIER, 1999, BORSATO & BORELLI, 1999). Esse comportamento pode em alguns casos induzir uma desnutrição protéico-energética no final do experimento. Dessa forma acontece uma exacerbação do processo, finalizando com a redução acentuada no peso corporal dos camundongos desnutridos. Na desnutrição experimental em laboratório, embora exista um acompanhamento, também tem suas limitações. KIRSCH et al, 1968, realizou um dos primeiros experimentos com ratos com o objetivo de reproduzir o “Kwashiorkor em Laboratório”, neste experimento, ratos foram submetidos a dietas hipoprotéicas, com variadas concentrações de proteína, mantendo as calorias. O estudo mostrou que, os animais submetidos a dietas com 12 e 8 % de proteínas, conseguiram compensar a restrição protéica, ingerindo mais ração, os animais submetidos a dietas com 5% de proteína o consumo foi semelhante ao do controle (20% de proteína), consequentemente desenvolveram desnutrição protéica e os animais submetidos à dieta isenta de proteína, desenvolveram anorexia. Este trabalho mostra que a concentração de proteína é bastante crítica em relação ao comportamento alimentar de animais de laboratório. Em nosso estudo, houve uma redução no consumo de ração em adição a restrição protéica, determinando uma significativa perda de peso no grupo experimental, cuja instalação levou em média 14 dias, desenvolvendo consequentemente uma deficiência calórico-protéica.

Os indicadores de desnutrição protéica utilizado neste estudo, foi a perda de pelo menos 20% do peso inicial e queda das proteínas totais e albumina plasmáticas. Existem outros indicadores mais eficazes para

avaliação da desnutrição protéica, como a dosagem de proteínas transportadoras, fator de crescimento semelhante à insulina, fibronectina plasmática (YOUNG, et al., 1990), e outros que não aplicamos neste estudo. É possível também obter níveis de albumina plasmática normais onde a desnutrição protéica já esta instalada, isto acontece principalmente porque o “pool” de albumina corporal é alto e o tempo de meia vida desta proteína é longo (YOUNG, et al., 1990). No entanto, neste estudo em que a desnutrição foi induzida através da dieta, o peso corpóreo funcionou como um bom indicativo, e posteriormente foi confirmado com a dosagem de proteína e albumina séricas.

A desnutrição protéica modifica tanto a resposta específica como não específica do organismo frente a processos inflamatórios e, ou infecciosos (CHANDRA,1976). Relatos na literatura e trabalhos anteriores em nosso laboratório, mostraram que em processos carênciais ocorrem leucopenia; alterações de migração (BORELLI et al, 1995) e adesão celular (BORELLI et al, 1998), redução no número de GM-CFU da medula óssea (BORSATO & BORELI, 1999) bloqueio maturativo e alterações estruturais em órgãos linfo-hematopoiéticos (XAVIER, 1999), porém, pouco se sabe de que maneira a desnutrição compromete o sistema hematopoiético.

Durante os últimos anos tem-se acumulado evidências de que a matriz extracelular (MEC) exerce papel crucial na hematopoiese. Em adultos normais, a mielopoiese e parte da linfopoiese ocorre na medula óssea. Células do estroma medular parecem ser capazes de produzir localmente citocinas e proteínas da MEC, contribuindo dessa maneira para o desenvolvimento do microambiente indutor da hemopoiese (HIM) da medula óssea (GORDON,1987). A produção e também a localização de citocinas parece depender da organização do microambiente da medula óssea determinado por adequado nível de proteínas da MEC (KLEIN, 1995). Baseado nessas informações, modificações nas proteínas que compõem a MEC da medula óssea podem comprometer o microambiente, modificar a interação e, ou síntese de citocinas. O resultado final pode ser a modificação

da produção e,ou diferenciação ou ainda da migração das células sangüíneas.

Em nosso estudo a avaliação histopatológica da medula óssea mostrou acentuada redução na celularidade no animal desnutrido. Nos seios venosos observou-se marcada dilatação, contendo material de aspecto plasmático, fracamente acidofílico. Este padrão celular da medula óssea em processo de desnutrição experimental foi demonstrado recentemente em estudo realizado pelo grupo (XAVIER, 1999). A aplasia da medula óssea aparece em diversas enfermidades. Segundo STOHLMANN, 1972, fisiopatologicamente a aplasia da medula óssea pode ser vista como o resultado de uma anormalidade das células tronco ou de um defeito nas células estromais, ou seja, o produto de um microambiente alterado. Em modelo animal, de camundongos com defeito genético W/W^w e naqueles com SL/SL^d (defeito Steel), foi demonstrado células tronco deficiente e um microambiente deficiente, respectivamente. Tanto o camundongo W/W^w como o SL/SL^d tem uma anemia macrocítica associada com hipoplasia de medula. A anemia W/W^w é curada após irradiação letal e infusão de célula-tronco não afetada, enquanto o defeito SL/SL^d não é corrigido pelo transplante de célula-tronco. As células W/W^w são deficientes em proto-oncogene c-kit, um membro da família de receptores de superfície, com atividade tirosino-quinase para o fator célula-tronco (ligante de c-kit, ou stem cell factor ou SCF), enquanto os camundongos SL/SL^d não produzem o ligante de c-kit (SHADDUCK, 1995). Esta definição representa uma importante compreensão das relações dinâmicas existentes entre células hematopoiéticas e elementos estromais em termos moleculares.

Os estudos relativos à composição da MEC medular durante distúrbios hematológicos apresentam resultados controversos. Alguns identificam, *in vitro*, a preservação do microambiente medular em pacientes com anemia aplásica, mielofibrose primária e mielodisplasia, sugerindo a origem do processo devido exclusivamente a anomalias das células hematopoiéticas (HOTTA et al., 1986; COUTINHO et al., 1990; MARSH et al., 1991). Outros caracterizam durante a regeneração medular a

transformação da MEC, sendo encontrado na literatura referências à diminuição da tenascina (SOINI et al., 1993) ou aumento do ácido hialurônico (WITTELS, 1985), ou ainda certos casos de mielofibrose pode apresentar aumento da tenascina, associado a hiperplasia megacariocítica (REILLY, 1992). A tenascina, é uma molécula da MEC produzida principalmente por fibroblasto do estroma medular sob estímulo de fator transformante do crescimento (TGF- β) (ERICKSON & BOURDON, 1989). Outras situações associam-se também ao comprometimento da hematopoiese, como irradiação, determinando importantes modificações no estroma medular, reduzindo sua capacidade de suportar a hematopoiese. No entanto, é importante referir o grande potencial reparativo estromal (WAHTEN et al., 1981).

Em nosso estudo, trabalhamos com extrato bruto da MEC, contendo uma complexa mistura de moléculas. O tecido mielóide é composto por células estromais, células hematopoéticas, MEC, citocinas livres e/ou fixas na MEC. Esse tecido se mantém graças a uma rede de capilares e sinusóides que alimenta e mantém toda estrutura em uma situação dinâmica com a circulação periférica. O processo de extração utilizado neste estudo, permitiu a obtenção de proteínas solúveis da MEC do tecido hematopoiético da medula óssea, incluindo principalmente as glicoproteínas, e outros componentes solúveis em tampão fosfato. O objetivo dessa etapa do trabalho foi investigar alterações quantitativas, nas proteínas solúveis, em relação às proteínas totais do extrato bruto, em situação de desnutrição protéica.

Os resultados da SDS-PAGE 7,5%, realizada com material obtido da MEC da medula óssea de camundongos desnutridos e controles, foi o primeiro indicativo nesta pesquisa que a desnutrição afeta as proteínas da MEC da medula óssea. A concentração da acrilamida do gel, permitiu a identificação de proteínas que migram na faixa de 220 a 43 KDa. O perfil eletroforético mostrou alterações em várias proteínas que migram nesta faixa de peso molecular. Em 220 KDa aparece uma banda com maior expressão nas amostras provenientes do animal desnutrido. Neste peso

molecular migram a fibronectina e laminina, glicoproteínas presentes na MEC da Medula óssea de grande importância na hematopoiese. Em 200 KDa aparece uma discreta banda, a qual estaria mais próxima à tenascina. A tenascina é uma glicoproteína presente na medula óssea, que possui 3 diferentes cadeias peptídicas com pesos moleculares de 230, 200 e 10 KDa.

Na posição eletroforética de 182 e 108 KDa aparece uma proteína que é mais intensa nas amostras provenientes dos animais desnutridos. Em aproximadamente 60 KDa, detectamos apenas uma discreta banda nas amostras do animal desnutrido, nesta posição migra a hemonectina, uma importante glicoproteína com propriedades adesivas para linhagem granulocítica (CAMPBELL et al, 1987). PETERS et al, 1995, detectou condroitin sulfato na MEC da medula óssea de ovelha entre os marcadores moleculares de 43 e 68 KDa. Em 56 KDa aparece a banda mais larga de todo perfil eletroforético, com um discreto aumento para o animal desnutrido, outra particularidade observada é que no animal controle esta banda tem aspecto mais difuso. Vale ressaltar que o processo de extração realizado em nosso estudo, permite a obtenção de outras moléculas do tecido hematopoiético, como os fatores de crescimento e enzimas de remodelamento da MEC. O perfil eletroforético obtido é um reflexo dessa mistura, devido ao grande número de bandas presentes no gel. Resultado semelhante a esse foi demonstrado por PETERS et al, em 1995, em medula óssea de ovelhas.

Optamos por caracterizar as glicoproteínas mais classicamente conhecidas da MEC da medula óssea, tais como FN, LN e TSP. A reação de Western blot foi positiva para FN e LN em aproximadamente 220 KDa, e a expressão foi acentuadamente maior nas amostras obtidas do animal desnutrido. A TSP é uma glicoproteína constituída de 3 cadeias de 150 KDa. No entanto, nas nossas amostras o anticorpo contra TSP no Western blot marcou em 182 KDa, provavelmente por incorporação de peptídeos de FN na molécula, fenomeno frequente nas amostras não purificadas (SAGE & BORNSTEIN, 1995), dessa forma modificando a migração eletroforética. A concentração da TSP foi 30 % superior no animal desnutrido quando

comparado ao controle. O ensaio de ELISA para FN e LN mostrou que as diferenças são significativas, confirmando os resultados do “Western blot”.

Neste trabalho encontramos diferenças quantitativas em proteínas da MEC de camundongos em função do estado nutricional, sugerimos que as alterações podem ser decorrentes do remodelamento da MEC, causado pelas agressões teciduais oriundas da desnutrição. A MEC é uma estrutura dinâmica, onde a síntese e degradação dessas moléculas podem variar de acordo com o estado fisiológico do organismo e subsequente demanda hematopoiética. Portanto, a expressão da MEC é modificada sob certas condições patológicas. As células estromais também podem estar respondendo de maneira diferenciada frente a modificações sistêmicas que acontecem na desnutrição calórico - protéica. A nível hormonal, há elevação dos glicorticóides plasmáticos na desnutrição (WATERLOW, 1996). Estudos experimentais mostram que injeções de hidrocortisona aumentam as proteínas da MEC do timo em camundongos (LANES-VIEIRA, et al, 1991).

