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

**Avaliação das populações celulares e da atividade
proliferativa de precursores
hematopoéticos esplênicos
de camundongos submetidos à
desnutrição protéica**

Ana Cristina de Souza

**Dissertação para obtenção do grau de
Mestre**

**Orientadora:
Profa. Dra. Primavera Borelli**

**São Paulo
2003**

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

S729a Souza, Ana Cristina de
Avaliação da atividade proliferativa e das populações
celulares de precursores hematopoéticos esplênicos de
camundongos submetidos à desnutrição protéica / Ana
Cristina de Souza. -- São Paulo, 2003.
72p.

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

1. Hematologia 2. Desnutrição proteico-calórica :
Medicina I. T. II. Borelli, Primavera, orientador.

616.15 CDD

Ana Cristina de Souza

Avaliação das populações celulares e da atividade
proliferativa de precursores
hematopoéticos esplênicos
de camundongos submetidos à
desnutrição protéica

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Primavera Borelli
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____

... ensina e ajuda sempre, a benefício dos semelhantes,
porquanto instruir e reconfortar constituem preciosos
investimentos na Contabilidade do Universo, garantindo altos
rendimentos na estrada a percorrer.

EMMANUEL

Dedico este trabalho aos meus pais

Emídio Francisco (in memorian) e **Dulciléia**, pelo incentivo e dedicação

Às minhas irmãs

Vera Cristina e Gilda, pelo carinho, compreensão e apoio

Ao meu cunhado **Maurílio Jorge**

Ao meu sobrinho, **Júlio César**,

pela amizade e companheirismo

Ao **Pedro**, por ser uma pessoa especial.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **DEUS**, pela oportunidade de aprendizado e ao mesmo tempo, por ter me dado coragem e serenidade para vencer as inúmeras dificuldades enfrentadas no final desta jornada.

A **Profª. Drª. Primavera Borelli**, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Antonio Altair Magalhães de Oliveira**, pela colaboração e companheirismo.

A **Profa. Dra. Dulcinéia S. P. Abdalla**, pela atenção e apoio

A **Profa. Dra. Elvira Maria Guerra Shinohara**, pelo estímulo e auxílio nos momentos de maior dificuldade.

A **Profa. Dra. Beatriz Beltler de Mauriño e Profa. Dra. Juliana Pereira**, da Fundação Hemocentro – Hospital das Clínicas, pela análise dos resultados de imunofenotipagem.

A **Maristela Tsujita**, da Fundação Hemocentro – Hospital das Clínicas, pela aquisição das amostras em citômetro de fluxo

Ao **Prof. Dr. Robert Ivan Schumacher**, do Conjunto das Química - USP, pela colaboração.

A **Sally Mizukami Massumoto**, do Hospital Santa Paula, pela atenção e carinho.

Ao **Prof. Dr. Orlando César de Oliveira Pereira Barreto**, pela amizade e incentivo.

Aos pós-graduandos: **Lorena Késsia de F.S. Fonseca, Ricardo Ambrósio Folk, Maria Emília Favero, Karina Soeiro Prestes e Marcelo Macedo**, pelo apoio e colaboração.

Aos alunos de iniciação científica, **Marco Aurélio Ramirez Vinolo, Amanda Rabello Crisma** e à técnica **Mariana Cristina F. Silva**, pelo cuidado com os animais.

A **Elaine Borsatto e Adriana Rodrigues dos Anjos** pela paciência no ensino das técnicas de cultura de células.

As amigas **Rosângela Pivoto de Paiva, Hye Chung Kang, Osmarina P. da Paixão e Silva (Naná)**, pela amizade e apoio, mesmo distantes, após o término de seus cursos.

A **Simone Ferderbar**, pelo carinho, incentivo e e-mails maravilhosos, tão valiosos nas horas difíceis.

A **Ana Dantas**, pela grande colaboração nos instantes finais deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pelo carinho e colaboração.

A **Elaine Midori Ychico e Jorge de Lima**, funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pela atenção e paciência.

A **Auriluce Missiano de Oliveira, Luis Valarinho Gioso e Renato Flamini**, funcionários do Laboratório de Informática, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pela colaboração.

A **Silvânia M. P. Neves**, responsável pelo biotério do Conjunto das Químicas – USP, a **Maria de Fátima Souza** e a todos os funcionários do biotério, pelo fornecimento dos animais avaliados nos experimentos.

A Profa. Dra. **Maria Aparecida Nicoletti e Edgar Muniz Machado Júnior** do Laboratório de Farmacotécnica Industrial da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, pelo auxílio na produção das rações.

Aos amigos, **Roberto Peres Veras e Aristides Valentim**, pela paciência, amizade e carinho.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	PAG
LISTA DE TABELAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Desnutrição Protéico-Calórica	3
2.2 Sistema Hematopoético	6
2.3 Fatores de Crescimento Hematopoéticos	8
2.4 Expressão Antigênica Hematopoética	11
2.5 O Baço como Órgão Hematopoético	13
2.6 Hematopoese, Desnutrição e Infecção	16
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAL E METODOS	20
4.1 Animais	20
4.2 Rações	20
4.3 Indução ao Processo de Desnutrição	22
4.4 Determinação da Concentração Protéica das Rações	22
4.5 Consumo de Ração, Água e Determinação do Peso Corporal	23
4.6 Obtenção de Sangue e Soro	23
4.7 Determinação de Proteínas Totais e Albumina Séricas	23
4.8 Avaliação Hematológica do Sangue Periférico	24
4.9 Obtenção das Células Hematopoéticas Esplênicas	24
4.10 Esplenograma	25
4.10.1 Relação Grânulo-Eritrocitária	26
4.10.2 Viabilidade Celular	26
4.11 Cultura das Células Hematopoéticas Esplênicas	26
4.11.1 Ensaio de Cultura de Células Hematopoéticas Esplênicas em Meio Semi-Sólido de Metilcelulose	26
4.11.1.1 Meio McCoy's 5A modificado	27
4.11.1.2 Meio Iscove's (duplamente concentrado)	28
4.11.1.3 Fatores de Crescimento	28
4.11.1.4 Preparo da Matriz Semi-Sólida	29
4.12 Avaliação da Proliferação e da Diferenciação das Células Hematopoéticas Esplênicas em Ensaios de Cultura Utilizando Meio Semi-Sólido de Metilcelulose	29
4.13 Anticorpos Monoclonais Utilizados para a Avaliação Imunofenotípica das Populações de Células Hematopoéticas Esplênicas	30
4.13.1 Controles de Autofluorescência Utilizando Conjugado de IgG de Rato, de Camundongos ou Hamster marcados com FITC ou PE	31
4.13.2 Determinação Imunofenotípica das Populações de Células Hematopoéticas Esplênicas	31
4.14 Análise Estatística	33

5. RESULTADOS	34
5.1 Avaliação da Concentração Protéica das Rações	34
5.2 Avaliação do Consumo de Ração, de Proteínas e de Água	34
5.3 Avaliação do Peso Corporal	36
5.4 Avaliação da Concentração de Proteínas Totais e de Albumina Séricas	36
5.5 Avaliação Hematológica do Sangue Periférico	39
5.6 Avaliação da Celularidade Esplênica	44
5.7 Avaliação da Relação Grânulo-Eritrocitária	49
5.8 Avaliação da Proliferação e da Diferenciação das Células Hematopoéticas Esplênicas em Ensaio de Cultura Utilizando Meio Semi-Sólido de Metilcelulose	50
5.9 Avaliação das Populações de Células Hematopoéticas Esplênicas por Anticorpos Monoclonais	53
Porcentagem de Células Hematopoéticas Esplênicas marcadas com anticorpo anti CD2	53
Porcentagem de Células Hematopoéticas Esplênicas marcadas com anticorpo anti CD5	54
Porcentagem de Células Hematopoéticas Esplênicas marcadas com anticorpo anti CD19	55
Porcentagem de Células Hematopoéticas Esplênicas marcadas com anticorpo anti CD22	56
Porcentagem de Células Hematopoéticas Esplênicas marcadas com anticorpo anti CD34	57
DISCUSSÃO e CONCLUSÃO	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
7. ANEXOS	
ANEXO 1	
Representação Gráfica - Anti CD2, Anti CD5 e Anti CD19	90
Representação Gráfica - Anti CD22 e Anti CD34	91
ANEXO 2	
7.1 Albumina Bovina (BSA)	92
7.2 2-Mercaptoetanol	92
7.3 Líquido de Turk	93
7.4 May Grunwald-Gimsa, Modificado (ROSENFELD, 1947)	93
7.5 Metilcelulose - 4.000 centiPoise	93
7.6 Metilprednisolona	94
7.7 Paraformaldeído	94
7.8 PBS (10x Concentrado)	95
7.9 PBS-Azida	95
7.10 PBS DULBECCO	95
7.11 Solução Corante de Azul de Tripano (0,1%)	96
7.12 Solução Hemolisante de Geys	96
7.13 Solução Salina - BSS (sem Ca++, sem Mg++)	97

LISTA DE FIGURAS

PAG

FIGURA 1	Representação Esquemática da Hematopoese	
FIGURA 2	Consumo de Ração, de Proteínas e de Água	35
FIGURA 3	Avaliação do Peso Corporal	37
FIGURA 4	Concentrações de Proteínas Totais e de Albumina Séricas	38
FIGURA 5	Número de Hemácias, Volume do Hematócrito e Concentração da Hemoglobina	40
FIGURA 6	Valor do VCM, do HCM e do CHCM	41
FIGURA 7	Número de Leucócitos Totais e de Polimorfonucleares	42
FIGURA 8	Número de Linfócitos e de Monócitos	43
FIGURA 9	Celularidade Esplênica Total e Número de Células Blásticas	45
FIGURA 10	Número de Células Forma Jovem, Forma em Anel e Forma Madura	46
FIGURA 11	Número de Linfócitos e de Plasmócitos	47
FIGURA 12	Número de Eritroblastos e de Monócitos	48
FIGURA 13	Relação Grânulo-Eritrocitária	49
FIGURA 14	Formação de "Clusters" e de Colônias - CFC-GM	51
FIGURA 15	Formação de "Clusters" e de Colônias - CFC- Mix	52
FIGURA 16	Fotomicrografia de "Clusters" e de Colônias	
FIGURA 17	Imunofenotipagem - Anti CD2	53
FIGURA 18	Imunofenotipagem - Anti CD 5	54
FIGURA 19	Imunofenotipagem - AntiCD19	55
FIGURA 20	Imunofenotipagem - Anti CD 22	56
FIGURA 21	Imunofenotipagem - Anti CD 34	57
FIGURA 22	Representação Gráfica da Imunofenotipagem - Anti CD2, Anti CD5 e Anti CD19	90
FIGURA 23	Representação Gráfica da Imunofenotipagem - Anti CD22, Anti CD34	91

LISTA DE TABELAS

PAG

TABELA 1 Composição Percentual das Rações

21

TABELA 2 Resumo dos Resultados Obtidos

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida

BFU-E: Unidade formadora de *burst* eritróide

CD: *Clusters* de diferenciação

CFU-GEMM: Unidade formadora de colônia granulocítica, eritróide, monocítica e megacariocítica

CFU-M: Unidade formadora de colônia granulocítica

CFU-Meg: Unidade formadora de colônia megacariocítica

CFU-S: Unidade formadora de colônia esplênica

COBEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CSA: Atividade estimuladora de colônia

Cps: Centipoiese

DNA: Ácido desoxirribonuclêico

EPO: Eritropoetina

FACS: Separação de células por fluorescência

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FL: Fluorescência

FSC: (Foward Scater) – Dispersão frontal de luz

G-CSF: Fator estimulador de colônia granulocítica

GM-CSF: Fator estimulador de colônia de granulócito e monócito

HPP-CFC: Células formadoras de colônias com alto poder proliferativo

Ig: Imunoglobulina

IL: Interleucina

IL-3: Interleucina 3

IMC: Índice de massa corporal

LL: Quadrante inferior esquerdo

LR: Quadrante inferior direito

NK: Natural killer

M-CSF: Fator estimulador de colônia monocítica

PE: Ficoeritrina

PI: Iodeto de Propídio

PS - Fosfatidilserina

R1: Região 1

Sca-1: Antígeno stem cell

SCF: Fator estimulador de colônia tronco

SSC: (Side Scatter) - Dispersão lateral de luz

Tdt: Deoxinucleotidiltransferase

Ter-119: Marcador de superfície de célula eritrocitária

Thy-1: Marcador de superfície de célula tronco

UL: Quadrante superior esquerdo

UR: Quadrante superior direito

RESUMO

A desnutrição altera o sistema imunológico, freqüentemente modificando a resposta do hospedeiro frente a patógenos e predispondo o indivíduo à infecções.