Considerando-se que tanto a fibronectina como a laminina são glicoproteínas envolvidas na adesão, regulação, proliferação e, ou diferenciação de células hemopoiéticas (KLEIN, 1995, MAYANI, 1992), esta diferença poderia modificar de maneira importante o microambiente hematopoiético o que poderia ter implicações profundas na hematopoiese. A fibronectina e laminina são sintetizadas por células estromais da medula óssea, constituindo a rede extracelular, sendo que a fibronectina está envolvida na adesão e maturação de células da linhagem mielóide (PATEL, 1984, 1987) e de células precursoras da linhagem linfóide (PATEL, 1987). Trabalhos mais recentes tem demonstrado que célula progenitora hematopoiética multipotente (CD 34+) adere à fibronectina na medula óssea (VERFAILLIE, 1991). Células precursoras da medula óssea podem ligar-se a fibronectina via integrinas $\alpha 5 \beta 1$ e, ou $\alpha 4 \beta 1$ ou com proteoglicanos ligados na membrana (KERST, 1993, VERFAILLIE, 1991, SICZKOWSKI et al, 1993) e que tais receptores são expressos diferencialmente durante o processo de maturação das células mielóides (KERST, 1993). A ligação da MEC via integrina envolve o citoesqueleto. As integrinas ligam-se à MEC no domínio

extracelular e através do domínio intracelular ligam-se a outras proteínas intermediárias, que por sua vez ligar-se-ão aos filamentos de actina formando contatos focais. A adesão poderia ser importante passo para o controle da hematopoiese. SUGAHARA et al., 1994, demonstraram que a interação de fibronectina com células precursoras hematopoiéticas através da integrina $\alpha 5 \beta 1$ pode impedir proliferação celular na presença de fatores hematopoiéticos mitogênicos. As células hematopoiéticas precursoras quando expressam receptores para fibronectina determinam sua ancoragem à matriz. A trombospondina pode ligar-se à fibronectina e colágenos *in vivo* coordenando a formação do microambiente (MORANDI, 1994), assim como a adesão de células progenitoras ao microambiente medular (LONG & DIXIT, 1990).

O papel da laminina na medula óssea é menos estudado. Entretanto, demonstrou-se a sua importância para fixar a célula precursora e comissionada na MEC da medula óssea, indicando que estas moléculas poderiam controlar a diferenciação e liberação das células hematopoiéticas da medula para o sangue periférico (KLEIN, 1995, YUCHENCO et al, 1994). Onze isoformas de laminina tem sido proposto (YURCHENCO & O'REAR, 1994). Ensaio de imunohistoquímica, "Western blot" e imunoprecipitação realizados em cortes de tecido da medula, ou em cultura de longa duração, ou em extrato de estroma da medula, detectaram a presença de laminina-1 ($\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$), sendo que a reação foi positiva para cadeia $\beta 1$ e $\gamma 1$, mas não para $\alpha 1$ (KLEIN, 1995). Recentemente, GU et al, em 1999, mostraram através de análise de "Northern blot", a presença de laminina-2, laminina-8 e laminina-10 na medula óssea (GU et al, em 1999). No presente trabalho, utilizamos anticorpos policlonais, com o objetivo de verificar se desnutrição interfere na concentração da laminina, não investigamos a isoforma de LN que sofreu modificações. Embora maiores investigações são necessárias para avaliar a natureza e função da laminina no microambiente hematopoiético, algumas isoformas parecem estar mais envolvidas no processo de adesão da célula hematopoiética. Ensaio *in vitro* utilizando célula hematopoiética multipotente FDCP-Mix, mostraram maior adesão para laminina-10, do que

para laminina-1 (GU et al, em 1999). O aumento da concentração da laminina total, conforme mostrado neste estudo, pode ter também alterações qualitativas. As moléculas de matriz depositadas no microambiente hematopoiético de forma organizada, favorecem uma hematopoiese eficaz, quando esta organização é interrompida, seja por alterações qualitativas e, ou quantitativas, o sistema pode perder funcionabilidade ou sofrer modificações significativas no controle da hematopoiese. BORELLI et al, 1992, demonstraram em modelo de lamínula implantada no tecido subcutâneo de camundongos desnutridos, uma redução na migração de células inflamatórias. A maior expressão de FN, LN e TSP em relação a proteínas totais na MEC da medula óssea encontradas em nosso estudo, poderiam explicar as alterações na proliferação e mobilização celular em animais desnutridos em estudos anteriores.

Pouco se sabe sobre o que acontece com a MEC da medula óssea na desnutrição. Contudo, existem alguns estudos realizados em fígado, baço e timo em situação de desnutrição. A restrição alimentar perinatal (ratos) reduziu o volume do fígado mas houve manutenção da proporção em relação a concentração das proteínas da MEC (REIF et al, 1992). Em timo de seres humanos encontrou-se uma matriz extracelular densa e que apresentou correlação positiva com o grau de depleção dos timócitos (LYRA et al, 1993). Neste experimento os autores consideraram que estes efeitos podem representar uma relação causa-efeito, onde o contato de timócitos com quantidades anormais de MEC tímica aumentariam e, ou desencadeariam a morte celular programada. XAVIER, em 1999, mapeou várias estruturas hematopoiéticas em animais desnutridos, os estudos histológicos e ultraestruturais evidenciaram progressiva depleção de linfócitos em órgãos linfóides associada à degeneração gelatinosa em medula óssea. Simultaneamente observou-se um aumento no número de células estromais esplênicas, em particular de miofibroblastos, macrófagos, células dendríticas e células intersticiais citoqueratina-positivas, associadas a um aumento de matriz extracelular (colágeno, elastina, fibronectina),

determinando um espessamento capsular e trabecular. Na medula óssea encontrou diminuição de colágeno associado a hipoplasia.

Na desnutrição protéica existe uma diminuição principalmente da linhagem granulomonocítica (BORELLI, et al, 1995), podendo também acometer todas as linhagens. Neste estudo mostramos através de colorações histológicas uma acentuada hipoplasia. Mostramos também que existe alterações nas moléculas de MEC, comprometendo o microambiente. A sequência em que os eventos acontecem não está esclarecida. Uma hipótese é que o evento inicial possa estar relacionado com a célula tronco hematopoiética, ou com alguns progenitores, e que a hipoplasia ocasione um tipo particular de lesão arquitetural, conduzindo a alterações na proliferação das células do estroma medular ou modificações na síntese das moléculas da MEC. Outra hipótese para os resultados encontrados poderia ser decorrente da diversidade existente entre as células estromais e sangüíneas. As células sangüíneas exercem suas funções fora do microambiente hematopoiético, portanto a taxa de renovação e cinética celular são distintas do estroma. Desta maneira é possível que a desnutrição afete a produção da célula sangüínea e modifique a massa total do tecido hematopoiético, enquanto que a MEC pode se manter inalterada em concentração absoluta, por um determinado período, porém de modo desproporcional em relação às proteínas totais do tecido, o que também leva a um desequilíbrio do microambiente.

A MEC funciona não somente como suporte estrutural para as células e tecido, mas também parece exercer importante papel na modulação celular frente a fatores de crescimento, hormônios e vitaminas. CAMPBELL et al (1985) demonstraram que células de estroma medular colocadas em placas previamente recobertas com uma preparação obtida da MEC da medula óssea, são capazes de se organizar rapidamente na cultura. No estroma organizado, observou-se um estímulo na proliferação de células hematopoiéticas, cerca de oito vezes superior aos controles colocados diretamente sobre a superfície plástica da cultura.

Com base nestes conhecimentos avaliamos a atividade biológica da MEC da medula óssea de animais controles e desnutridos. Testamos a capacidade desta MEC sustentar a sobrevivência e/ou proliferação de linhagens celulares mielóides primitivas (FDC-P1) em várias concentrações da MEC. Células progenitoras hematopoiéticas clonadas são usadas para compreender vários fatores do processo hematopoiético, particularmente devido a sua dependência de fatores de crescimento, e sua capacidade de estabelecer interações adesivas com a célula estromal as quais mimetizam o “homing” da medula óssea (TAVASSOLI & MINGUELL, 1991, CONGET & MINGUELL, 1995). O “homing” da célula hematopoiética é um fenômeno complexo envolvendo várias reações a nível molecular, incluindo interações células células e interações células e matriz, que fixam a célula hematopoiética no microambiente da medula óssea. As interações célula hematopoiética envolve no mínimo, interação via integrina (VERFAILLE et al, 1991) e proteoglicano associado à membrana da célula progenitora (CONGET & MINGUELL, 1995). A célula FDC-P1 utilizada nos ensaios biológicos deste estudo, é uma célula de linhagem mielóide clonada da medula óssea de camundongos normais, esta célula pode ligar-se a fibronectina via integrina através do domínio RGD, ou via condroitin sulfato de superfície de membrana via domínio de ligação para heparina (CONGET & MINGUELL, 1995). O domínio de ligação para heparina, da FN serve de sítio de ligação para heparina, heparan sulfato e condroitin sulfato. Essas interações facilitam a compartimentalização da célula hematopoiética. Os fatores de crescimento ligam-se à MEC principalmente através dos proteoglicanos depositados na MEC, sintetizados pelo estroma da medula óssea.

Os ensaios de adesão com a célula FDC-P1, mostraram que a MEC obtida do animal desnutrido, não sofreu modificações significativas. A MEC do animal desnutrido apresentou maior expressão de glicoproteínas adesivas, no entanto a capacidade adesiva *in vitro* para a célula testada não sofreu modificações.

Nos experimentos de proliferação da MEC com a célula FDC-P1, observamos uma resposta melhor nas concentrações mais baixas de MEC, onde a proporção de células viáveis foi maior, tanto na MEC do animal controle como no desnutrido. As amostras obtidas do animal desnutrido mostram em todos os pontos testados uma tendência a induzir maior proliferação da célula FDC-P1. Embora os testes estatísticos não considerem significativas estas diferenças, é interessante observar que a medida que aumentamos a concentração de proteínas solúveis da MEC, as diferenças entre as amostras, tendem a desaparecer, provavelmente o sistema seja capaz de funcionar em baixas concentrações de MEC. Testamos também a capacidade da MEC interagir com os fatores de crescimento através da célula FDC-P1. Selecionamos dois fatores fundamentais para linhagem mielóide: IL-3 que atua em precursores mais primitivos e o GM-CSF, que age em estágios mais avançados na escala de diferenciação, *in vivo*, no microambiente medular (ARAI et al, 1990). Primeiramente testamos a capacidade da MEC atuar sinergicamente com as citocinas. Neste experimento não observamos diferenças significativas entre as amostras controle e desnutrido. O experimento nos permitiu observar também que, em alta concentração de IL3, 500 pg/ml, a presença da MEC não aumentou a proliferação da FDC-P1, foi entretanto, discretamente mais baixa. No entanto, em concentração mais baixa da citocina, 10 pg/ml de IL3, a presença da MEC demonstrou alterações significativas em relação à célula incubada apenas com 10pg/ml de IL3. Estes resultados coadunam com os dados da literatura, os quais referem que a MEC tanto pode potencializar a proliferação celular como regular essa proliferação (CLARK, et al, 1992; STREULI, 1999). A MEC liga-se a fatores de crescimento, favorecendo a sua atividade biológica, (SCHUPPAN & RÜHL, 1994), ou sequestrando estes fatores, ou ainda pode sofrer ação de enzimas de remodelamento (STREULI, 1999). Desta forma os sinais de regulação da proliferação celular atribuídos a MEC nos experimentos *in vitro* deste estudo, pode ser o reflexo do funcionamento do sistema *in vivo*, que provavelmente module de maneira mais eficaz.

As proteínas da MEC, interagem entre si e com os demais constituintes (SCHWARZBAUER & SECHLER, 1999), e os fatores de crescimento ligam-se na MEC, modificando sua atividade biológica. A célula hematopoiética adere à MEC através das integrinas. As integrinas além de atuarem na adesão e ligação ao citoesqueleto e a MEC, são capazes de transdução de sinais como a fosforilação de tirosina de proteínas citoplasmáticas (SPRINGER, 1990), e podem ainda atuarem em cooperação com os fatores de crescimento (SCHUPPAN & RÜHL, 1994). Embora a cooperação na sinalização celular, entre MEC e fatores de crescimento hematopoiéticos, tenha poucas evidências experimentais até o momento, em outros tecidos, existem vários modelos propostos (SCHUPPAN & RÜHL, 1994; STREULI, 1999). Com base nestas informações, realizamos o ensaio de ligação das citocinas GM-CSF e IL3, na MEC já fixa no substrato plástico. A ligação da citocina foi avaliada através da proliferação da célula FDC-P1. No ensaio realizado com o GM-CSF, mostrou maior proliferação da célula quando cultivada sobre as amostras provenientes do animal desnutrido, do que quando cultivada sobre as amostras do animal controle. No ensaio realizado com IL3, não houve diferenças entre as amostras. O perfil eletroforético mostrou modificações na composição da MEC em situação de desnutrição protéico-energética. É possível que este desequilíbrio quantitativo e, ou qualitativo, se manifeste facilitando a ligação do GM-CSF à MEC ou aumentando o estímulo da célula hematopoiética, através de modificações na modulação da atividade do GM-CSF.

Os dados da literatura apontam que a composição da matriz não é estática, mas modifica-se durante o desenvolvimento normal e em condições de reparo e regeneração tecidual (LYRA, 1993; YURCHENCO, 1994). O processo de remodelamento pode atuar clivando fatores de crescimento seqüestrado pela MEC, podendo também atuar através de receptores de superfície celular importantes na sinalização celular (STREULI, 1999). Então discretas alterações na estrutura da MEC, podem resultar em alterações significativas no comportamento da célula.

As alterações observadas nos ensaios biológicos *in vitro*, provavelmente estão refletindo as alterações encontradas na composição da MEC, e possivelmente haja um remodelamento *in vivo* nesta matriz, que dificilmente possa ser exatamente pontuado nos ensaios *in vitro*. Os ensaios biológicos *in vitro* não reproduziram as alterações evidenciadas *in situ*, que mostraram efeitos opostos, ou seja, a medula óssea do animal desnutrido apresentou diminuição na produção de célula sangüínea. Estas contradições podem ser decorrentes da complexidade do tecido hematopoiético, onde muitas moléculas estão envolvidas. Há muito que a comunidade científica propõe modelos com objetivo de compreender o funcionamento do sistema hematopoiético. As culturas de estroma e cultura de medula óssea de longa duração (TESTA & MOLINEUX, 1993), são ensaios que avaliam a eficácia do sistema. Nesta pesquisa, onde o defeito de base não é intrínseco do sistema, optamos por investigar as possíveis modificações que ocorrem no tecido durante a aplasia da desnutrição. No entanto estes ensaios não estão descartados para as próximas etapas desta linha de pesquisa. Outras componentes da MEC da medula óssea podem estar alterados, no momento, estamos investigando em colaboração com a Profa. Dra. Lúcia Sampaio (UNIFESP-EPM) a concentração do ácido hialurônico, e os resultados preliminares mostraram que a concentração está diminuída no animal desnutrido. Em vista disso podemos sugerir que essas alterações modificam o microambiente medular alterando a proliferação e liberação de células hematopoiéticas para a circulação, modificando o funcionamento da hematopoiese *in vivo*.

6 CONCLUSÕES

A desnutrição protéica altera a composição das proteínas da MEC da medula óssea de camundongos. A concentração das glicoproteínas LN, FN e TSP envolvidas no desenvolvimento, adesão e liberação de células sangüíneas para corrente circulatória, apresentaram um aumento relativo quanto às proteínas solúveis da MEC.

A MEC obtida tanto do Grupo Controle como do Grupo Desnutrido demonstraram capacidade de promover adesão e proliferação e, ou sobrevivência da célula mielóide FDC-P1. A interação da MEC com os fatores de crescimento GM-CSF e IL-3, demonstrou um provável efeito sinérgico nas baixas concentrações da citocina (10 pg/ml).

O teste de ligação da MEC com GM-CSF demonstrou maior interação com as amostras provenientes do animal desnutrido, sugerindo que as modificações na composição da MEC se manifeste ou facilitando a ligação da citocina ou aumentando o estímulo da célula FDC-P1, através de modificações na modulação da atividade do GM-CSF *in vitro*.

Estes achados sugerem que a desnutrição protéica induz modificações na MEC, alterando o microambiente hematopoiético, conduzindo a alterações na proliferação e liberação de células hematopoiéticas para a circulação, modificando o funcionamento da hematopoiese *in vivo*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K. & WATSON, J.D. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K., WATSON, J.D. Molecular Biology of the Cell, 3a. ed. New York: Garland, 1994, p.949-1009.
- ALITALO, K.; HOVI, T. & VHERI, A. Fibronectin is produced by human macrophages. J. Exp. Med., New York, 151, p.602-613, 1980
- ALVAREZ-SILVA, M. & BOROJEVIC, R. GM-CSF and IL-3 activities in schistosomal liver granulomas are controlled by stroma-associated heparan sulfate proteoglycans. J. Leuk. Biol., Bethesda, v.59, p.435-441, 1996.
- ALVAREZ-SILVA, M., PINAZO, A.C., EL-CHEIKH, M.C., BOROJEVIC, R. Myelopoietic competence of stroma composed of hepatic granuloma-derived connective tissue cells or skin fibroblasts. Braz. J. Med. Biol. Res., Ribeirão Preto, v.27, p.2143-2152, 1994.
- ALVAREZ-SILVA, M.; M., SILVA, L.C.F.; BOROJEVIC, R. Cell membrane-associated proteoglycans mediate extramedullary myeloid proliferation in granulomatous inflammatory reactions to schistosome eggs. J. Cell Sc., Cambridge, v.104, p.477-484, 1993.
- ALXELSSON, I.; PITA, J.C.; HOWELL, D.S.; LORENTZON, R.; BERMAN, I & BOQUIST, L. Kinetics of proteoglycans and cells in growth plate of normal,

diabetic, and malnourished rats. Pediatr. Res. Baltimore, v.27, no.1, p.41-44. 1990.

ARAI, K., LEE, F., MIYAJIMA, A. MIYATAKE, S., ARAI, N., YOKOTA, T.
Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. Annu Rev. Biochem., Palo Alto, v.59, p. 783-836, 1990.

ASCHKENASY, A. Effect of a protein-free diet on lymph node and spleen cell response in vivo to blastogenic stimulantes. Nature., London, v.254, p.63-65, 1975.

ASCHKENASY, A. Effects de divers mélanges acides amines sur la régénération des leukocytes chez des rats carénces en protéines. I. Neutrophiles et éosinophiles C.R. Soc. Biol., Paris, v.160, p.933-937, 1966a.

ASCHKENASY, A. Effects de divers mélanges acides amines sur la régénération des leukocytes chez des rats carénces en protéines. II. lymphocytes. C.R. Soc. Biol., Paris, v.160, p.1787-1792, 1966b.

ASCHKENASY, A. On the Pathogenesis of anemias and leukopenias induced by dietary protein deficiency. Am. J. Clin. Ntr., Bethesda, v.5, p.14-25, 1957.

ASCHKENASY, A; Etude Sur l'anémie expérimentale par inanition protéique chez le Rat. Les altérations du sang de la moelle osseuse et de la rate. Les relations avec l'évolution du cycle oestral. Sang., Zaragoza, v.17, p.34-61, 1946.

ASIRVADHAM, M. The bone marrow and its leukocytic response in protein deficiency. J. Infect. Dis. Chicago, v.83, p.87-100, 1948.

ATHENS, J.W.; RAAB, S.O; HAAB, O.P.; MAUER, A.M.; ASHENBRUCKER, H.; CARTWRIGHT, G.E. ; WINTROBE, M.M. Leukokinetic studies III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjectes. J. Clin. Invest., New York, v.40, p.159-64, 1961.

BAGLEY, C.J., WOODCOCK, J. M., STOMSKI, F. C., LOPEZ, A.F. The strutral and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common β subunit of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. Blood. New York, v.89. n.5, p.1471-1482, 1997.

BANNERMAN, R.M. Hematology in: The mouse in Biomedical Research, Vol III, Academic Press, cap. 12, 1983.

BELL, S.J., BISTRIAN, B.R., CONNOLLY, C.A., FORSE, R.A. Body composition changes in patients with human immunodeficiency virus infection. Nutrition, New York, v.13, n.7-8, p.629-632, 1997.

BENTLEY, S.A., FOIDART, J.M., KLEINMAN, H.K. Connective tissue elements in rat bone marrow: immunofluorescent visualization of the hematopoietic microenvironment. J. Histochem. Cytochem. Seattle, v.32, p.114-116, 1982

BENTTLEY, S.A. Bone marrow connective tissue and the haemopoietic microenvironment. Br. J. Haemat., Oxford, v.50, p.1-6, 1982.

BETANCOURT, M.; ORTIZ, R. GOMES, J.L.; HERNANDEZ, M.E.; CRAVIOTO, J.- Effect of renutrition on cellular proliferation and SCE in bone marrow cells from malnourished rats. Nutr. Rep. In., New York, v.40, p.959-964, 1989.