Neste trabalho, utilizando ensaios clonogênicos e imunofenotipagem, avaliamos os efeitos da desnutrição protéica em precursores hematopoéticos esplênicos. Camundongos Swiss Webster, machos, com dois a três meses de idade, foram alimentados com ração contendo 4% e 20% de proteína constituindo os grupos desnutridos e controle, respectivamente. A fonte protéica das rações foi a caseína. Os animais foram mantidos em gaioleiros metabólicos, sob temperatura ambiente de 22° a 25°C e ciclo de luz de 12 horas. A desnutrição experimental foi induzida após período de adaptação às condições do gaioleiro metabólico. O consumo de ração, de água e a variação do peso corporal inicial, foram avaliados a cada 48 horas. Após a perda de 20-25% do peso corpóreo inicial, foram colhidas amostras sangüíneas para a verificação do perfil hematológico, determinação das concentrações séricas de proteínas e da albumina. As células esplênicas foram colhidas para a realização do esplenograma, dos ensaios clonogênicos e da imunofenotipagem, utilizando-se painel de anticorpos monoclonais. Para a obtenção de progenitores granulocíticos (CFC-GM), empregou-se a associação dos fatores de crescimento G-CSF (1ng) e GM-CSF (0,1ng). A obtenção de progenitores granulocíticos e eritróides (CFC-Mix) se deu pela associação dos fatores de crescimento IL-3 (1ng) e EPO (5UI).

Os resultados obtidos indicaram redução significativa no grupo desnutrido, do consumo de ração e peso corpóreo, das concentrações séricas de proteínas totais e albumina, bem como do volume do hematócrito, concentração de hemoglobina e do número global de leucócitos. A celularidade esplênica também apresentou redução significativa no grupo desnutrido, quando comparada a do grupo controle.

Nos ensaios clonogênicos, o grupo desnutrido apresentou menor formação de "clusters" e de colônias frente aos fatores de crescimento utilizados. Na imunofenotipagem, o mesmo grupo apresentou aumento na percentagem de células CD34⁺, bem como de precursores linfóides T, identificados por anti CD2 e anti CD5 e de precursores linfóides B, identificados por anti CD19 e anti CD22.

Estes resultados sugerem que a desnutrição protéica induz, *in vivo*, a redução das células primitivas e bloqueio maturativo em células precursoras esplênicas. Os ensaios clonogênicos indicaram que as células de animais desnutridos não respondem adequadamente aos fatores de crescimento, sugerindo alterações em receptores e, ou processos transduccionais e, ou transcricionais.

SUMMARY

Malnutrition usually affects the immune system, most of the times modifying the immunological response to pathogens, predisposing the individuals to infections.

In this work the effect of protein malnutrition on splenic hematological precursors were investigated by clonogenic assays and immunophenotyping. Two months old male Swiss Webster mice were fed with chow containing 4% and 20% casein, respectively the deprived and the control groups. The animals were observed in metabolic cages, at 22-25° C and light-controlled during 12 hours. The experimental procedure was started after the animals were accustomed to the environment. The chow and water consumption as well as the weight were recorded every 48 hours. Soon after a 20-25% weight loss, blood samples were collected in order to determine hematological parameters, and serum protein and albumin. The splenic cells were collected and used to do the splenogram, clonogenic assays and immunophenotyping with monoclonal antibodies. Growth factors G-CSF (1ng) and GM-CSF(0.1ng) combination were employed to obtain the granulocytic progenitors CFC-GM. The growth factors IL-3 and EPO (5 UI) association were used to obtain the granulocytic and erythroid progenitors (CFC-Mix).

The obtained data indicated significative reduction of weight, chow consumption, serum proteins, blood hematocrit, hemoglobin concentration and leucocytes in the deprived group. The deprived group splenic cellularity exhibited decrease in comparison to the control group as well.

The clonogenic assays disclosed decreased formation of clusters and colonies at exposure to specific growth factors in the deprived group. In this group the immunophenotyping showed CD34+ cells increase, as well as linfoid T precursors, identified by anti CD2 and anti CD5, as well as linfoid B precursors, identified by anti CD19 and anti CD22.

These data suggest that protein malnutrition leads, in vivo, to primitive cells reduction and progenitor cells maturative blocking. The clonogenic assays indicated that the hematopoietic cells from deprived animals did not respond to growth factors, suggesting that receptors, transduction and, or transcriptional modifications may have occurred.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A desnutrição está presente em todo mundo, com alta prevalência nos países em desenvolvimento (ORTIZ et al., 2001). Os tipos mais freqüentes de desnutrição mundial são a desnutrição protéico-energética, a deficiência de vitamina A, de iodo e de ferro, sendo que a desnutrição protéica e, ou protéico-energética atinge principalmente crianças com idade inferior a 5 anos (STEPHENSON et al., 2000). Observações de caráter epidemiológico e experimental evidenciam que indivíduos desnutridos, especialmente crianças, apresentam maior susceptibilidade frente a processos infecciosos e índices mais elevados de morbidade e mortalidade (LESOURD, 1997). O binômio desnutrição-infecção pode ser visto sob dois aspectos: a desnutrição alterando os mecanismos de defesa do indivíduo e a infecção agravando o estado carencial previamente instalado ou ainda, a doença desencadeando-o (KEUSH, 2003; POWANDA & BEISEL, 2003; SCRIMSHAW, 2003). Nessas condições, a desnutrição pode facilitar a invasão do agente, favorecer sua proliferação no organismo, possibilitar infecções secundárias e modificar o curso e a evolução da enfermidade (KEUSH, 2003).

O tecido hematopoético, assim como todos aqueles que exibem alta taxa de renovação e proliferação celular, apresenta elevada exigência de nutrientes. As necessidades de material protéico para a hematopoese poderiam justificar a ocorrência de anemia e leucopenia, freqüentemente observadas em desnutrição.

Estudos realizados em nosso laboratório, empregando camundongos submetidos à desnutrição protéica, revelaram alterações em órgãos linfo-hematopoéticos, como atrofia medular, esplênica e tímica, leucopenia e redução na mobilização de células fagocitárias para o foco inflamatório (BORELLI et al., 1995, 1998, 2001). VITURI et al., (2000) encontram, em camundongos desnutridos, alterações quantitativas em proteínas da matriz

trombospondina e laminina. Os animais desnutridos apresentaram redução no peso do baço, no número de células e desorganização nas polpas vermelha e branca (XAVIER et al., 1998).

Células progenitoras hematopoéticas podem ser isoladas da medula óssea, do sangue periférico, do cordão umbilical e do baço. O isolamento destas células, por técnicas de cultura e a utilização de fatores de crescimento específicos, permitem o estudo de suas características biológicas (BRADLEY & METCALF, 1966)

BORSATTO (1999), utilizando células de medula óssea de camundongos desnutridos em cultura, evidenciou a diminuição de precursores grânulo-monocíticos. O prolongamento no tempo de proliferação de células da medula óssea, juntamente com a redução na capacidade proliferativa de células medulares e esplênicas, foram demonstrados em trabalhos realizados por FRIED et al., (1978), BORELLI et al., (1995) e VINOLO et al., (2003).

A literatura registra poucos trabalhos realizados com células esplênicas e desnutrição, comparados aos realizados com células de medula óssea. Com relação às culturas de células esplênicas, para a obtenção de progenitores, a literatura relata, principalmente, trabalhos realizados com a intenção de verificar a recuperação do compartimento eritróide de animais submetidos a tratamentos com drogas que causam anemia, como o tianfenicol (NIJHOF & WIERENGA, 1982, 1983, 1984) e fenil-hidrazida (VANNUCCHI et al., 2000).

Tendo em vista às diversas alterações encontradas em órgãos hematopoéticos em situações de desnutrição propusemo-nos, neste trabalho, a avaliar os efeitos da restrição protéica sobre a hematopoese esplênica, visto ser o baço, em camundongos, um órgão linfo-hematopoético.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Desnutrição Protéico-Calórica

A fome e as deficiências alimentares não estão relacionadas a um único fator e sim a uma combinação de fatores como culturais, educação alimentar e sanitária, fatores sócio-econômicos e principalmente, políticos (GOPALAN, 2000).

O estado nutricional é determinado pelo equilíbrio entre a ingestão de nutrientes e as necessidades do organismo. A avaliação do estado nutricional de um indivíduo pode ser realizada por parâmetros como peso corpóreo, índices antropométricos e concentração sérica de proteínas totais, albumina e pré-albumina e de outros elementos como ferro e zinco (JEEJEEBHOY, 2000).

A desnutrição pode ser desencadeada pela redução ou ausência de nutrientes e, ou micronutrientes (ALLISON, 2000). A desnutrição pode ser primária ou secundária. Na desnutrição primária, um ou todos os nutrientes estão ausentes ou reduzidos na dieta enquanto que na secundária, apesar de haver dieta equilibrada, pode haver alteração na absorção dos nutrientes oferecidos, perda excessiva ou ainda, aumento das necessidades do organismo (COTRAN & KUMAR, 1999).

Crianças com idade inferior a 5 anos são as mais atingidas pela desnutrição protéica e, ou protéico-energética (STEPHENSON et al., 2000), causadas pela ingestão inadequada de calorias e proteínas e que, em casos severos, pode conduzir a situações de *Marasmus* e *Kwashiorkor*. O *Kwashiorkor* resulta de uma deficiência essencialmente de proteínas, caracterizando-se por edema, responsável pela elevação de 60-80% do peso normal dos indivíduos afetados e alterações cutâneas como descamação e hiperpigmentação. O *Marasmus* é um estado de desnutrição resultante da deficiência de calorias e proteínas. Quando a criança está com cerca de 60%

do peso normal para a idade e sexo é considerada marasmática. (COTRAN & KUMAR, 1999).

A desnutrição na gestante é fato importante a ser considerado, alterando o estado gestacional, o crescimento e o desenvolvimento do feto. Vários são os fatores envolvidos no estado nutricional da gestante, entre eles a idade, hábitos e educação nutricional e condições sócio-econômicas. As necessidades de proteínas, vitaminas e minerais também se elevam durante a amamentação, pois fornecem a criança nutrientes e fatores imunes (MOHS, 1994). Estudos realizados no Cairo com crianças recém-nascidas de mães que apresentavam desnutrição moderada, revelaram diferenças significativas no peso, altura e circunferência craniana, quando comparadas às crianças de mães nutridas (GABR, 1981).

O continente africano continua a apresentar um triste cenário de desequilíbrio nutricional, com conseqüente prevalência de desnutrição. Cerca de 20-40% das crianças com idade inferior a 5 anos possuem retardo no crescimento. Entre adultos, especialmente gestantes, é comum a deficiência de micronutrientes (LABADARIOS, 2002). Esta situação tem-se agravado em virtude da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LABADARIOS, 2002). No período de 1988-1995, com uma relativa estabilidade política e melhora nos serviços de saúde oferecidos pelo governo e agências internacionais, houve significativa redução dos índices de mortalidade infantil (BACHOU, 2002).

A América Latina, quando comparada a outras regiões em desenvolvimento, como África, Ásia e China, apresenta melhor situação nutricional. A América do Sul conseguiu reduzir pela metade os índices de baixo peso em crianças em idade escolar, desde 1975 e em 1990, apresentando 8% de crianças com baixo peso, considerado pelas Nações Unidas, o menor índice entre regiões em desenvolvimento. Entretanto, a América Central, quando comparada a outros países em desenvolvimento,

apresentou em 1990, índice duas vezes maior de crianças desnutridas do que a América do Sul (VILLAREAL & KENT, 1996).

No Brasil, dados representativos da situação nutricional datam de inquéritos realizados somente a partir de 1975. Estes dados estão restritos a índices antropométricos, em crianças menores de cinco anos. O déficit estatural representa alterações no crescimento esquelético, como efeito cumulativo do estresse nutricional. Entre 1975 e 1989 observou-se uma diminuição no retardo de estatura no meio urbano de 20,5% para 7,5%, na região centro-sul (Sudeste, Sul e Centro-Oeste). No Nordeste a redução se deu de 40,8% para 23,8%, enquanto na região Norte, observou-se uma redução de 39,0% para 23,0%. Nas regiões Norte e Nordeste, no período compreendido entre 1989 e 1996, observou-se acentuada diminuição da desnutrição (IBGE/UNICEF, 1982, 1992; MONTEIRO et al., 2000). Neste período houve um declínio acentuado da desnutrição na população adulta, em todas as regiões brasileiras, exceto a área rural da região Nordeste. Na população avaliada, mulheres entre 18-49 anos, o índice de massa corporal - IMC < 18,5 foi de 5%, semelhante ao dos países desenvolvidos (BATISTA FILHO & RISSIN, 2003).

A desnutrição protéico-energética atinge cerca de 2-4% de idosos que vivem em casa e 50% dos que estão hospitalizados, estando relacionada a deficiências de micronutrientes como zinco, folatos e vitamina B, que são importantes moduladores do sistema imune e divisão celular (LESOURD, 1997). Dentre os fatores envolvidos na ocorrência da desnutrição protéico-energética em adultos idosos, podem ser citados fatores fisiológicos como diminuição de funções motoras e alterações na dentição, olfativas e gustativas e que podem influenciar o apetite (GAMBERT, 1982). O padrão nutricional ideal para o idoso não está bem definido, havendo discordância entre a quantidade de ingestão de proteínas necessárias devido às alterações fisiológicas, freqüentes em idosos, relacionadas com funções renais e digestivas. Em idosos desnutridos, alterações no sistema imune podem induzir

susceptibilidade frente a doenças infecciosas e pulmonares crônicas. (DRIVER et al., 1982; GAMBERT & GUANSING, 1980).

2.2 Sistema Hematopoético

A hematopoese inicia-se no período embrionário, no saco vitelino em regiões denominadas “ilhas de Wolf”. As células presentes nesta fase são denominadas megaloblastos, células vermelhas primitivas nucleadas, predominantes entre a 6ª - 8ª semana de gestação em humanos e 10 -11 dias em camundongos. Com o surgimento do fígado fetal, por volta da 10ª semana de gestação, inicia-se o período hepato-esplênico. As células formadas neste período são da linhagem eritrocítica, granulocítica e linfocítica, sendo que o baço, timo e linfonodos também têm função hematopoética. A partir do 5º mês de gestação, com a emergência da cavidade medular, a medula óssea passa a ser o principal local hematopoético, tornando-se o único na produção de células sanguínea, após o nascimento, em humanos. O timo, em humanos, é o responsável pela diferenciação final e maturação de células T e NK (CHARBORD et al., 1995; GALICCHIO, 1998), enquanto que em roedores, como camundongo e rato, o baço permanece como órgão hematopoético por toda a vida adulta do animal.

A produção celular sanguínea diária, por quilo corpóreo, em adultos normais está em torno de 2,5 bilhões de células vermelhas e de plaquetas e 10 bilhões de granulócitos. A formação das células sanguíneas é um processo contínuo que resulta da proliferação e diferenciação de células primitivas, denominadas células pluripotentes multipotenciais ou célula tronco. Esta é capaz de auto renovar-se e de originar células comprometidas com determinadas linhagens celulares. As células primitivas passam por processos de proliferação e diferenciação, amadurecem e são lançadas na circulação. A função proliferativa das células pluripotentes hematopoéticas permite a

reposição das células progenitoras (BEARMAN et al., 1999; ZAMBRANO-RAMIREZ et al., 1999). As células progenitoras respondem a proteínas denominadas fatores de crescimento (CLARK & KAMEN, 1987). Células do estroma medular como células endoteliais podem produzir citocinas e regular a hematopoese (ZAMBRANO-RAMIREZ et al., 1999). A regulação também pode ocorrer por substâncias que alcançam a medula óssea por via sistêmica, ou ainda pela interação direta célula-célula do estroma medular ou pela secreção de moléculas reguladoras (MAYANI et al., 1992). A matriz extracelular, estrutura altamente organizada que fixa e regula os elementos hematopoéticos frente aos processos de proliferação e de apoptose, é formada por macromoléculas produzidas e secretadas pelas células estromais e composta por vários tipos de colágeno (I, III, IV, V e VI) e proteínas adesivas não-colagênicas como a fibronectina (glicoproteína produzida por diversas células como reticulares e macrófagos), laminina (proteína produzida pelas células endoteliais), hemonectina, trombospondina e proteoglicanos (GAY et al., 1989).

O balanço homeostático entre a proliferação e morte celular é essencial para a manutenção de organismos multicelulares. Na última década os estudos dos processos relacionados a apoptose ou morte celular programada tornaram-se de interesse em várias áreas da medicina devido ao reconhecimento da importância da apoptose no desenvolvimento e fisiologia tecidual. Avanços significativos têm sido obtidos na compreensão dos mecanismos de processos apoptóticos relacionados a doenças auto-imunes, alterações neuro-degenerativas e deficiências imunológicas (RUDIN & THOMPSON, 1997).

2.3 Fatores de Crescimento Hematopoéticos

A proliferação e diferenciação das células hematopoéticas são dependentes de fatores de crescimento, glicoproteínas que atuam em receptores específicos, presentes nas células hematopoéticas (SOEDE-BOBOK & TOUW, 1997). Estes fatores podem ser de linhagem específica, quando favorecem o crescimento de uma determinada linhagem celular como a eritropoetina, (EPO - fator estimulador de colônias eritróides), trombopoetina (fator estimulador de colônias megacariocítica), o G-CSF (fator estimulador de colônias granulocíticas) e o M-CSF (fator estimulador de colônias monocíticas) ou serem de múltipla linhagem quando possibilitam o desenvolvimento de diversas linhagens celulares, como IL-3 (interleucina 3) e o GM-CSF (fator estimulador de colônias grânulo-monocíticas). Os fatores de crescimento de múltipla linhagem têm maior efeito na proliferação de células imaturas quando comparados aos de linhagem específica (D'ANDREA, 1994).

A EPO é um glicoproteína produzida por células renais, controlada pela pressão de oxigênio, sendo importante fator de crescimento que promove a sobrevivência, proliferação e diferenciação de células progenitoras eritróides em mamíferos (KRANTZ, 1991). As células progenitoras eritróides comprometidas, CFU-E (unidade formadora de colônias eritróides) e BFU-E, (unidade formadora de *burst* eritróide), necessitam de EPO para a formação de colônias em sistemas de cultura em meios semi-sólido, como soft-ágar e metilcelulose. A CFU-E prolifera rapidamente em baixas concentrações de EPO formando "clusters" eritróides de 8-49 células em 7 dias, em seres humanos, e de 8-64 células em dois dias, em camundongos. Entretanto, a BFU-E, progenitor eritróide mais imaturo, necessita da combinação de EPO com outros fatores de crescimento, como IL-3, GM-CSF e SCF (fator de crescimento para célula tronco - *stem cell factor*), proliferando mais lentamente e formando grandes colônias eritroblásticas em culturas de 15 dias com células humanas

e 7-10 dias em culturas de células de camundongos (GREGORY & EAVES, 1977, 1978).

O G-CSF estimula a proliferação e maturação de progenitores granulocíticos (CFU-G), (PLATZER et al., 1985; WELTE et al., 1985). Em combinação com a IL-3 favorece o crescimento *in vitro* de progenitores megacariocíticos (CFU-Meg), (McNIECE et al., 1988), aumenta a fagocitose (PLATZER et al., 1986) e a quimiotaxia dos neutrófilos (ZSEBO et al., 1986).

O M-CSF (CSF-1) estimula o crescimento de células progenitoras comprometidas para a linhagem macrofágica. Em culturas de células progenitoras hematopoéticas, livres de soro, este fator pode estimular progenitores grânulo-monocíticos (MORSTYN & BURGESS, 1988). Em células diferenciadas o aumento do *burst* respiratório, aumenta a quimiotaxia e a atividade bactericida e fungicida e induz a maturação de algumas células leucêmicas mielóides (MIYAGUCHI et al., 1988).

A IL-3, também conhecida como multi-CSF, estimula o crescimento de granulócitos, monócitos, megacariócitos, eritrócitos e mastócitos (CLARK & KAMEN, 1987). A atuação da IL-3 em células linfóides T foi avaliada por PALACIOS & PELKONEN, (1988) que observaram a presença de células com característica de pró-timócitos, entretanto os dados não foram confirmados por outros autores. Em humanos, populações de células T maduras podem responder a IL-3 (SCHRADER, 1998). Ensaio realizado *in vitro* com IL-3, isolada ou em combinação com SCF, não foram efetivos para a proliferação de células B (BALL et al, 1995).

O GM-CSF é uma glicoproteína que estimula o crescimento de progenitores de medula óssea em cultura que incluem unidades formadoras de colônias de granulócitos, eritrócitos, macrófagos e megacariócitos (CFU-GEMM) e colônias grânulo-monocíticas (CFU-GM), (METCALF, 1986). As CFU-GEMM são células progenitoras pluripotentes identificadas pela produção de colônias de múltiplas linhagens, enquanto as CFU-Meg são os mais restritos

progenitores, originando somente colônias megacariocíticas (MESSNER, 1995). Esta citocina estimula a quimiotaxia e fagocitose dos neutrófilos e atua na atividade microbicida e tumoricida de fagócitos mononucleares (GRABSTEIN, et al., 1986).