BORELLI, P., MARIANO, M., BOROJEVIC, R.. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. Nutr. Res., New York v.15, no.10, p.1477-1485. 1995.

BORELLI, P., NARDINELI, L. Protein-Calorie Malnutrition: a decrease in the macrophage's respiratory burst capacity. RBCF, São Paulo, 2000 (Submetido).

BORELLI, P., SOUZA, I. P., BOROJEVIC, R., DAGLI, M.L.Z., KANG, H.C. Protein Malnutrition: Some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. Ann. Nutr. Metab., Basel, V.42, p.367-373, 1998.

BORNSTEIN, P., Thrombospondins: structure and regulation of expression. FASEB J. Bethesda, v.6, p.3290-3299, 1992.

BORSATTO, E., BORELLI, P. Effects of protein deficiency on proliferation and maturation of granulocyte-macrophage precursor cells. Nutr. Res. New York, 1999. In press...

BRACH, M.A. & HERRMANN, F. Hematopoietic growth-factors: interactions and regulation of production. Acta Haematol., Basel, v.86, p.128-137, 1991.

BRADFORD M.M 1977. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem., Washington, v.72, p.248-254, 1977.

BRADLEY, S.F.; VIBHAGOLL, A.; FABRICK, S.; TERPENNING, M.S; KAUFFMANN, C.A.- Monokine production by malnourished nursing home patients. Gerontology, Basel, v.36, p.165-170, 1990.

BRUNO, E.; LUIKART, S.D.; LONG, M.W. & HOFFMAN, R. Marrow- derived heparan sulfate proteoglycan mediates the adhesion of hematopoietic progenitor cells to cytokines. Exp. Hematol., New York, v.23, n.11, p.1212-1217, 1995.

BURGESS, A.W., METCALF, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. Blood. New York, v.56, n.6, p.947-958, 1980.

CAMPBELL, A. D. , LONG, M. W., WICHA, M. S. Haemonectin, a bone marrow adhesion protein specific for cells of granulocyte lineage. Nature, London, v.329 n.6141, p.744-746, 1987.

CAMPBELL, A., WICHA, M.S., LONG, M. Extracellular matrix promotes the growth and differentiation of murine hematopoietic cells *in vitro* J. Clin Invest. New York, V.75, n.6, p.2085-2090, 1985.

CATCHATOURIAN, R.; ECKERLING, G., FRIED, W. Effect of short-term protein deprivation on hemopoietic functions of healthy volunteers. Blood, New York, v.55, p.625-628, 1980.

CHANDRA, R.K. - Lymphocyte subpopulations in human malnutrition: cytotoxic and suppressor cells. Pediatrics, Milan, v.59, p.423-427, 1977.

CHANDRA, R.K. Cell-mediated immunity in nutritional imbalance. Fed. Proc., Washington, v.39, n.13, p.3088-3092, 1980.

CHANDRA, R.K.- Nutrition as a critical determinant in susceptibility to infection. World Rev. Nutr. Diet., Basel, v.25, p.166-88, 1976.

CHANDRA, R.K. Nutritional regulation of immunity: an introduction. In: Nutrition and Immunology. Alan R. Liss, Inc., 1988. Cap.1, p1-8.

CHANDRA, S., CHANDRA, R.K. - Nutrition, Immunity: lessons from the past and new insights into the future. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v.53, p.1087-1101, 1991.

CHANDRA, S., CHANDRA, R.K. Nutrition, Immune response, and outcome. Prog. In Food Nutr. Sci., London, v.10, p.1-65, 1986.

CHUNG, A.E. Laminin in HARALSON, M.A., HASSELL, J.R. Extracellular Matrix, A Practical Approach, Oxford University Press, 1995, 108p.

CLARK, B.R., GALLAGHER, J.T., DEXTER, T.M. Cell adhesion in the stromal regulation of haemopoiesis. Baill. Clin. Haematol. London, v.5, p.619-652, 1992.

CONGET, P. & MINGUELL, J. IL3 increases surface proteoglycan synthesis in haemopoietic progenitors and their adhesiveness to the heparin-binding domain of fibronectin. Br. J. Haematol. Oxford, v.89, p.1-7, 1995.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Environmental and nutritional diseases. In: COTRAN, R.S., KUMAR, V., ROBBINS, S.L. Robbins pathologic basis of disease. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 5th ed., 1994. Cap.9, p.379-430.

COUTINHO, L. H. , GEARY, C. G. CHANG, J. Functional studies of bone marrow hemopoietic and stromal cells in the myelodysplastic syndrome (MDS). Br. J. Haematol. Oxford, v.75, p.16-25, 1990.

CUMANO, A. DIETERLEN-LEVRE, F., GODIN, I. Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. Cell, New York, v.86, p.907-916, 1996.

DANOVA, M., AGLIETA, M. Cytokine receptors, growth factors and cell cycle in human bone marrow and peripheral blood hematopoietic progenitors. Haematologica, Pawia, v.82, n.5, p.622-629, 1997.

DE ANGELIS, R.C. - Fisiologia da Nutrição. 1a. ed., São Paulo, Edart, 1977.

DELARCHE, C., CHOLLET-MARTIN, S., Plasma cytokines: what we are measuring. Curr. Opin. Clin. Metab. Care, Philadelphia, v.2, no.6, p.475-479, 1999.

DEXTER, T.M. & TESTA, N. G. In vitro methods in haemopoiesis and lymphopoiesis. J. Immunol. Methods, Amsterdam, v.38, p.177-190, 1980.

DEXTER, T.M., GARLAND, J.M., TESTA, N.G. Colony-stimulating factor. New York: Marcel Dekker Inc., 1990, p.475.

DEXTER, T.M., SPOONER, E. Growth and differentiation in the hemopoietic system. Annu. Rev. cell Biol., Palo Alto, v.3, p.423-441, 1987.

DRABIK, M.D.; SCHNUR, F.C.; MOK. K.T.; MOLDAUER, L.L.; DINARELLO, C.A.; BLACKBURN, G.L.; BISTRAN, B.R. Effect of protein depletion on short-term parenteral refeeding on the host response to interleukin-1 administration. J. Lab. Clin. Med., St. Louis, v.109, p.509-516, 1987.

DZIERZAK, E., MEDVINSKY, A., BRUIJN. Quantitative and qualitative aspects of hematopoietic cell development in the mammalian embryo. Immunol. Today, Cambridge, v. 19, p.228-241, 1998.

EAVES, C.J., CASHMAN, J.D., SUTHERLAND, H.J., OTSUKA, T., HUMPHRIES, R.K. HOGGE, D.E., LANDSDORP, 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.

ERICKSON, H.P. , BOURDON, M.A. Tenascin: na extracellular matrix protein prominent in specialized embryonic tissues and tumours. Annu. Rev. Cell Biol., Palo Alto, v.5, p.71-92, 1987.

FERRO-LUZZI, A., SPADONI, M.A. Protein energy malnutrition. Prog. Food Nutr. Sci., Oxford, v.2, p.515 - 41, 1978.

FFRENCH-CONSTANT C. Alternative splicing of fibronectin-many different proteins but few different functions. Exp. Cell Res., San Diego, v.22, p.261-271, 1995.

FRIED, W.; SHAPIRO, S.; BARONE, J.; ANAGNOSTOU, A. Effect of protein deprivation on hematopoietic stem cells and on peripheral blood counts. J. Lab. Clin. Med., St. Louis, v.92, p.303-310, 1978.

FRIEDRICHLH,C., ZAUSH,E., SUGRUE, S.P., GUTTERREZ-RAMOS, J.C. Haematopoietic supportive functions of mouse bone marrow and fetal liver microenvironment: dissection of granulocyte, B-lymphocyte and hematopoietic progenitor support at the stroma cell clone level. Blood, New York, v.87, p.4595-4606, 1996.

GALLAGHER, J. T. The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. Curr. Opin. Cell Biol, London, v.1, p.1201-1218. 1989.

GALLAGHER, J.T., SPOONCER, E., DEXTER, T.M. Role of cellular matrix in hemopoiesis. I. Syntesis of glycosaminoglycans by mouse bone marrow cell cultures. J. Cell Sci, Cambridge, v.63, p.155-159, 1983.

GARCIA, P.B. Inflamação em Camundongos Submetidos à Desnutrição Proteica: Análise da Mobilização Celular e da Hematopoiese. São Paulo. 1992. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado.

GARCIA, P.B., BARBIERI, D. Influência da desnutrição proteica sobre a função fagocitária de neutrófilos de ratos. Arch. Latinoam. Nutr., Caracas, v.36, p.662-667. 1986.

GEORGE, L.L.; ALVES, C.E.R.; CASTRO, R.R.L. Histologia Comparada, 1a. ed. Roca. 1985.

GIETZEN, D. W., ERECIUS, L.F., ROGERS, Q. R. Neurochemical changes after imbalanced diets suggest a brain circuit mediating anorectic responses to amino acid deficiency in rats. J. Nutr., Philadelphia, v. 128, p.771-781, 1998.

GIETZEN, D.W. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. J. Nutr., Philadelphia, v. 128, p.771-781, 1998.

GORDON, M.Y., RILEY, G.P., WATT, S. M., GREAVES, M.F. Compartmentalization of a haemopoietic growth factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. Nature, London, v.326, p.403-405, 1987.

GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.J., DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. J. Biol. Chem. Bethesda, v.177, p.751-766, 1949.

GREGORY, S.H., MAGEE, D.M., WING, E. J. The role of colony-stimulating factor in host defences. Exp. Biol. Med., Totowa, p.349-360,1991.

GRESSENS, P. MUAKU, S.M., BESSE, L., NSEGHE, E., GALLEG0, J., DELPECH, B., GAULTIER, C. EVRARD, P., KETELSLEGERS, J.M., MALLER, D. Maternal protein restriction early in rat pregnancy alters brain development in the progeny. Brain Res. Dev. Brain. Res., Amsterdam, v.131, n.1, p.21-35, 1997.

GU, Y, SOROKIN, L., DURBEEJ, M., HJALT, T., JÖNSSON, J.I., EKBL0M, M. Characterization of bone marrow laminins and identification of alpha5-containing laminins as adhesive proteins for multipotent hematopoietic FDCP-Mix cells. Blood, New York, v.93, n.8, p.2533-2542, 1999.

HARDY, C.L. & MINGUELL, J.J. A cytoadhesion assay for the binding of cloned hemopoietic progenitor cells to stroma. Exp. Hematol. Oak Ridge, v.21, p.283-288. 1993.

HOTTA, T. MURATE, T., YAMAO, H. YAMADA, H. SAITO, H. Granulopoiesis-supporting effects of marrow stromal cells in continuous culture from patients with primary myelofibrosis. Br. J. Haemat. Oxford, v.64, p.669-673. 1986.