O SCF, também conhecido como *c-kit ligant* ou fator de crescimento de mastócitos, tem como atividade biológica a ação sinérgica com outros fatores, apresentando pouca atividade quando utilizado isoladamente em cultura (McNIECE, 1992). Estimula o crescimento celular devido à sua interação com o *c-kit* proto-oncogene, receptor tirosina quinase expresso na superfície de vários tipos celulares (LYMAN & WILLIAMS, 1992).

As combinações de fatores de crescimento que estimulam colônias mais primitivas também podem ser utilizadas em células progenitoras comprometidas, como as BFU-E, utilizando-se combinações de EPO e IL-3 ou EPO e GM-CSF, que darão origem as CFU-E, dependentes de EPO. Outras combinações, como SCF com IL-3, G-CSF ou GM-CSF em cultura de células de medula óssea humana e de baço de roedores, induz proliferação e diferenciação mais efetiva do que as obtidas quando se empregam fatores isoladamente (METCALF, 1991; MORSTYN & BURGESS, 1988).

Os sistemas de cultura em suspensão e em meio semi-sólido permitem, respectivamente, avaliar a proliferação de células precursoras comprometidas e a diferenciação para granulócitos, fagócitos mononucleares e eritrócitos (CLINE & GOLDE, 1974). A resposta hematopoética frente a eritropoetina é melhor acompanhada em culturas em meio semi-sólido (ISCOVE et al., 1974). O uso de metilcelulose ou ágar como matriz semi-sólida permite a imobilização das células no meio de cultura, facilitando o estudo e a caracterização clonal de descendentes hemopoéticos.

As culturas celulares em suspensão e em meio semi-sólido apresentam populações de células aderentes e não aderentes. As primeiras contêm células macrofágicas, epiteliais e células adiposas gigantes. Observa-se inicialmente

uma extensiva granulopoese, seguida na maioria dos casos, por um acúmulo de células blásticas. Posteriormente, ambos os tipos celulares declinam e a cultura apresenta um predomínio de macrófagos. A temperatura de 33° C, utilizada em culturas de longa duração, permite o crescimento de células aderentes, maior manutenção de células progenitoras e aumento da densidade celular (DEXTER et al., 1976).

Os critérios utilizados para a contagem das colônias baseiam-se na quantidade de células que formam os agrupamentos. Os agrupamentos celulares compostos por 50 ou mais células são considerados colônias, obtidas como resultado da proliferação, diferenciação e maturação das células hematopoéticas cultivadas. Os aglomerados constituídos por um número de células variando entre 2-49 células são classificados como "clusters". Para a identificação das colônias utiliza-se como critério a morfologia das mesmas, observada sob microscópio invertido. Métodos citoquímicos das células isoladas das colônias como reações da peroxidase, esterase e Sudam Black B e coloração pelo método May-Grunwald-Giemsa, também são utilizados (SANTOS et al., 1994), bem como a imunofenotipagem.

2.4 Expressão Antigênica Hematopoética

No processo de diferenciação celular hematopoética, as células sangüíneas adquirem fenótipos que são resultados da expressão de genes celulares específicos. Os fatores de transcrição são responsáveis pela expressão destes genes e o conhecimento da função desses fatores é importante para a compreensão dos processos de diferenciação celular (SHIVDASANI & ORKIN, 1996).

As alterações físicas e antigênicas das células hematopoéticas têm sido avaliadas através da utilização de anticorpos, geralmente conjugados a

substâncias fluorescentes. Esta técnica permite o estudo da expressão de antígenos de superfície, citoplasmáticos e nucleares, através das propriedades de fluorescência presentes nas células, podendo definir linhagens celulares e patologias (KIPPS, et al., 1992; ROGERS et al., 1996).

As células tronco humanas são caracterizadas fenotipicamente pelos antígenos CD34+Thy-1+Lin- e as células progenitoras pelo fenótipo CD34+Thy-1-Lin-. Em camundongos, as células tronco expressam os fenótipos CD34+ c-kit+ Thy-1^{lo} Lin-^{lo} Sca-1+. Estas células podem ser obtidas e isoladas de sangue periférico, medula óssea e sangue de cordão umbilical, em humanos e do sangue periférico, medula óssea e baço, em camundongos, especialmente após estimulação com fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF) (UCHIDA et al., 1997).

As células tronco linfóides comprometidas (CFU-L) derivam de células tronco hematopoéticas, presentes na medula óssea. Originam diversos tipos celulares que podem ser reconhecidos pela presença de receptores de superfície e marcadores antigênicos, como o HLA-DR, CD34 e *c-kit* (KELLER, 1992).

O processo de diferenciação das células da linhagem B inicia-se na medula óssea, sendo que o precursor linfóide pode migrar para órgão secundários como baço, adquirindo marcadores antigênicos de célula B (ROSEMBERG & KINKADE, 1994). Em células B humanas, o primeiro progenitor reconhecido é denominado pró-B e possui receptores característicos, denominados CD19 e TdT, entretanto, este progenitor ainda não expressa imunoglobulina (HAGMAN & GROSSCHEL, 1994). O antígeno CD34, expresso em células tronco hematopoéticas, permanece em precursores e células pró-B. A coexpressão de CD34 com CD19, marcador específico da linhagem B, identifica as células pró-B tardia (UCKUN, 1990). O progenitor pró-B se diferencia em pré-B ao adquirir genes específicos para imunoglobulina, a célula pré-B retém antígenos CD19 e pouca quantidade de TdT (BURROWS &

COOPER, 1993). As células maduras B perdem os marcadores antigênicos TdT e CD10 e adquirem marcadores de superfície Ig (slg) e marcadores específicos de células B como CD20, CD22, e CD40.

As células primitivas da linhagem T presentes na medula óssea são denominadas pró-T e expressam CD34⁺/CD7⁺, migram para a área subcapsular do timo, onde adquirem os antígenos CD2 e CD5 (TERSTAPPEN et al., 1992). As células pró-T se diferenciam em células pré-T cortical, adquirindo os antígenos de superfície CD4 e CD8, podendo, alternativamente, se diferenciarem em células pré-T cortical CD4⁻/CD8⁻. A maioria das células presentes na região tímica cortical são CD4⁺/CD8⁺, estas podem se diferenciar em células T helper CD4⁺, células citotóxica CD8⁺ e células CD4⁻/CD8⁻ quando então, migram para o sangue periférico, mediando a resposta imune T (LEBIEN, 1995).

2.5 O Baço como Órgão Hematopoético

TILL & McCULLOCH (1961) e CONOVER & KRETCHMAR (1970) em ensaios realizados com camundongos irradiados, demonstraram que os animais ficavam mais protegidos contra os efeitos da radiação quando injetados com suspensão de células de medula óssea, que quando recebiam células esplênicas, concluindo que na suspensão medular poderiam estar presentes células mais primitiva do que as presentes na suspensão esplênica. TRENTIN & WOLF (1968) avaliaram o estroma medular presente no baço de animais irradiados e injetados com suspensão de células indiferenciadas de medula óssea normal. Verificaram que o estroma esplênico favorecia o desenvolvimento de células eritrocíticas enquanto na medula óssea, prevaleciam as células granulocíticas (LA PUSHIN & TRENTIN, 1977).

ISCOVE et al.(1982), avaliando as colônias formadas no baço de camundongos irradiados e injetados com células medulares, concluíram que as colônias eritroblásticas formadas na primeira semana de cultura deveriam ser provenientes de células precursoras presentes no material medular injetado e não de células pluripotentes, discordando da possibilidade do estroma esplênico conduzir a eritropoese de modo preferencial. Os autores observaram que as células eritroblásticas se diferenciavam ou morriam ao final da primeira semana após a injeção de suspensão celular e que na segunda semana, surgiam novas colônias, desta vez do tipo misto. Esta segunda geração celular provinha da diferenciação de células pluripotentes verdadeiras e que cresciam mais lentamente, não havendo portanto, influência do microambiente sobre o desenvolvimento da célula.

Os principais tipos celulares presentes no baço são células reticulares, macrófagos e linfócitos. As primeiras são importantes componentes celulares da polpa branca do órgão. Possuem núcleo volumoso, citoplasma basófilo, geralmente vacuolizado e com alto teor de enzimas alfa-naftil-esterase e fosfatase ácida. Os macrófagos apresentam núcleo de forma excêntrica, porém seu citoplasma apresenta fraca basofilia (JAMRA & LORENZI, 1988).

O estroma é elemento fundamental na polpa esplênica, composto de células reticulares e fibroblásticas. As células e fibras reticulares formam uma malha denominada retículo, que filtra o sangue (GROOM & SCHMIDT, 1990; GEDULDIG et al., 1986; GROOM et al., 1983). Os ramos da artéria esplênica penetram no órgão através do hilo e continuam em direção à polpa. Nesta, cada artéria é denominada artéria central dirigindo-se à bainha linfocitária periarteriolar, formada de linfócitos T. Ao redor da bainha estão os folículos e formação de linfócitos. Cortes histológicos do baço revelam os linfócitos como pontos brancos, denominados corpúsculos de Malpighi. Tanto os ramos arteriais centrais como a bainha linfocitária periarteriolar diminuem de diâmetro, ramificam-se e dirigem-se à zona marginal ou polpa vermelha. A bainha

linfocitária periarteriolar e seus nódulos fundamentam a função imune esplênica e juntos constituem a polpa branca. A bainha contém células T e os nódulos linfóides contém células B, ambos em estágios primários de desenvolvimento. Os linfócitos que circulam pelo sangue, linfa e tecidos linfáticos constituem a população de linfócitos circulante (PABST et al., 1990; PELLAS & WEISS, 1990). Quando estas células entram no baço se estabelecem na polpa branca. Os linfócitos T migram para a bainha linfocitária e os linfócitos B para os nódulos linfóides. Estas células podem permanecer no baço para auxiliar na resposta imune primária ou secundária, permitindo a interação das células B e T em resposta a antígenos. Caso estas células não sejam solicitadas para uma resposta imune, elas deixam o baço via vasos linfáticos eferentes e não através de veias esplênicas. Após deixarem o baço os linfócitos retornam à circulação (WEISS, 1995).

Em seres humanos a função eritropoética do baço inicia-se durante a vida fetal, terminando no final da vida intra-uterina, porém, em processos patológicos, pode produzir granulócitos e eritrócitos, situação denominada metaplasia mielóide. As células formadas pelo baço no período fetal são mielócitos, eritroblastos e megacariócitos, observados na polpa vermelha. Em humanos, após o nascimento, o baço possui linfopoeise ativa, presente nos centros germinativos da polpa branca (COETZEE, 1982).

As alterações encontradas em órgãos linfóides, causadas pela desnutrição, são vastamente conhecidas. CHANDRA, (1997), cita a perda de células linfóides esplênicos e depleção de linfócitos em áreas timo dependentes. XAVIER et al., (1998) verificou alterações estruturais esplênicas como fibrose, espessamento da cápsula e trabéculas, alterações de polpas vermelha e branca e depleção de linfócitos.

Estudos realizados por CORTES et al., (2001), com ratos desnutridos durante a lactação, demonstraram alterações no DNA de células esplênicas, do sangue periférico e de medula óssea. As alterações observadas podem ser

devidas à deficiência de nutrientes essenciais à síntese de proteínas associadas à integridade do DNA.

2.6 Hematopoese, Desnutrição e Infecção

O compartimento das células tronco é composto por poucas células, com a fundamental propriedade de auto renovação e capacidade de gerar progenitores de linhagem dos diferentes tipos de células sanguíneas (WEISSMAN, 2000; KONDO et al, 1997; AKASHI et al, 2000). O sistema hematopoético apresenta alta renovação celular, necessitando para isso de aporte importante de nutrientes essenciais para suas atividades metabólicas (GOMEZ et al., 1996). As deficiências de macro e micronutrientes, freqüentes em situação de desnutrição, alteram a homeostase do sistema imune comprometendo os processos de defesa do indivíduo (BHASKARAM, 2001).

Estudos epidemiológicos têm revelado estreita relação entre deficiências nutricionais e altos índices de mortalidade e morbidade causados por doenças infecciosas (CHANDRA, 1991). A resposta do hospedeiro frente a patógenos pode ocorrer por mecanismos específicos e não específicos. Na resposta específica estão incluídos o sistema de células B, com produção de anticorpos e células T, como imunidade mediada por células. Os mecanismos inespecíficos de resistência são inatos, não havendo necessidade de contato prévio com o agente. Nestes estão incluídos o sistema complemento, fatores humorais (lisozimas e interferon), fagócitos e a proteção conferida pelas mucosas e pele (CHANDRA, 1997).

Os mecanismos de defesa como a capacidade bactericida dos fagócitos, a secreção de anticorpos e formação de complemento, são influenciados por deficiências nutricionais. O mesmo acontece com a imunidade mediada por células, como linfócitos T auxiliares, citotóxico e células “matadoras” (células

NK). Os sistemas dependentes de oxigênio como o *burst* respiratório e os independentes de oxigênio, como lactoferrina, lisozimas, proteases e hidrolases, também são afetados por deficiências nutricionais (KEUSCH, 2003; SCRIMSHAW & SANGIOVANI, 1997).

Elementos como zinco e ferro e a vitamina A têm papel importante nas funções imunes (CHANDRA, 1997). O zinco é essencial para o metabolismo energético, degradação de proteínas e síntese de ácidos nucleicos (KUMARI & CHANDRA, 1993), sendo que sua deficiência aumenta a susceptibilidade a patógenos (PRASAD, 1998). As deficiências de zinco e proteínas podem resultar em atrofia tímica, diminuindo a formação e maturação de linfócitos, comprometendo a resposta do compartimento imunocompetente de células T (DAÍ et al., 1998), podendo também estar relacionados com a diminuição dos níveis de células T CD4⁺/CD8⁺ (PRASAD, 2000) e da atividade das células T “matadoras” (BECK et al., 1997).

Cerca de 20-50% da população mundial são afetadas pela deficiência de ferro (BEARD, 2001). As funções dos neutrófilos, como atividade da mieloperoxidase e bactericida estão diminuídas nesta deficiência (OPPENHEIMER, 2001). A fagocitose dos macrófagos não é afetada pela redução de ferro, entretanto, a atividade bactericida destas células encontra-se reduzida (HALLQUIST et al., 1992). A deficiência de vitamina A reduz a capacidade de fagocitose de neutrófilos (TWINING et al., 1997) e reduz a proliferação de células T frente a estímulos mitogênicos em animais (FRIEDMAN & SKLAN, 1989).

A resposta imune apresenta alterações em indivíduos idosos, onde se observa modificações no número de célula pluripotentes do sistema linfóide periférico, redução na proliferação de células tronco e geração de linfócitos B, juntamente com redução de precursores tímicos. O número de linfócitos T CD4⁺ está diminuído, porém, o número de linfócitos T CD8⁺ pode estar normal, diminuído ou mesmo aumentado (CHANDRA, 1997).

Em nosso laboratório temos realizado diversos trabalhos em medula óssea e baço de animais submetidos à desnutrição. BORSATTO (1999), utilizando células de medula óssea de camundongos desnutridos, evidenciou a diminuição de precursores grânulo-monocíticos nestes animais, causados pela desnutrição. A alteração do microambiente hematopoético na desnutrição foi observada em trabalho realizado por VITURI et al., 2000 que observou alterações quantitativas de fibronectina, trombospondina e laminina, proteínas presentes na matriz extracelular da medula óssea.

FIGURA 1 – Representação esquemática da diferenciação de células hematopoéticas sob estímulo de fatores de crescimento (vide legenda de abreviaturas) Fonte: Pathology of Basis of Disease, 6a ed, 1999

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

Tendo em vista as alterações hematológicas encontradas em situações de desnutrição protéica e sendo o baço um órgão linfo-hematopoético em camundongos, propusemo-nos neste trabalho, avaliar os efeitos da restrição protéica sobre a hematopoese esplênica. Para tanto, avaliamos:

- a celularidade total do órgão, as populações precursoras primitivas hematopoéticas e as populações linfóides T e B;
- a capacidade de proliferação e de diferenciação das células esplênicas frente a fatores de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Nos ensaios experimentais de desnutrição foram utilizados camundongos Swiss Webster (*Mus domesticus*), machos, com idade entre 2 a 3 meses, provenientes de colônias mantidas pelo Biotério do Conjunto das Químicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Foram avaliados 346 animais, dos quais, 106 quanto aos consumos (ração, proteínas e água), ao peso corporal e determinação das concentrações de proteínas totais e albumina; 92 animais foram avaliados quanto ao perfil hematológico e 95 quanto a celularidade. Quanto a relação grânulo-eritrocitária, foram avaliados 13 animais. Para a verificação da capacidade de proliferação e diferenciação das células esplênicas, frente a fatores de crescimento, foram avaliados 08 animais e 32 animais para avaliação das diferentes populações esplênicas.

Todos os procedimentos envolvendo animais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

4.2 Rações

Utilizamos neste trabalho dois tipos de rações (Tabela I): a RAÇÃO I contendo 20% de proteína (FRIED et al., 1978; BORELLI et al., 1995), destinada à alimentação do grupo **controle** e a RAÇÃO II contendo 4% de proteína (MUÑOZ et al., 1981; BORELLI et al., 1995), destinada à alimentação do grupo **desnutrido**. Como fonte protéica foi utilizada caseína (IKAB Chemical B.V., Germany). As misturas salínica e vitamínica utilizadas foram recomendadas pela AIN-93 (REEVES et al., 1993). Óleo de milho (Mazzola®) e amido (Maizena®), ambos da Refinaria de Milho Brasil Ltda., foram adquiridos de lotes comerciais.

As rações foram por nós produzidas, na forma de granulado, no Laboratório de Desenvolvimento e Produção Farmacêutica, do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sendo as mesmas conservadas a 4°C até o momento do uso.

Tabela 1. Composição percentual das rações.

COMPONENTES	RAÇÃO I (%)	RAÇÃO II (%)
PROTEÍNA	20	04
MISTURA SALÍNICA	04	04
MISTURA VITAMÍNICA	01	01
SACAROSE	10	10
ÓLEO DE MILHO	08	08
CELULOSE	01	01
AMIDO q.s.p.	100	100

MISTURA SALÍNICA (grama/kilograma da mistura):

Ácido bórico (0,0815g/kg), carbonato de cálcio anidro (357g/kg), carbonato cúprico (0,30g/kg), carbonato de manganês (0,63g/kg), carbonato de níquel (0,0318g/kg), carbonato de zinco (1,65g/kg), citrato férrico (6,06g/kg), citrato de potássio tripotássico monohidratado (28g/kg), cloreto de lítio (0,0174g/kg), cloreto de sódio (74g/kg), fluoreto de sódio (0,0635g/kg), fosfato de potássio monobásico (250g/kg), iodato de potássio (0,01g/kg), metassilicato de sódio monohidratado (1,45g/kg), óxido de magnésio (24g/kg), paramolibdato de amônio tetra hidratado (0,00795g/kg), sacarose em pó (209,806g/kg), selenato de sódio anidro (0,01025g/kg), sulfato de crômio e potássio dodeca hidratado (0,275g/kg), sulfato de potássio (46,6g/kg), vanadato de amônio 0,0066g/kg),

MISTURA VITAMÍNICA (grama/kilograma da mistura):

Ácido fólico (0,2g/kg), ácido nicotínico (3,0g/kg), D-biotina (0,02g/kg), pantotenato de cálcio (1,6g/kg), sacarose em pó (974,655g/kg), vitamina A (15g/kg), vitamina B1 (0,6g/kg), vitamina B2 (0,6g/kg), vitamina B6 (0,7g/kg), vitamina B12 (2,5g/kg), vitamina D3 (0,25g/kg), vitamina E (15,0g/kg), vitamina K (0,075g/kg),

4.3 Indução ao Processo de Desnutrição

O processo de desnutrição iniciou-se após os animais terem sido submetidos a um período inicial de adaptação (BORELLI et al., 1995; 1998). Neste período os animais foram distribuídos e mantidos em gaiolas metabólicas por 2 a 3 semanas, recebendo "ad libitum", água e ração controle comercial Purina® (Ralston Purina do Brasil Ltda., Brasil), e mantidos sob ciclo de luz, claro-escuro, de 12 horas e temperatura ambiente entre 22-25°C. O controle de peso dos animais foi realizado pela pesagem dos mesmos a cada 48 horas, em balança semi-analítica. Após o período de adaptação, definido pelo ganho e estabilização do peso corpóreo, os animais foram separados, aleatoriamente, em dois grupos: controle e desnutrido. Os animais do grupo controle passaram a receber a Ração I, enquanto que o s do grupo desnutrido passou a receber a Ração II. As condições ambientais de temperatura, de ciclo de luz e a pesagem foram mantidas. Ambos os grupos tiveram livre acesso à água e às respectivas rações. A coleta dos diferentes materiais biológicos ocorreu quando os animais pertencentes ao grupo desnutrido perderam, em média, 25% do peso corpóreo inicial.

A avaliação nutricional dos animais foi feita pela determinação do consumo de ração e do peso corporal, determinação das concentrações de proteínas e albumina plasmática e avaliação hematológica.

4.4 Determinação da Concentração Protéica das Rações

As rações foram analisadas no Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob responsabilidade da Profa. Dra. Silvia M.F. Cozzolino.

4.5 Consumo de Ração, Água e Determinação do Peso Corporal

O consumo das rações e de água foi obtido pela diferença entre a quantidade de ração e água oferecidos e a quantidade ingerida pelos animais. O peso dos animais, o volume de água e a quantidade de ração consumida foram determinados a cada 48 horas.

4.6 Obtenção de sangue e soro

O sangue foi colhido do plexo axilar dos animais previamente anestesiados em câmara saturada com éter etílico. Para a verificação do perfil hematológico dos animais, o sangue foi colhido empregando-se, como anticoagulante, 50 μ L de EDTA 8% (Merck-Chemical®).

A determinação das concentrações séricas de proteínas totais e albumina foi realizada em alíquotas de soro obtidas a partir de sangue colhido sem anticoagulante. As amostras foram centrifugadas a 805 g, por 10 minutos, em centrífuga para Eppendorf (MC-CV CELLM®), para a obtenção do soro. Após a centrifugação, o soro foi separado, fracionado e congelado a -20°C, para posterior análise.

4.7 Determinação de Proteínas Totais e Albumina Séricas

As proteínas totais foram determinadas pelo método do Biureto (GORNAL et al., 1949). A determinação da albumina foi realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (RODKEY, 1965). Ambas as determinações foram realizadas utilizando-se espectrofotômetro Cobas Mira Plus - ROCHE®.