HOUSSAINT, E., HALLET, M.M. Inability of adult circulating haematopoietic stem cells to sustain haemopoiesis in mouse fetal liver microenvironment. Immunology, Oxford, v.64, p.463-467, 1988.

HYNES RO Fibronectins. Springer Series in Molecular Biology. Rich, A Ed. New York. 1990.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – Normas de Qualidade para a Alimentação. São Paulo, v.1, 1967.

JACKSON, C. M. The effects of inanition and malnutrition upon growth and structure. Philadelphia: P. Blakinston's son Co., 1925 .Apud: J. Infect. Dis., Chicago, v.83, p.87-100, 1948.

JOHANSON, S.; RUBIN, K.; HÖÖK, M.; AHLGREN, T. & SELJELID, R. *In vitro* biosynthesis of cold insoluble globulin (fibronectin) by mouse peritoneal macrophages. FEBS Lett., Amsterdam, v.105, no.2, p.313-316. 1979.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Biologia da Interação da Célula Matriz Extracelular. Em Biologia Celular e Molecular, 5a. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 205-214. 1991.

KEATING, A. & GORDON, M.Y. Hierarchical organization of hematopoietic microenvironments: role of proteoglycans. Leukemia, Baltimore, v.2, p.766-769. 1988.

KERST, J.M., SANDERS, J.B., SLAPER-CORTENBACH, I.C., DOORAKERS, M.C., HOOIBRINK, B., VAN OERS, R.H., VON DER BORN, A.E., VAN DER SCHOOT, C.E. Alpha 4 beta 1 and alpha5 beta 1 are differentially expressed during myelopoiesis and mediate the adherence of human CD34+ cells to fibronectin in an activation-dependent way. Blood, New York, v.81, p.344-351, 1993.

KHALDOYANIDI, S., MOLL, J., KARAKHANOVA, S., HERRILICH, P., PONTA, H. Hyaluronata-enhanced hematopoiesis: two different receptor trigger the release of interleukin-1beta and interleukin-6 from bone marrow macrophages. Blood, New York, v.94, n.3, p.940-949, 1999.

KISHIMOTO, T., TAGA, T., AKIRA, S. Cytokine signal transduction. Cell, New York, v.76, p.253-262, 1994.

- KLASING, G.G. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. J. Nutr., Philadelphia, v.118, p.1437-1445, 1988.
- KLEIN, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. Experientia, Basel, v.51, p.914-926, 1995.
- KLEIN, G., KIBLER, C., SCHERMUTZKI, F., BROWN, J., MÜLLER, C.A., TIMPL, R. Cell binding properties of collagen type XIV for human hematopoietic cells. Matrix Biol., Stuttgart, v.16, n.6, p.307-317, 1998.
- KOLSET, S.O., GALLANGHER, J.T. Proteoglycans in haemopoietic cells. Biochem. Biophys. Acta. Amsterdam, v.1032, p.191-211, 1990.
- KORNBERG, A.; DAFT, F.S., SEBRELL, W.H. Granulocytopenia and anemia in rats fed diets of low casein content. Science, Washington, v.103, p.646-48, 1946.
- KOURY, M. J., BOUNDURANT, M.C. Prevention of programmed death in hematopoietic progenitor cells by hematopoietic grow factors. NIPS, Bethesda, v.8, p.170-174, 1993.
- LAEMMLI U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage t 4. Nature, London, v.277, p.680-685, 1970.
- LANNES-VIEIRA J., DARDENE M., SAVINO, W. Extracellular matrix components of the mouse thymus microenvironment. Ontogenetic studies and modulation by glucocorticoid hormones. J. Histochem. Cytochem. Seattle, V.39, p.1539-1546, 1991.
- LAWLER, J., HYNES, R.O. Structural organization of the thrombospondin molecule. Semin. Thromb. Hemost. New York, v.13, p.245-254, 1987.

LONG, M.W. BRIDDELL, R., WALTER, A.W., BRUNO, E., HOFFMAN, R.
Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix
molecules. J. Clin. Invest., New York, v.90, p.251-255, 1992.

LONG, M.W., DIXIT, V.M. Thrombospondin functions as a cytoadhesion
molecule for human hematopoietic progenitor. Blood, New York, v.75,
p.2311-2318, 1990.

LOUAY OMRAN, M., MORLEY, J.E. Assessment of protein energy
malnutrition in older persons, PartII: Laboratory evaluation. Nutrition, New
York, v.16, n.2, p.131-140, 2000.

LOWRY, P.A. Hematopoietic stem cell cytokine Response. J Cell. Biochem.
New York, v.58, p.410-415, 1995.

LUIKART, S.D., MANIGLIA, C.A. FURCHT, L.T., MCCARTHY, J. B.,
OEGEMA, T.R. A heparan sulphate-containing fraction of bone marrow
stroma induces maturation of HL-60 cells in vitro. Cancer Res.
Philadelphia, v.50, p.3781-3785, 1990.

LYRA, J.S.; MADI, K.; MAEDA, C.T., SAVINO, W. Thymic extracellular
matrix in human malnutrition. J Pathol. Chichester, v.171, no.3, p.231-
236, 1993.

MARSH, J.C.W., CHANG, J. , TESTA, N. G., HOWS, J.M., DEXTER, T.M. *In*
vitro assesment of marrow "stem cell" and stromal cell function in aplastic
anemia. Br. J. Haematol. Oxford, v. 78, p.258-267, 1991.

MAYANI, H.; GUILBERT, L. J. & JANOWSKA-WIECZREK, A. Biology of the
hemopoietic microenvironment. Eur. J. Haematol. Copenhagen, v.49,
no.5, p.225-233. 1992.

- MAZUR, E.M., COHEN, J. L. Basic concepts of hematopoiesis and the hematopoietic growth factors. Clin. Pharmacol., New York, v.46, p.250-256, 1989.
- MCCARTHY, D.M. Fibrosis of the bone marrow: content and causes. Br. J. Haematol. Oxford, v.59, p.1-7, 1985.
- MEDVINSKY, A.L., GAN, O.I., SEMENOVA, M.L., SAMOYEINA, N.L. Development of day-8 colony-forming unit-spleen hematopoietic progenitors during early murine embryogenesis: spatial and temporal mapping. Blood, New York, v.32, p.162-183, 1995.
- METCALF, D. The molecular control of proliferation and differentiation in hemopoietic cells. J. Immunol., Bethesda, v.153, p.4978- 4987, 1993.
- MIWA, T.; SHOJI, H.; SOLOMONOW, M. & NAKAMOTO, T. The effects of prenatal protein-energy malnutrition on ossification of fetal rat bones: a biochemical study. Orthopedics, Thorofare, v.13, no.5, p.541-548, 1990.
- MOHANDAS, N. & PRENANT, M. - Three-dimensional model of bone marrow. Blood, New York, v.50, p.633- 43, 1978.
- MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, fome e da desnutrição no Brasil, Estudos Avançados, v.9, p.207, 1995.
- MUÑOZ, E.; MARCOS, A. & UNZAGA, M.T. Effect of protein deficiency on the lysosomal enzyme activities of the spleen and thymus of weanling rats. J. Nutr., Philadelphia, v.111, p.2133-2141. 1981.
- NARDI, N.B, ALFONSO, Z.Z.C. The hematopoietic stroma. Braz. J. Med. Biol. Res., Ribeirão Preto, v.32, no.5, p.601-609, 1999.

NATHAN, C. & SPORN, M. Cytokines in context. J. Cell Biol. New York, v.113 p.981-986, 1991.

NILSSON, S. K., DEBATIS, M.E, DOONER, M. S., MADRI, J.A., QUESENBERRY, P. J., BECKER, P.S. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. J. Histochem. Cytochem., Seattle, v.46, no.3, p.371-377. 1998.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. Blood, New York, v.81, p.2844-2853, 1993.

OGURI, K., OKAYAMA, AE., CATERSON, B., OKAYAMA, M. Isolation, chaterization, and localization of glycosaminoglycans in rabbit bone marrow. Blood, New York, v.70, p.501-510, 1987.

OPAS, M. Substratum mechanics and cell differentiation. Int. Rev. Cytol. New York, v.150, p.119-137, 1994.

ORTIZ, R. , BETANCOURT, M. Proliferation in bone marrow cell of severely malnourished animals. J. Nutr., Philadelphia, v. 114, p. 472-476, 1984.

PATEL, V.P., LODISH, H.F. Fibronectin matrix is required for differentiation of murine erytroleukemia cells into reticulocytes. J. Cell Biol., New York, v.105, p.3105-3118, 1987.

PATEL, V.P., LODISH, H.F. Loss of adhesion of murine erythroleukemia cells to fibronectin during erythroid differentiation. Science, Washington, 224., p.996-998,1984.

PETERS C, BUDDE CL, BREON TA, KUPER A & KIM J. Ovine Bone marrow extracellular matrix and soluble protein extraction: fetuin amino

- terminus microheterogeneity. The Am. J. of the Medical Sciences, Washington, v.309, p.285-294, 1995.
- PETERS, C.; O'SHEA, K.S.; CAMPBELL, A.D.; WICHA, M.S., LONG, M.W.
Fetal expression of hemonectin: an extracellular matrix hematopoietic cytoadhesion molecule. Blood, New York, v.75, p.375-364, 1990.
- PETERS, W.P. : HOLLAND, J.F. SENN, H.; RHOMBERG, W.;
BENERJEE, T. – Corticosteroid administration and localized leukocyte, mobilization in man. N. Eng. J. Med., Boston, v.282, p.342-45, 1972.
- REEVES, P. G., NIELSEN, F. H. , FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc committee on the reformulation of the AIN-76^A rodent diet. Am. Inst. Nutr. v.123, p.1939-1951, 1993.
- REIF, S.; LU, R.B.; TANO, M.; TERRANOVA, V.; YOUNG, C.; FISSHER, J.; PETELL, J. & LEBENTHAL, E. Perinatal food restriction in rats reduces the content but not concentration of liver extracellular matrix proteins. J. Nutr., Philadelphia, v.123, n.5, 811-816. 1993.
- REILLY, J. T. Pathogenesis of idiopathic myelofibrosis: role of growth factor. J. Clin. Pathol. v.45, p.461-464, 1992.
- SACHS, L. The adventures of a biologist: prenatal diagnosis, hematopoiesis, leukemia, carcinogenesis and tumor suppression. Adv. Cancer Res., London, v.66, p.1-40, 1995.
- SAGE, E. H. & BORNSTEIN, P. Matrix components produced by endothelial cells: type VIII collagen, SPARC, and thrombospondin in HARALSON, M.A., HASSELL, J.R. Extracellular Matrix, A Practical Approach, Oxford Universit Press, 1995, p.155.