4.8 Avaliação Hematológica do Sangue Periférico

A avaliação hematológica do sangue periférico dos animais foi realizada em amostras colhidas conforme descrito no item 4.6. As técnicas utilizadas foram as convencionais do hemograma, sendo as contagens de eritrócitos e de leucócitos realizadas em hemocitômetro (DACIE & LEWIS, 1995).

4.9 Obtenção das Células Hematopoéticas Esplênicas

Os animais foram anestesiados em cuba saturada com éter etílico, exsanguinados e sacrificados por deslocamento cervical. A seguir foram imersos em cuba contendo álcool iodado e transferidos para ambiente de fluxo laminar realizando-se, a secção cutânea da região mentoniana à pubiana e retirando-se o baço em condições assépticas. Este foi transferido para placa de Petri de plástico de 60mm (Corning® Glass Works, USA), estéril, descartável, contendo 10 mL de solução salina gelada (BSS sem Ca^{++} e sem Mg^{++} , anexo 7.13), acrescida de 10% de soro bovino fetal. A cápsula do baço foi rompida em uma de suas extremidades com o auxílio de duas agulhas estéreis, descartáveis, calibre 26 dobradas em “L” e fixas em seringas. e as células foram delicadamente retiradas da cápsula pelo método de dissociação mecânica. A suspensão celular foi homogeneizada e transferida para tubo cônico, plástico, estéril, de 15mL e mantida em banho de gelo por 5 minutos para a sedimentação do estroma celular. Após a sedimentação, o sobrenadante foi transferido para tubo cônico plástico, estéril de 15mL, separando-se uma alíquota para a contagem das células esplênicas. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 201g, em centrífuga refrigerada (4°C), sendo o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 1mL de meio de cultura McCoy's 5A modificado (Sigma® Chemical Company-USA – item 4.11.1.1).

A presença de hemácias na amostra foi eliminada pelo acréscimo de 4mL de solução hemolisante de Gey's (anexo - item 7.12), por 5 minutos, mantendo-se o tubo em banho de gelo. Imediatamente após, foram acrescentados 5mL de meio de cultura McCoy's 5A modificado (Sigma® Chemical Company-USA) e a amostra centrifugada a 4°C por 10 minutos a 201g. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi lavado por duas vezes com 5mL de meio McCoy's 5A modificado (Sigma® Chemical Company-USA). Após a última lavagem o sedimento celular foi ressuspenso em 1mL do mesmo meio, sendo realizada contagem das células em hemocítômetro.

4.10 Esplenograma

A contagem das células esplênicas, obtidas conforme o item 4.9, foi realizada em câmara de Neubauer®. A amostra celular foi diluída 1:20 em líquido de Turk 1% (anexo 7.3), (DACIE & LEWIS, 1995).

Para a análise das diferentes populações celulares, amostras da suspensão foram transferidas para lâminas e centrifugadas por 5 minutos, 201g em centrífuga (Incinbrás®). As preparações foram submetidas à coloração panóptica May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947 - anexo 7.4). Para a classificação morfológica foram consideradas as várias fases maturativas: células em mitose, células blásticas (hemocitoblasto e mieloblasto), formas jovens (promielócitos, mielócitos), formas em anel (metamielócitos e bastonetes), formas maduras (segmentados) e precursores eritrocíticos (GARCIA, 1992). Foram contadas, no mínimo, 200 células por lâmina.

4.10.1 Relação Grânulo-Eritrocitária

A relação grânulo-eritrocitária (G/E) das células esplênicas foi determinada avaliando-se a proporção entre as células do setor granulocítico e eritróide. Foram contadas, no mínimo, 200 células por lâmina.

4.10.2 Viabilidade Celular

A viabilidade das células esplênicas foi avaliada pelo teste de exclusão do corante azul de tripano 0,1%, em solução de PBS DULBELCCO (7.11;7.10).

4. 11 Cultura das Células Hematopoéticas Esplênicas

As células obtidas conforme o item 4.9 foram cultivadas em matriz semi-sólida composta de metilcelulose (anexo 7.5), contendo meio Iscove's, duplamente concentrado (Gibco®-BRL, Life-Tecnologies-USA – item 4.11.1.2) como meio de cultura, soro bovino fetal (Cultilab®-Brasil) e fatores de crescimento hematopoéticos: rIL-3, EPO, rG-CSF e rGM-CSF (item 4.11.1.3).

4.11.1 Ensaio de Cultura de Células Hematopoéticas Esplênicas em Meio Semi-Sólido de Metilcelulose

A obtenção das células esplênicas se deu conforme item 4.9. Em tubos cônicos de 50 mL, adicionou-se: 4,4 mL de metilcelulose (anexo 7.5), fatores de crescimento (item 4.11.1.3) e células na concentração de $2,0 \times 10^5$ células/mL. Para completar o volume final de 5 mL, foi utilizado meio de cultura Iscove's (Gibco®-BRL, Life-Tecnologies-USA), duplamente

concentrado (item 4.11.1.2). Desta suspensão foi retirado 1 mL e colocado em placas de Petri de 35mm (Sarsted®-USA), estéreis, descartáveis, com o auxílio de seringas de 5mL e agulhas calibre 26, estéreis e descartáveis.

As culturas foram realizadas em triplicata e as placas mantidas em estufa a 36,8°C, contendo 5% de CO₂. O tempo de permanência das placas em cultura se deu de acordo com o ensaio realizado. Nos ensaios para a obtenção de progenitores grânulo-monocíticos (CFC-GM), as placas permaneceram em estufa por 5 dias. Para a obtenção de progenitores granulocíticos e eritróides (CFC-Mix), as placas permaneceram em estufa por 2 dias.

O controle negativo dos ensaios consistiu na deposição da matriz semi-sólida, acrescida das células na concentração de $2,0 \times 10^5$ células/mL, em placas de Petri de 35mm porém, em ausência de fatores de crescimento.

4.11.1.1 Meio McCoy's 5 A modificado

O meio McCoy's 5A modificado (Sigma® Chemical Company-USA), na concentração de 12,0 g/L foi dissolvido em água tridestilada (Sistema Milli Q®), sob agitação. Após a total dissolução deste, foram acrescentados 2,2 g/L de bicarbonato de sódio (Merck®-Brasil), 2,0 g/L de HEPES (Sigma®, Brasil), 10% de soro bovino fetal (Cultilab®-Brasil), 100U/mL de penicilina G sódica e 100µg/mL de estreptomicina (Sigma® Chemical Company-USA). O pH do meio foi ajustado para 7,4. Em condições estéreis, o meio foi filtrado em membrana Millipore de poro 0,22µm (Millipore®-USA), fracionado em frascos de vidro estéreis e levado à estufa a 37°C por 24 horas, para a prova de esterilidade. Os frascos aprovados no teste foram armazenados a 4°C.

4.11.1.2 Meio Iscove's (duplamente concentrado)

O meio Iscove's (Gibco®-BRL, Life-Tecnologies-USA), na concentração de 17,0g/L foi dissolvido em 50 mL de água tridestilada (Sistema Milli Q®), sob agitação. Após a total dissolução deste foram acrescentados 3,64g/L de bicarbonato de sódio (Merck®-Brasil). Em condições estéreis, o meio foi filtrado em membrana Millipore de poro 0,22 µm (Millipore®-USA), fracionado em frascos de vidro estéreis e levado à estufa a 37°C por 24 horas, para a prova de esterilidade. Os frascos aprovados no teste foram armazenados a 4°C.

4.11.1.3 Fatores de Crescimento

Os fatores de crescimento foram reconstituídos em meio de cultura McCoy's 5A modificado (Sigma® Chemical Company-USA - item 4.11.1.1), isento de soro e foram esterilizados por filtração em membrana Millipore de poro 0,22 µm (Millipore®, USA). Em condições estéreis foram fracionados e armazenados a -40°C.

EPO: Eritropoetina humana (Cristália® – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda.).

rG-CSF: Fator estimulador de colônias para linhagem granulocítica, recombinante murino (Sigma® Chemical Company -USA).

rGM-CSF: Fator estimulador de colônias para linhagem granulocítica-macrofágica, recombinante murino (Sigma® Chemical Company - USA).

rIL-3: Interleucina 3 recombinante murino (Sigma® Chemical Company - USA).

4.11.1.4 Preparo da Matriz Semi-Sólida

Água tridestilada (Sistema Milli Q[®]), no volume total de 125 mL, foi levada à ebulição em condições estéreis. Em fluxo laminar, foi acrescentado 5g de metilcelulose 4.000cps (Fischer's[®]-USA – anexo 7.5) e homogeneizado vagarosamente, em movimentos giratórios, sendo novamente aquecido e resfriado em água corrente. Foi adicionado 125 mL de meio Iscove's (Gibco[®]-BRL, Life-Tecnologies-USA), duplamente concentrado (item 4.11.1.2), homogeneizado em agitador magnético por 12 horas, em câmara fria (4°C). Posteriormente, foi adicionado 170,45 mL de soro bovino fetal (Cultilab[®], Brasil), 56,8 mL de albumina bovina – BSA (Sigma[®], Chemical Company-USA – anexo 7.1), 5,68 mL da solução de uso de metilprednisolona (Pharmacia[®] & Upjohn Ltda.-São Paulo – anexo 7.6), 5,68 mL da solução de uso de 2-mercaptoetanol (Sigma[®], Chemical Company-USA – anexo 7.2). Esta preparação foi homogeneizada por um período mínimo de 1 hora, fracionada e congelada a -40°C.

4.12 Avaliação da Proliferação e da Diferenciação das Células Hematopoéticas Esplênicas em Ensaio de Cultura utilizando Meio Semi-Sólido de Metilcelulose

A avaliação da proliferação e da diferenciação das células hematopoéticas esplênicas foram realizadas empregando-se sistema de cultivo em meio semi-sólido, conforme descrito no item 4.11. Com o auxílio de microscópio invertido foi determinado o número de colônias e "clusters" formados. As formações compostas por um mínimo de 50 células, foram consideradas colônias enquanto que os aglomerados compostos de 2 a 49 células foram considerados "clusters" (SANTOS et al., 1994).

4.13 Anticorpos Monoclonais Utilizados para a Avaliação imunofenotípica das Populações de Células Hematopoéticas Esplênicas

Para a avaliação imunofenotípica das populações hematopoéticas esplênicas utilizamos anticorpos monoclonais da Pharmingen® Becton Dickinson Company-USA e Southern Biotechnology Associates, USA. Neste trabalho utilizamos o seguinte painel de anticorpos:

A) Marcador de Precursor Primitivo Hematopoético:

- Anticorpo anti CD34 de camundongo, marcado com FITC. Clone RAM 34, IgG 2a kappa de rato.

B) Marcadores de Células Linfóides B:

- Anticorpo anti CD19 de camundongo, marcado com PE. Clone 1D3, IgG 2a kappa de rato.
- Anticorpo anti CD22.2 (Lyb-8.2) de camundongo, marcado com PE. Clone Cy34.1, DBA/1 de camundongo.

C) Marcadores de Células Linfóides T:

- Anticorpo anti CD2 de camundongo, marcado com FITC. Clone RM2-5, IgG 2b kappa de rato.
- Anticorpo anti CD5 (Ly-1) de camundongo, marcado com FITC. Clone 53-7.3, IgG 2a kappa de rato.