- SAKSELA, O., MOSCATELLI, D., SOMMER, A. DIFKIN, D.B. Endothelial cell-derived heparan sulphate binds bFGF and protects it from proteolytic degradation. J. Cell Biol., New York, v.107, p.743-751, 1988.
- SCHOFIELD, C., ASHWORTH, A. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high? Bull. W.H.O., Geneva, v.74, n.2, p.223-229, 1996.
- SCHUPPAN, D., RÜHL, M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. Braz. J. Med. Biol. Res., Ribeirão Preto, v.27, p.2125-2141, 1994.
- SCHWARZBAUER, J.E., SECHLER, J.L. Fibronectin fibrillogenesis: paradigm for extracellular matrix assembly. Curr. Opin. Cell Biol., London, v.11, p.622-627, 1999.
- SCOTT, J.E. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, *in vitro* and in the tissues. FASEB J. Bethesda, v.6, p.2639-2645. 1992.
- SCRIMSHAW, N.S. - Nature of protein requirements. J. Am. Diet. Assoc., Chicago, v.54, p.94-102, 1969.
- SEGAT, D., PUCILLO, C., MAROTA, G., PERRIS, R., COLOMBATTI, A. Differential attachment of human neoplastic B cells to purified extracellular matrix molecules. Blood, New York, v.83, p. 1586-1594., 1994.
- SHADDUCK, R. K. Aplastic anemia in: BEUTLER, e., LICHTMAN, M. A., COLLER, B. S., KIPPS, T. J. Williams Hematology. Int. Ed.: McGraw-Hill, Inc. 5th ed., 1995. Cap.24, p.238-248.

SHIOYA, Y., WILSON, J.G., HARJES, K. ZANJANI, E.D., TAVASSOLI, M.A.
NOVEL 37Kd adhesive membrane protein from cloned murine bone marrow stromal cells and cloned murine hematopoietic progenitor cells. Blood. New York, v.82, p.1436-1444, 1993.

SICZKOWSKI, M., AMOS, S.A., GORDAN, M.Y. Hyaluronic acid regulates the function and distribution of sulfated glycosaminoglycans in bone marrow stromal cultures. Exp. Hematol. Oak Ridge, v.21, p.126-130, 1993.

SLAPER-CORTENBACH, I., PLOEMCHER, R., LOWENBERG, B. Different stimulate effects of human bone marrow and fetal liver stromal cells on erythropoiesis in long-term culture. Blood. New York, v.69, p.135-139, 1987.

SOCOLOVSKY, M., CONSTANTINESC, S.N., BERGELSON, S., SIROTKIN, A., LODISH, H.F. In Cytokines in hematopoiesis: specificity and redundancy in receptor function. SOCOLOVSKY, M., CONSTANTINESC, S.N., BERGELSON, S., SIROTKIN, A., LODISH, H.F. Advances in Protein Chemistry, Copyright Academic Press, v. 52, 1999, p. 141-198.

SOEDE-BOBOK, A.A. , TOUW, I.P. Molecular understanding of hematopoietin/ cytokine receptor signaling defects in hematopoietic disorders. J. Mol. Med., Shannon, v.75, n.7, p.470-477,1997.

SOINI, Y; KAMEL, M.; APAJA-SARKKINEN, M., VIRTANEN, I.; LEHTO, V. P. Tenascin immunoreactivity in normal and pathological bone marrow. J. Clin. Pathol., London, v.46, p.218-221. 1993.

SOUZA, I.P., KANG, H.C., NARDINELLI, L., BORELLI, P. Desnutrição protéica: efeito sobre o exsraiamento, a fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoniais. RBCF. São Paulo, 2000 (Submetido).

- SPONCER, E.; GALLAGHER, J.T. KRIZSA, DEXTER, T.M. Regulation of haemopoiesis in long term bone marrow cultures. IV Glycosaminoglycans syntesis and the stimulation of haemopoiesis by xylosides. J.Cell Biol. New York, v.96, p.510-515, 1983.
- STINNETT, J.D. Nutrition and the immune response, CRC Press, 150p.1983.
- STOHLMANN, F. J. Editorial: aplastic anemia. Blood, new York, v.40, p. 282, 1972.
- STREULI, C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. Curr. Opin. Cell Biol., London, v.11, p.634-640, 1999.
- SUCHARD, S.J., MANSFIELD, P.J., DIXIT, V.M. Modulação of thrombospondin receptor expression during HL60 cell differentiation. J. Immunol. Bedesda, V.152, p.877-888, 1994.
- SUDA, K.A.; MATHUR, M.; DEO, K.; DEO, M.G. - Kinetics of mobilization of neutrophils and their marrow pool in protein-calorie deficiency. Blood, New York, v.48, p.864-75, 1976.
- SUGAHARA, H., KANAKURA, Y., FURITSU, T., ISHIKAWAMA, J., HASHIMOTO, K., KANAYAMA, Y., MATSUZAMA, Y. Induction of programmed cell death in human hematopoietic cell lines by fibronectin via its interaction with very late antigen 5. J. Exp. Med., New York, v.179, p.1757-1766, 1994.
- SYNDER, E.L.; LUBAN, N.C. Fibronectin: applications to clinical medicine. Clin. Rev. Clin. Lab. Sci. Cleveland, v.23, n.1, p.15-34, 1986.
- TAVASSOLI, M., MINGUELL, J.J. Homing of hemopoietic progenitor cell to the marrow. P.S.E.B.M., v.196, p.367-373, 1991.

TESTA, N.G. & MOLINEUX, G. Haemopoiesis: A practical Approach. New York: Oxford University Press Inc., 1993.

TESTA, N.G. In vitro biological activities of the haemopoietic growth factor: implication for their clinical use. Acta Haematol., Basel, v.86, p.122-12, 1991

TOWBIN, H., STAEBELI, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., v.455, p.68-78, 1979.

TRENTIN, J.J. Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hematopoietic inductive microenvironments (HIM). Am. J. Pathol., Bethesda, v.65, p.621-28, 1971.

TRETIN, J.J. Hemopoietic microenvironment. Transp. Proceed., New York, v.10, p.77-72. 1978.

TURNBULL, J.E., LYON, M., GALLAGHER, J.T. Structural analysis of glycosaminoglycans in HARALSON, M.A., HASSELL, J.R. Extracellular Matrix, A Practical Approach, Oxford University Press, 1995, 201p.

VEGA FRANCO, L. Conceptual milestones in the history of protein-energy malnutrition. Salud Pública Mex., Cuernavaca, v.41, n.4, p.328-333, 1999.

VERFAILLIE, C.M., MCCARTHY, J.B., MCGLAVE, P.B. Differentiation of primitive human multipotent hematopoietic progenitors into single lineage clonogenic progenitors is accompanied by alterations in their interaction with fibronectin. J.Exp. Med., New York, v.174, p.693-703.1991.

- WATANABE, S., ARAI, K. Roles of the JAK-STAT system in signal transduction via cytokine receptors. Curr. Opin. Genet. Dev., London, v.6, n.5, p.587-596, 1996.
- WATERLOW, J.C. Malnutrición proteico-energética. Washington: Organización Panamericana de la Salud (Publicação Científica No 555), 1996. 501p.
- WATERLOW, J.G. & ALLEYNE, G.A.O. - Protein malnutrition in children: advances in knowledge in the last ten years. Advances Protein Chemistry, vol. 25, Academic Press, 1971.
- WHATEN, L. M. , KNAPP, S.A. DEGOWIN, R.L. Supression of marrow stromal cells and microenvironment damage following sequential radiation and cyclophosphamide. Internat. J. Rad. Oncol. Biol. Phys. New York, v.7, p.935-941, 1981.
- WITTELS, B. Cytopenias not related to hematopoietic malignancy in: BENNINGTON, J. L. ed., Surgical Pathology of Bone Marrow, Philadelphia, w. b. Saunders Company, 1985, p. 121-139.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Food and nutrition terminology. Circular no.27, W. H. O. 1973.
- XAVIER, J.G., Repercussões estruturais da desnutrição protéica e renutrição em tecidos linfo-hematopoiéticos de camundongos. São Paulo, 1999. 254p. (Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP.)
- YAMADA, K. M. Cell surface interations with extracellular materials. Ann. Rev. Biochem. Palo Alto, v.52, p.761-799, 1983.

YOSHIKAWA H & SAKIHAMA Y (1996). Costimulation of fibronectin receptor promotes Fc gamma R-mediated rescue of IL-3-dependent bone marrow-derived cells from apoptosis. J. Immunol., Bethesda, v.156, n.5, p.1832-1840.

YOUNG, V.R., MARCHINI, J. S., CORTIELLA, J. Assessment of protein nutritional status. J. Nutr. Bethesda, v.120, 1496-1496-1502, 1990.

YU, L.C., KUVIBIDILA, S., DUCCOS, R., WARRIER, R.P. Nutritional status of children with leukemia. Med. Pediatr. Oncol., New York, v.22, n.2, p73-77. 1994.

YURCHENCO, P.D., O'REAR J. Basal lamina assembly. Cur. Opin. Cell Biol. London, v.6, p.674-681, 1994.

8 ANEXOS

8.1 PADRONIZAÇÕES E SOLUÇÕES UTILIZADAS.

8.1.1 Padronização da solução extratora da matriz extracelular da medula óssea de camundongos

Soluções avaliadas :

A) Solução “A” pH 6,0 (PETERS et al, 1995):

Guanidina (Merck)	6M
DTT (Dithiotheitol)	2mM
EDTA (sal sódico de etilenodiamino	
Tetraacético ácido)	10mM
Tris	50mM
Acertar pH e 6,0 com NaOH ou HCl 0,1N	

No momento do uso acrescentou-se os seguintes inibidores de proteases:

Ácido capróico	10mM
Benzamidina	1mM
PMSF	1mM

B) Solução “B” (ALVAREZ SILVA et al, 1996):

Ácido capróico	1mM
PMSF	1mM
Benzamidina	5mM
EDTA	20mM
Uréia	

C) Solução “C”, PBS 0,02M pH 7,3 (PETERS et al, 1995):

Fosfato ácido de sódio	0,5mM
Fosfato dibásico de sódio	1,9mM
Cloreto de sódio	17,9mM
Acertar pH em 7,3 com NaOH ou HCL 0,1N	

Coleta da matriz extracelular para padronização da solução extratora com o propósito de avaliar glicoproteínas adesivas (laminína, fibronectina e trombospondina)

As soluções acima (**A**, **B** e **C**) foram avaliadas em material obtido de camundongos normais alimentados com ração comercial Purina^R. O material foi obtido através da lavagem do canal medular dos femures dos camundongos, acondicionados em tubos plásticos e mantidos sempre em banho de gelo (4°C), empregando-se 20µL da solução extratora para cada femur. As preparações foram centrifugadas a 2.500 g por 15 minutos (4°C) recolhendo-se o sobrenadante contendo MEC e proteínas solúveis **e doravante denominado extrato**. Uma vez que a medula óssea presente em camundongos é relativamente pequena, estamos constituindo “pool” com os sobrenadantes obtidos de 5 animais.