4.13.1 Controles de Autofluorescência Utilizando Conjugado de IgG de Rato, de Camundongo ou Hamster marcados com FITC ou PE

Os anticorpos para controles isotípicos foram da Pharmingen® Becton Dickinson Company-USA:

- Controle isotípico IgG 2a kappa de rato, marcado com FITC, clone R35-95.
- Controle isotípico IgG1 kappa de camundongo (anti-KLH), marcado com PE, clone A112-2.
- Controle isotípico IgG de Hamster (anti-TNP), kappa de camundongo (anti-KLH), marcado com PE, clone A112-2.
- Controle isotípico IgG2b kappa de rato, marcado com FITC, clone A95-1.
- Controle isotípico IgG1 kappa de rato, marcado com PE, clone R 3-34.
- Controle isotípico IgG2a kappa de rato, marcado com FITC, clone KLH/G2a-1-1 (Southern Biotechnology Associates - USA).

4.13.2 Determinação Imunofenotípica das Populações de Células Hematopoéticas Esplênicas

Células esplênicas, obtidas conforme o item 4.9 foram marcadas com anticorpos monoclonais (item 4.13) e submetidas à citometria de fluxo para a avaliação das diferentes linhagens celulares hematopoéticas. A imunofenotipagem foi realizada preparando-se um painel de anticorpos marcados com os fluorocromos isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE). O controle de autofluorescência foi feito com conjugado de IgG de rato, camundongo ou hamster, marcados com FITC ou PE (item 4.13.1).

A reação de imunofluorescência direta foi realizada depositando-se as células em tubos do tipo Eppendorff de fundo em "U", para um volume final de 0,5 mL. Células sem marcação foram utilizadas como controle da população, na concentração de 1×10^6 células/0,5 mL. Para o controle de cadeia do anticorpo

foi utilizada a mesma concentração celular, adicionando-se às células 2 μ L de anticorpo controle de cadeia (para FITC) e 5 μ L (para PE). Para a avaliação das diferentes populações celulares utilizou-se a concentração de 2x10⁶ células, acrescidas dos anticorpos específicos: 2 μ L de anticorpo (para FITC) e 5 μ L (para PE). Células e anticorpo foram homogeneizados com o auxílio de pipeta automática e incubados, sob agitação, em câmara escura, por 20 minutos, mantidos em banho de gelo. Após este tempo, acrescentou-se 0,5 mL de solução de lise 10% (Lysing Solution®-Becton Dickinson-USA), sendo realizada nova incubação por 15 minutos, sob agitação, em câmara escura. Após este período as células foram centrifugadas sob refrigeração (4°C), por 5 minutos a 805g e desprezado o sobrenadante. O sedimento celular foi ressuspenso em 0,5mL de solução 0,1% de PBS-azida (anexo 7.9), homogeneizado e centrifugado novamente em centrífuga refrigerada (4°C), por 5 minutos, 805g. O processo foi repetido por duas vezes. Ao final do mesmo o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspenso em 0,5 mL de solução 1% de paraformaldeído (anexo 7.7). A suspensão foi transferida para tubos de poliestireno de fundo redondo (Becton Dickinson®), homogeneizada e mantida à 4°C e ao abrigo da luz até o momento da leitura por citometria de fluxo, intervalo este que não ultrapassou 24 horas.

A imunofenotipagem foi realizada em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson-USA). Foram adquiridos 10.000 eventos, considerando-se os parâmetros FCS (Forward Scatter), dispersão frontak da luz e SSC (Side Scatter), dispersão lateral da luz, em escala linear, bem como FI 1 (fluorescência 1) e FI 2 (fluorescência 2) em escala logarítmica que detectam a fluorescência verde e laranja, revelando a reação antígeno e anticorpo conjugado ao FITC e PE, respectivamente. Os resultados foram fornecidos na forma de "dot plot", e expressos em percentagem da população de células com reação positiva ou negativa de fluorescência.

4.14 Análise Estatística

Os resultados referentes ao Consumo Diário de Ração, de Água e de Proteínas, a Variação do Peso Corpóreo, das Concentrações Séricas de Proteínas Totais e de Albumina, juntamente com os resultados das Culturas em meio Semi-sólido foram analisados utilizando o programa INSTAT® for Windows e submetidos à análise estatística paramétrica, Teste t (SIEGEL, 1981).

Os resultados referentes à Avaliação Hematológica do Sangue Periférico, da Celularidade Esplênica, da Relação Grânulo-Eritrocitária e Imunofenotipagem foram submetidos à análise estatística não paramétrica, Teste U, Mann Whitney (SIEGEL, 1981). Os gráficos foram apresentados na forma de *boxplots*.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da Concentração Protéica das Rações

Os resultados, em valores médios, da análise da concentração protéica das rações empregadas para alimentar os grupos de animais foram de $18\% \pm 1,42$ ($n=3$) para a Ração I (controle) e de $4,0\% \pm 0,6$ ($n=5$) para a Ração II (hipoprotéica).

5.2 Avaliação do Consumo de Ração, de Proteínas e de Água

O consumo diário de ração (Figura 2A) dos animais do grupo **desnutrido**, alimentados com a Ração II, hipoprotéica, foi menor ($2,5\text{g/dia/animal} \pm 0,23$) em relação ao consumo diário de ração dos animais do grupo **controle**, alimentados com a Ração I ($3,4\text{g/dia/animal} \pm 0,83$). Os resultados apresentaram diferença estatística.

O consumo diário de proteínas (Figura 2B) dos animais do grupo **desnutrido** ($0,1\text{g/dia/animal} \pm 0,03$) foi menor em relação ao consumo diário de proteínas dos animais do grupo **controle** ($0,63\text{g/dia/animal} \pm 0,18$). Os resultados apresentaram diferença estatística.

O grupo **desnutrido** apresentou um consumo diário de água maior, $18,3\text{mL/animal} \pm 4,6$, em relação ao consumo diário de água do grupo **controle**, $17,5\text{mL/animal} \pm 5,14$, porém sem diferença estatística significativa (Figura 2C).

FIGURA 2 – Resultados, em valores médios $\pm$ SD **(A)** do Consumo diário de Ração; **(B)** do Consumo diário de Proteínas (expressos em g/dia/animal); **(C)** do Consumo de Água (expresso em mL/dia/animal) de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína) e de animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (Teste t).

5.3 Avaliação do Peso Corporal

O grupo **desnutrido** apresentou significativa variação do peso corpóreo ($-21\% \pm 8,7$ -Figura 3), quando comparada ao grupo **controle** ($-2,3\% \pm 1,77$). Os resultados apresentaram diferença estatística.

5.4 Avaliação da Concentração de Proteínas Totais e Albumina Séricas

A concentração de proteínas totais ($4,8g \pm 0,8$) e de albumina ($3,1g \pm 0,4$) dos animais do grupo **desnutrido** foi menor quando comparada ao grupo **controle** ($7,2g \pm 0,98$) e ($4,2g \pm 0,6$) respectivamente. A diferença foi considerada significativa estatisticamente. (Figura 4).

FIGURA 3– Resultados em valores médios $\pm$ SD, da Variação do Peso Corpóreo (expresso em %), de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína) e de animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (Teste t).

FIGURA 4 – Resultados em valores médios $\pm$ SD das Concentrações de Proteínas Totais e de Albumina Séricas (expressas em g/d); de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína) e de animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (Teste t).

5.5 Avaliação Hematológica do Sangue Periférico

O grupo **desnutrido** apresentou redução no número de hemácias, (Figura 5A), no volume do hematócrito, (Figura 5B) e na concentração da hemoglobina (Figura 5C) quando comparados ao grupo **controle**. Os resultados referentes ao volume do hematócrito e concentração da hemoglobina revelaram diferença estatística.

Os animais do grupo **desnutrido** apresentaram valores reduzidos para o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) quando comparados ao grupo controle, porém sem diferença estatística (Figuras 6A, 6B e 6C).

O número de leucócitos totais (Figura 7A) do grupo **desnutrido** foi menor quando comparado ao grupo **controle**. Com relação à distribuição das diferentes linhagens celulares, o grupo **desnutrido** apresentou importante redução de granulócitos (Figuras 7B e de linfócitos (Figura 8A), quando comparado ao grupo **controle**. A linhagem monocítica não revelou diferença estatística significativa entre os grupos (Figura 8B).

FIGURA 5 - Resultados **(A)** do número de hemácias (expresso em mm^3); **(B)** do volume do hematócrito (expresso em %); **(C)** da concentração da hemoglobina (expressa em g/dL) de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração** (contendo 20% de proteína) e animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (teste Mann-Whitney).

FIGURA 6 – Resultados **(A)** do valor do VCM (expresso em fL); **(B)** do valor do HCM (expresso em pg); **(C)** do CHCM (expressa em %) de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína) e animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). Valores sem diferença estatística

FIGURA 7 – Resultados **(A)** do número de Leucócitos Totais; **(B)** do número de Polimorfonucleares (expressos em mm^3) de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I**, (contendo 20% de proteína) e animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (teste Mann-Whitney).

FIGURA 8 - Resultados do **(A)** do número de Linfócitos; **(B)** do número de Monócitos (expressos em mm³) de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteínas) e animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteínas). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (teste Mann-Whitney).

5.6 Avaliação da Celularidade Esplênica

O grupo **desnutrido** apresentou redução no número total de células esplênicas (Figura 9A) quando comparado ao grupo **controle**. Os resultados apresentaram diferença estatística significativa. O grupo **desnutrido** apresentou redução na distribuição do número de células blásticas (Figura 9B), quando comparado ao grupo **controle**, porém sem diferença estatística significativa.

O grupo **desnutrido** apresentou redução no número de células do setor granulocítico, que compreende as formas jovens (Figura 10A), formas em anel (Figura 10B) e formas segmentadas (Figura 10C), quando comparado ao grupo **controle**. Somente a redução do número de células formas em anel apresentou diferença estatística significativa.

No setor linfóide (Figura 11A) o grupo **desnutrido** apresentou menor número de células quando comparado ao grupo **controle**, redução esta estatisticamente significativa. A redução do número de células plasmocitárias (Figura 11B) do grupo desnutrido em relação ao grupo controle, não foi estatisticamente significativa.

O grupo **desnutrido** apresentou menor número de células no setor eritróide (Figura 12A) quando comparado ao grupo **controle**, resultados estes com significância estatística. O setor monocitário (Figura 12B) no grupo **desnutrido** apresentou-se reduzido quando comparado ao grupo **controle**, porém, sem diferença estatística significativa.

FIGURA 9 – Resultados **(A)** da Celularidade Esplênica Total; **(B)** do número de células Blásticas (expressos em mm^3), de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína) e de animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (teste Mann-Whitney).

FIGURA 10 – Resultados **(A)** do número de células Forma Jovem; **(B)** de células Forma em Anel **(C)** de células Forma Madura (expressos em mm³), de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína) e de animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (teste Mann-Whitney).

FIGURA 11 – Resultados **(A)** do número de Linfócitos; **(B)** do número de Plasmócitos (expressos em mm^3), de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I**, (contendo 20% de proteína), e animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II**, (contendo 4% de proteína), * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (teste Mann-Whitney).

FIGURA 12 – Resultados **(A)** do número de Eritroblastos; **(B)** do número de Monócitos (expressos em mm^3), de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína), e animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (teste Mann-Whitney).

5.7 Avaliação da Relação Grânulo-Eritrocitária do Baço

O grupo **desnutrido** apresentou menor relação grânulo-eritrocitária (G/E) esplênica, em relação ao grupo **controle** (Figura 13), porém não houve diferença estatística significativa.