Solução Extratora da Matriz Extracelular para Análise das Glicoproteínas Adesivas

Das soluções extratoras avaliadas, contendo guanidina (A), uréia (B) ou PBS (C), concluímos que para caracterização de glicoproteínas a solução extratora que contém PBS (solução C) suplementada com inibidores de proteases foi a que apresentou melhor rendimento, em relação à concentração de proteínas totais avaliada pelo método de BRADFORD, 1977 (**tabela 1**) e análise do perfil eletroforético demonstrou a presença de proteínas de alto peso molecular, conforme o proposto por PETERS et al, 1995.

TABELA 1- Comparação das concentrações de proteínas obtidas empregando-se diferentes soluções extratoras

Solução Extratora	A	B	C
Proteínas (µg)	2,1	1,1	2,4

Onde: A- Solução contendo guanidina 6M (n =2)
 B- Solução contendo uréia 4M (n=1)
 C- Solução contendo PBS (n=2)

OBS. A eletroforese em SDS-PAGE 7,5% realizada com as soluções avaliadas apresentou maior concentração de bandas de alto peso molecular (150 A 220 KDa) na solução contendo apenas PBS e inibidores de proteases.

8.1.2 Soluções Utilizadas para a realização da eletroforese em gel descontínuo desnaturante (SDS), método de Laemmli, 1970.

Para 10 ml de gel de separação 7,5%:

Solução de acrilamida / bis 30%/ 0,8%	2,5 ml
Solução Tris/SDS pH 8,8	2,5 ml
Água Ultrapura	4,94 ml
sulfato de amônia 10%	50 µl
TEMED	10 µl

Solução estoque acrilamida / bis acrilamida 30% / 0,8%:

Acrilamida (Gibcco)	30,0 g
Bisacrilamida (Gibcco)	0,8 g
Água destilada qsp	100 ml

Obs. Filtrar em membrana de 0,45 µm. acondicionar em frasco âmbar, a 4°C. Descartar após 30 dias da preparação. Na manipulação do reagente, utilizar luvas e máscara.

Solução tris / SDS (1,5 m de Tris / 0,4%SDS)

Tris base	91 g
SDS	2 g
Água destilada	30 ml
Ajustar pH 8,8 com HCL 1N	
Água q.s.p.	500 ml

Armazenar a 4°C.

Para 5ml de gel de alinhamento a 4%

Solução de acrilamida / bis 30% / 0,8%	0,65 ml
Solução Tris / SDS pH 6,8	1,25 ml
Água Ultrapura	3,05 ml
Persulfato de amônia 10%	25 μ l
TEMED	5 μ l

Solução Tris / SDS (0,5 M de Tris pH 6,8 / 0,4%SDS)

Tris base	6,05 g
SDS	0,4 g
Água destilada	40 ml
Ajustar pH 6,8 com HCL 1N	
Água q.s.p.	100 ml

Armazenar a 4°C.

Tampão da amostra (DTT-Tris)

DTT (diethilteitrol)	3,25 mg
Tris 0,5m, ph 6,8	2,0 ml
SDS	500 mg
Azul de bromo fenol	150 μ l
Água q.s.p.	5 ml

Azul de bromofenol

Glicerol	20 ml
Azul de bromofenol	4,0 g
Água q.s.p.	100 ml

Tampão de Corrida

TRIS 24,8 mM	3,0 g
Glicina 192 mM	14,4 g
SDS 0,1%	1,0 g
Água q.s.p.	1000 ml

Tampão TRIS – Tween (TRIS– T):

TRIS-base	2,42 g
NaCl	8,0 g
Ajustar o pH em 7,6 com HCL 1N	
Água qsp	1000 ml
*Acrescentar 0,1% de Tween - 20	

8. 2 ANÁLISE DESCRITIVA DOS RESULTADOS.

8. 2. 1 Controle diário do peso dos animais

Tabela 1- Curva Peso. Valores obtidos e análise estatística do período de nutrição experimental dos camundongos do grupo controle (dieta com 20 % de caseína) e grupo desnutrido (dieta hipocalórica com 4% de caseína), no 1º dia (início) e 3º dia do experimento.

	1º dia		3º dia	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	38,24	37,77	34,77	33,22
Mediana	38,35	38,35	35,25	33,40
Desvio Padrão	2,06	2,39	3,14	2,99
Erro Padrão	0,31	0,35	0,47	0,43
IC 95% (inferior)	37,62	37,62	33,82	32,36
IC 95% (superior)	38,87	38,87	35,73	34,08
Número	64	69	64	69
Valor de p	0,9876		0,0042 *	

Nota : * Diferença significativa. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 2 - Curva Peso. Valores obtidos e análise estatística do período de nutrição experimental dos camundongos do grupo controle (dieta com 20 % de caseína) e grupo desnutrido (dieta hipocalórica com 4% de caseína), no 5º dia (início) e 8º dia do experimento.

	5º dia		8º dia	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	34,42	31,43	35,47	30,63
Mediana	34,80	31,20	35,50	30,30
Desvio Padrão	3,23	2,75	2,75	2,95
Erro Padrão	0,49	0,39	0,41	0,42
IC 95% (inferior)	33,44	30,64	34,64	31,48
IC 95% (superior)	35,40	32,22	36,31	23,30
Número	64	69	64	69
Valor de p	p<0,0001		p<0,0001	

Nota : As diferenças encontradas foram significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney e teste *t* de student, através do Programa Instat-2.

Tabela 3 - Curva Peso. Valores obtidos e análise estatística do período de nutrição experimental dos camundongos do grupo controle (dieta com 20 % de caseína) e grupo desnutrido (dieta hipocalórica com 4% de caseína), no 10º dia, 12º dia e 14º dia do experimento.

	10º dia		12º dia		14º dia	
	C	D	C	D	C	D
Média	35,55	29,79	36,34	28,26	37,95	27,95
Mediana	35,70	29,40	36,05	28,30	38,15	28,00
Desvio Padrão	3,07	3,13	2,74	3,01	2,0430	3,12
Erro Padrão	0,46	0,45	0,41	0,43	0,31	0,44
IC 95% (inferior)	34,62	28,89	35,51	27,40	37,33	27,05
IC 95% (superior)	36,49	30,69	37,17	29,13	38,58	28,85
Número	64	69	64	69	64	69
Valor de P	P<0,0001		P<0,0001		P<0,0001	

Legenda: C - Controle , D - Desnutrido

Nota : As diferenças encontradas foram significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney e teste *t* de estudante, através do Programa Instat-2.

8. 2. 2 Consumo de Ração

Tabela 4- Curva consumo de ração. Valores obtidos e análise estatística do período de nutrição experimental dos camundongos do grupo controle (dieta com 20 % de caseína) e grupo desnutrido (dieta hipocalórica com 4% de caseína), no 3º dia (início) e 5º dia do experimento.

	3º dia		5º dia	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	2,53	2,00	3,82	3,48
Mediana	2,35	2,00	3,80	3,50
Desvio Padrão	0,52	1,05	0,65	0,68
Erro Padrão	0,12	0,28	0,14	0,16
IC 95% (inferior)	2,27	1,39	3,53	3,14
IC 95% (superior)	2,79	2,61	4,12	3,82
Número	18	14	21	18
Valor de P	0,1610		0,1669	

Nota : As diferenças não foram significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 5 – Curva consumo de ração. Valores obtidos e análise estatística do período de nutrição experimental dos camundongos do grupo controle (dieta com 20 % de caseína) e grupo desnutrido (dieta hipocalórica com 4% de caseína), no 8º dia (início) e 10º dia do experimento.

	8º dia		10º dia	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	4,35	3,38	4,65	2,76
Mediana	3,99	3,00	4,60	3,00
Desvio Padrão	0,90	0,83	0,65	0,53
Erro Padrão	0,18	0,19	0,12	0,12
IC 95% (inferior)	3,99	2,98	4,40	2,51
IC 95% (superior)	4,72	2,20	4,91	3,01
Número	26	19	27	20
Valor de P	P=0,0006		P<0,0001	

Nota : As diferenças encontradas foram significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 6 – Curva consumo de ração. Valores obtidos e análise estatística do período de nutrição experimental dos camundongos do grupo controle (dieta com 20 % de caseína) e grupo desnutrido (dieta hipocalórica com 4% de caseína), no 12º dia (início) e 14º dia do experimento.

	12º dia		14º dia	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	4,95	1,99	4,94	1,60
Mediana	5,00	2,00	4,80	1,65
Desvio Padrão	0,78	0,90	0,70	0,88
Erro Padrão	0,15	0,20	0,14	0,20
IC 95% (inferior)	4,65	1,57	4,65	1,19
IC 95% (superior)	5,26	2,41	5,22	2,01
Número	27	20	25	
Valor de p	p<0,0001		p<0,0001	

Nota : As diferenças encontradas foram significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 7 – Consumo de ração. Valores obtidos e análise estatística do período de nutrição experimental dos camundongos do grupo controle (dieta com 20 % de caseína) e grupo desnutrido (dieta hipocalórica com 4% de caseína), valores obtidos de todos e expressos em consumo diário.

	Controle	Desnutrido
Média	4,20	2,50
Mediana	4,50	2,50
Desvio Padrão	0,93	0,87
Erro Padrão	0,38	0,36
IC 95% (inferior)	3,22	1,58
IC 95%.(superior)	5,18	3,50
Número	27	20
Valor de p	0,0152	

Nota : As diferenças encontradas foram significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

8. 2. 3 Avaliação *in vitro* da Capacidade das Proteínas da MEC Sustentar Proliferação e,ou Sobrevivência de Células FDC-P1.

Tabela 8 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a célula FDC-P1 sobre a MEC nas concentrações de **0,1** e **0,5 µg** de proteínas totais das amostras **controle** e **desnutrido**.

	0,1 µg		0,5 µg	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	0,4377	0,4669	0,4281	0,4438
Mediana	0,4435	0,4580	0,4520	0,4530
Desvio Padrão	0,0637	0,0627	0,0601	0,0390
Erro Padrão	0,0159	0,0157	0,0150	0,0101
IC 95% (inferior)	0,4039	0,4335	0,3960	0,4222
IC 95% (superior)	0,4717	0,5004	0,4601	0,4654
Número	16	16	16	15
Valor de P	0,1520 (2P) / 0,0760 (1P)*		0,5532	

Nota : Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2. * Considerado não totalmente significativo.

Tabela 9 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1 sobre a MEC nas concentrações de **1,0** e **2,0** μg de proteínas totais das amostras **controle** e **desnutrido**.

	1,0 μg		2,0 μg	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	0,4346	0,4454	0,4305	0,4325
Mediana	0,4390	0,4510	0,4400	0,4555
Desvio Padrão	0,0755	0,0570	0,0476	0,0562
Erro Padrão	0,0189	0,0147	0,0123	0,0140
IC 95% (inferior)	0,3943	0,4139	0,4042	0,4026
IC 95% (superior)	0,4748	0,4770	0,4569	0,4624
Número	16	15	15	16
Valor de p	0,4409		0,8744	

Nota: As diferenças apresentadas não são significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 10 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1 sobre a MEC na concentração de **5 µg** de proteínas totais das amostras **controle** e **desnutrido**, proliferação da célula sob estímulo de 500 µg/ml de IL₃ recombinante (controle positivo do experimento) e diretamente sobre o plástico (controle negativo do experimento).

	5,0 µg		0 µg	0 µg
	Controle	Desnutrido	500 µg de IL ₃	Plástico
Média	0,3880	0,3927	0,5618	0,3177
Mediana	0,3835	0,3915	0,5645	0,3400
Desvio Padrão	0,0863	0,0687	0,0753	0,0509
Erro Padrão	0,0216	0,0172	0,02175	0,0127
IC 95% (inferior)	0,3420/	0,3561/	0,5140	0,2907
IC 95% (superior)	0,4340	0,4293	0,6097	0,3448
Número	16	16	16	16
Valor de p	0,8951		<0,0001*	

Nota: * Diferenças extremamente significativas. A proliferação na presença de IL3 (controle positivo do experimento) e diretamente sobre o plástico (controle negativo do experimento) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para todos os ensaios em todas as concentrações de MEC controle e desnutrido testadas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

8. 2. 4 Ensaios Comparando MEC fixadas a substrato plástico com MEC Solúvel no Meio de Cultura.

Tabela 11 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1 sobre a MEC nas concentrações de **0,1** e **0,5 µg** de proteínas totais das amostras **controle** fixa no substrato de poliestireno (**F**) e solúvel no meio de cultura (**S**)

	0,1 µg		0,5 µg	
	F	S	F	S
Média	0,4550	0,4173	0,4505	0,4012
Mediana	0,4560	0,4200	0,4550	0,4065
Desvio Padrão	0,0148	0,0119	0,0211	0,0207
Erro Padrão	0,0062	0,0060	0,0105	0,0103
IC 95% (inferior)	0,4315	0,3983	0,4170	0,3684
IC 95% (superior)	0,4785	0,4362	0,4840	0,4341
Número	4	4	4	4
Valor de P	0,0286		0,0286	

Nota : As diferenças apresentadas são significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 12 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1 sobre a MEC nas concentrações de **1,0** e **2,0 µg** de proteínas totais das amostras **controle** fixa no substrato de poliestireno (**F**) e solúvel no meio de cultura (**S**).

	1,0 µg		2,0 µg	
	F	S	F	S
Média	0,4395	0,4112	0,4517	0,4300
Mediana	0,4390	0,4110	0,4520	0,4300
Desvio Padrão	0,0201	0,0113	0,0154	0,0046
Erro Padrão	0,0103	0,0056	0,0077	0,0024
IC 95% (inferior)	0,4066	0,3933	0,4273	0,4227
IC 95% (superior)	0,4724	0,4292	0,4762	0,4373
Número	4	4	4	4
Valor de P	0,1143		0,0286 *	

Nota : * Diferença significativa. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 13 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1 sobre a MEC nas concentrações de **0,1** e **0,5 µg** de proteínas totais das amostras **desnutrido** fixa no substrato poliestireno (**F**) e solúvel no meio de cultura (**S**).

	0,1 µg		0,5 µg	
	F	S	F	S
Média	0,4607	0,4247	0,4612	0,4205
Mediana	0,4580	0,4260	0,4635	0,4315
Desvio Padrão	0,0062	0,0055	0,0159	0,0265
Erro Padrão	0,0031	0,0027	0,0079	0,0133
IC 95% (inferior)	0,4360	0,4160	0,4360	0,3783
IC 95% (superior)	0,4865	0,4335	0,4865	0,4627
Número	4	4	4	4
Valor de P	0,0286		0,0286	

Nota : As diferenças encontradas foram significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 14 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1 sobre a MEC nas concentrações de **1,0** e **2,0 µg** de proteínas totais das amostras **desnutrido** fixa no substrato de poliestireno (**F**) e solúvel no meio de cultura (**S**).

	1,0 µg		2,0 µg	
	F	S	F	S
Média	0,4523	0,4173	0,4587	0,4315
Mediana	0,4520	0,4150	0,4555	0,4310
Desvio Padrão	0,0015	0,0083	0,0075	0,0037
Erro Padrão	0,0007	0,0047	0,00377	0,0018
IC 95% (inferior)	0,4499	0,4040	0,4467	0,4256
IC 95% (superior)	0,4546	0,4305	0,4708	0,4374
Número	4	4	4	4
Valor de P	0,0286		0,0286	

Nota : As diferenças encontradas foram significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

8. 2. 5 Avaliação da Influência da MEC da Medula Óssea associada a Fatores de Crescimento sobre a Proliferação e Sobrevivência Celular *in vitro*

8. 2. 5.1 Avaliação da Interação da MEC a Fatores de Crescimento

Tabela 15 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1 sobre a MEC nas concentrações de **0,1** e **0,5 µg** de proteínas totais das amostras **controle** e **desnutrido fixa** no substrato (poliestireno) sob estímulo de 10pg/ml de IL₃ recombinante.

	0,1 µg		0,5 µg	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	0,4923	0,5000	0,5033	0,5110
Mediana	0,4906	0,4955	0,5022	0,5093
Desvio Padrão	0,0075	0,0200	0,0108	0,0084
Erro Padrão	0,0037	0,0100	0,0054	0,0042
IC 95% (inferior)	0,4804	0,4682	0,4917	0,5225
IC 95% (superior)	0,5041	0,5317	0,5170	0,5093
Número	4	4	4	4
Valor de P	0,8857		0,3429	

Nota : As diferenças apresentadas não são significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 16 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1 sobre a MEC nas concentrações de **0,1** e **0,5 µg** de proteínas totais das amostras controle e desnutrido **solúvel** no meio de cultura sob estímulo de 10pg/ml de IL₃ recombinante.

	0,1 µg		0,5 µg	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	0,5297	0,5335	0,5231	0,5214
Mediana	0,5375	0,5330	0,5280	0,5187
Desvio Padrão	0,0215	0,0077	0,0283	0,0108
Erro Padrão	0,0108	0,0038	0,0142	0,0054
IC 95% (inferior)	0,4954	0,5213	0,4780	0,5042
IC 95% (superior)	0,5639	0,5457	0,5682	0,5386
Número	4	4	4	4
Valor de P	0,6857		0,8857	

Nota : As diferenças apresentadas não são significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 17 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1, proliferação da célula sob estímulo de 10 $\mu\text{g/ml}$ de IL_3 recombinante proliferação da célula sob estímulo de 500 $\mu\text{g/ml}$ de IL_3 recombinante (controle positivo do experimento) e diretamente sobre o plástico (controle negativo do experimento).

	500 μg de IL_3	10 μg de IL_3	Plástico
Média	0,6120	0,3625	0,3458
Mediana	0,6141	0,3690	0,3465
Desvio Padrão	0,0086	0,0165	0,0098
Erro Padrão	0,0044	0,0083	0,0049
IC 95% (inferior)	0,5989	0,3362	0,3302
IC 95% (superior)	0,6265	0,3888	0,3613
Número	4	4	4

Nota: A proliferação na presença de 10 $\mu\text{g/ml}$ de IL_3 , 500 $\mu\text{g/ml}$ IL_3 (controle positivo do experimento) e diretamente sobre o plástico (controle negativo do experimento) apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) para os ensaios com 10 $\mu\text{g/ml}$ de IL_3 em todas as concentrações de MEC controle e desnutrido testadas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 18 – Testamos a capacidade da MEC de atuar sinergicamente com as citocinas. Nestes experimentos adicionamos 500 pg/ml de rGM-CSF ou rIL-3.

	rGM-CSF		rIL3	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	0,5615	0,5675	0,6197	0,6028
Mediana	0,5684	0,5582	0,6244	0,5954
Desvio Padrão	0,0843	0,0691	0,0538	0,0299
Erro Padrão	0,0298	0,0244	0,0190	0,0106
IC 95% (inferior)	0,4911	0,5097	0,5747	0,5778
IC 95% (superior)	0,6320	0,6253	0,6646	0,278
Número	8	8	8	8
Valor de P	0,5054		0,4418	

Nota : As diferenças apresentadas não são significativas. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

Tabela 19 – Valores em absorbância do ensaio de proliferação realizado com a linhagem celular FDC-P1, proliferação da célula sob estímulo de 500 $\mu\text{g/ml}$ de IL3 e GM-CSF recombinante (controles positivos do experimento) e diretamente sobre o plástico (controle negativo do experimento).

	500 μg de IL ₃	500 μg de GM-CSF	Plástico
Média	0,6555	0,5626	0,2870
Mediana	0,6614	0,5591	0,2870
Desvio Padrão	0,0585	0,0808	0,0036
Erro Padrão	0,0207	0,0286	0,0012
IC 95% (inferior)	0,6066	0,4950	0,2780
IC 95% (superior)	0,7044	0,6302	0,2960
Número	8	8	7

8. 2. 5. 2 Avaliação da Capacidade de Ligação da MEC a Fatores de Crescimento

Tabela 20 – Proliferação de células mielóides FDC-P1 sobre a 1 µg de MEC obtida de medula óssea de camundongos controle e desnutridos. Testamos os efeitos da **preincubação** da MEC com 500 pg/ml de rGM-CSF ou rIL-3. Após incubação a MEC foi lavada com PBS e utilizada como substrato para proliferação celular.

	rGM-CSF lavado		rIL3 lavado	
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Média	0,3986	0,4293	0,4126	0,4396
Mediana	0,4079	0,4385	0,4070	0,4442
Desvio Padrão	0,0245	0,0365	0,0177	0,0330
Erro Padrão	0,0087	0,0129	0,0063	0,0117
IC 95% (inferior)	0,3781	0,3987	0,3978	0,4120
IC 95% (superior)	0,4191	0,4598	0,4274	0,4673
Número	8	8	8	8
Valor de P	0,0104*		0,0650**	

Nota : * Diferenças significativa. ** Diferença não totalmente significativa. Os resultados foram avaliados pelo Teste estatístico Mann-Whitney, através do Programa Instat-2.

OBS: Controles do experimento – ver tabela 19.