FIGURA 13 – Resultados da relação grânulo-eritrocitária (G/E) esplênica, de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína) e animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína).

5.8 Avaliação da Proliferação e da Diferenciação das Células Hematopoéticas Esplênicas em Ensaio de Cultura Utilizando Meio Semi-Sólido de Metilcelulose

Os ensaios realizados com células esplênicas em meio semi-sólido para a obtenção de progenitores granulocíticos (CFC-GM), revelaram nos animais do grupo **desnutrido** menor número na formação de “clusters” e de colônias quando comparado ao grupo **controle** (Gráfico 14). Os resultados referentes à redução do número de “clusters” apresentaram diferença estatística significativa. As culturas foram realizadas por um período de 5 dias, na presença dos fatores de crescimento G-CSF(1ng) e GM-CSF(0,1ng).

Os ensaios realizados para a obtenção de células formadoras de colônias mistas, granulocíticas e eritróides (CFC-Mix), revelaram nos animais do grupo **desnutrido** menor número na formação de “clusters” e de colônias quando comparados ao grupo **controle** (Gráfico 15). Os resultados obtidos, tanto para clusters como para colônias, não apresentaram diferença estatística significativa. As culturas foram realizadas por um período de 2 dias, na presença dos fatores de crescimento IL-3 (1ng) e EPO (5UI).

FIGURA 14 - Resultados da formação de “clusters” e colônias de progenitores granulocíticos (CFC-GM) de células cultivadas em meio semi-sólido, durante 5 dias em presença dos fatores de crescimento G-CSF+GM-CSF, nas concentrações de 1ng e 0,1ng respectivamente, e obtidas do baço de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína) e animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína). * Valor significativo para $p \leq 0,05$ (Teste t).

FIGURA 15 – Resultados da formação de “clusters” e colônias de progenitores granulocíticos e eritróides (CFC-Mix), de células cultivadas em meio semi-sólido durante 2 dias, em presença dos fatores de crescimento IL-3+EPO, nas concentrações de 1ng e 5UI, respectivamente, obtidas do baço de animais pertencentes ao grupo controle, alimentados com **Ração I** (contendo 20% de proteína) e animais pertencentes ao grupo desnutrido, alimentados com **Ração II** (contendo 4% de proteína).

Fotomicrografia de Clusters e de Colônia

FIGURA 16 Micrografia evidenciando cultura de células hematopoéticas esplênicas de camundongos, cultivadas em meio semi-sólido de metilcelulose. **(A)** evidencia uma colônia de CFU-MIX. As setas indicam formações celulares classificadas como “clusters”. Microscopia de fase (x200)

5.9 Avaliação das Populações de Células Hematopoéticas Esplênicas por Anticorpos Monoclonais

As células esplênicas foram inicialmente analisadas de acordo com os parâmetros **tamanho** (FSC) e **granulosidade** (SSC).

Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos, sendo que a população de interesse foi analisada após a eliminação dos debris celulares, delimitando-se região R1. Os eventos da região R1 foram analisados simultaneamente para a intensidade de fluorescência das células controle de população, controle de cadeia do anticorpo utilizado, e posteriormente foi analisada a amostra marcada com o anticorpo específico. Foram consideradas positivas as células que apresentaram maior fluorescência. O grau de positividade do anticorpo específico foi avaliado em percentagem, na forma de “dot plot”. Os quadrantes foram divididos em:

UL: superior esquerdo

UR: superior direito

LL: inferior esquerdo

LR: inferior direito

Os resultados foram apresentados na forma de “dot plot”, após seleção da região R1 para as subpopulações analisadas. Posteriormente, as células positivas de animais do grupo controle e desnutrido, marcadas pelo anticorpo específico, foram representadas em gráfico na forma de box plot. Foram avaliadas populações linfóides B, utilizando os marcadores anti CD19 e anti CD22, populações linfóides T, utilizando anti CD2 e anti CD5 e precursor primitivo hematopoético, utilizando o marcador anti CD34.

O grupo desnutrido apresentou maior percentagem de células marcadas para as populações linfóides B e T, juntamente com as populações precursoras primitivas hematopoéticas, quando comparadas ao grupo controle.

FIGURA 17 - Resultados da imunofenotipagem de células hematopoéticas esplênicas de camundongos controle e desnutrido, utilizando antígeno de membrana anti CD2. Foram adquiridas 10^6 células em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson), com laser de argônio 488nm, sendo adquiridos 10.000 eventos. **(A)** População selecionada em R1 **(B)** Controle da Cadeia: IgG 2b kappa de rato-FITC. **(C)** Representação dos valores médios obtidos na forma de boxplots.

FIGURA 18 - Resultados da imunofenotipagem de células hematopoéticas esplênicas de camundongos controle e desnutrido, utilizando antígeno de membrana anti CD5. Foram adquiridas 10^6 células em citômetro de fluxo Facs Calibur (Becton Dickinson), com laser de argônio 488nm, sendo adquiridos 10.000 eventos. **(A)** População selecionada em R1 **(B)** Controle da Cadeia: IgG 2a kappa de rato-FITC. **(C)** Representação dos valores médios obtidos na forma de boxplots.

FIGURA 19 - Resultados da imunofenotipagem de células hematopoéticas esplênicas de camundongos controle e desnutrido, utilizando o anticorpo anti-CD19. Em amostras contendo 10^6 células/mL foram adquiridos 10.000 eventos em citômetro de fluxo Facs Calibur (Becton Dickinson), com laser de argônio 488nm. **(A)** População selecionada em R1; **(B)** Controle da Cadeia: IgG 2a kappa de rato-PE; **(C)** Valores médios obtidos na imunofenotipagem e representados na forma de "boxplots".

FIGURA 20 - Resultados da imunofenotipagem de células hematopoéticas esplênicas de camundongos controle e desnutrido, utilizando antígeno de membrana anti CD22. Foram adquiridas 10^6 células em citômetro de fluxo Facs Calibur (Becton Dickinson), com laser de argônio 488nm, sendo adquiridos 10.000 eventos. **(A)** População selecionada em R1 **(B)** Controle da Cadeia: IgG1 kappa de rato-PE. **(C)** Representação dos valores médios obtidos na forma de boxplots.

FIGURA 21 - Resultados da imunofenotipagem de células hematopoéticas esplênicas de camundongos controle e desnutrido, utilizando antígeno de membrana anti CD34. Foram adquiridas 10^6 células em citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton Dickinson), com laser de argônio 488nm, sendo adquiridos 10.000 eventos. **(A)** População selecionada em R1 **(B)** Controle da Cadeia: IgG 2a kappa de rato-FITC **(C)** Representação dos valores médios obtidos na forma de boxplots.

Tabela 2 - Resumo dos Resultados Obtidos

	CONTROLE	DESNUTRIDO
Consumo de Ração (g)	3,4±0,83	2,5±0,23*
Consumo de Proteína (g)	0,63±0,18	0,1±0,03*
Peso Corpóreo (%)	-23±1,77	-21±8,7*
Proteínas Totais (g)	7,2±0,98	4,8±0,8*
Albumina (g)	4,2±0,6	3,1±0,4*
Volume Hematócrito (%)	29	24*
Concentração de Hemoglobina (g/dL)	12	10*
Leucócitos Totais (/mm ³)	1503	719*
Polimorfonucleares (/mm ³)	204	61*
Linfócitos (/mm ³)	1522	591*
Celularidade Esplênica Total (/mm ³)	5260	2516*
Formas em Anel (/mm ³)	91	28*
Linfócitos (/mm ³)	4545	2983*
Eritroblastos (/mm ³)	85	19*
“Clusters” (CFC-GM) (%)	18	2,2*

* Valores significativos para $p \leq 0,05$.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Camundongos constituem-se em modelo que possibilita o estudo da biologia das células primitivas hematopoéticas e seus progenitores (HOLYOAKE, 1999). O modelo murino de desnutrição protéica que utilizamos foi desenvolvido por GARCIA, (1992), e tem permitindo melhor compreensão dos efeitos globais da desnutrição na hematopoese (BORELLI et al., 1995 e 1998; BORELLI; NARDINELLI, 2001; BORSATO, 1999; SOUZA et al., 2001; VITURI et al., 2000; XAVIER, 1999). Os conhecimentos sobre os efeitos da desnutrição no sistema hematopoético fundamentam-se nas alterações encontradas na medula óssea, órgão hematopoético primário. O baço, órgão eminentemente linfóide após o nascimento em humanos, permanece linfo-hematopoético ativo durante toda a vida adulta de camundongos.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que os animais submetidos à dieta hipoprotéica, apresentaram alterações no comportamento alimentar, no perfil hematológico e na celularidade esplênica. O consumo diário de ração e de proteínas e, conseqüentemente, a perda de peso acentuada, também foram observados no grupo desnutrido, quando comparado ao grupo controle.

As alterações que ocorrem no peso corpóreo podem ser causadas por condições ambientais, como a composição da dieta (HILL et al, 1989), restrição alimentar (HARRIS et al, 1986) ou temperatura (LEUNG & HORWITZ, 1976). Estudos realizados em ratos demonstraram que o estresse suprime a ingestão alimentar, com conseqüente perda de peso (KRAHN et al, 1990). Os mecanismos envolvidos na inibição do apetite não estão totalmente esclarecidos. Segundo GIETZEN, et al., (1998), a redução na ingestão de alimentos é causada por mecanismos específicos de seleção, presentes nos animais. Estes, ao reconhecerem a diminuição de aminoácidos na dieta hipoprotéica, rejeitam o alimento, minimizando as conseqüências de uma alimentação desbalanceada. Sabe-se que o hormônio liberador de

corticotropina (CRH) influencia o comportamento alimentar, mediando a resposta comportamental e fisiológica do estresse (KRAHN et al, 1988; SUTTON et al, 1982).

A maioria das células tronco hematopoéticas, juntamente com alguns progenitores, encontram-se quiescentes na fase G₀ do ciclo celular (HAO et al, 1996). O microambiente tem papel importante no desenvolvimento da hematopoese, sendo que a diferenciação celular depende da estimulação por fatores de crescimento produzidos por células estromais, e que influenciam a diferenciação, modulando as atividades funcionais das células maduras ((McNIECE, 1992; MORRISON et al, 1995).

Ensaio realizado em camundongos irradiados sub-letalmente e posteriormente injetados com suspensão de células obtidas de medula óssea, evidenciaram que a mesma possui condições específicas para o desenvolvimento da hematopoese, sendo que o baço também as possui, porém, em menor extensão. (TILL & McCULLOCH, 1961). O estroma medular hematopoético é formado por vários tipos celulares como células endoteliais, fibroblastos, adipócitos e macrófagos e uma matriz extracelular, composta de diferentes tipos de colágeno, proteoglicanos, laminina e fibronectina (OWEN, 1988). Adicionalmente, outras substâncias exercem papel regulatório, como zinco, cobre, selênio e vitaminas A, D, e E (SMITH, 2003). Alterações nesse microambiente podem comprometer a hematopoese.

Na análise do perfil hematológico, observou-se nos animais desnutridos, reduzida concentração de hemoglobina e no volume do hematócrito, juntamente com a redução do número de leucócitos totais, caracterizando estado de anemia e leucopenia. A eritropoetina (EPO), fator de crescimento eritróide, é de crucial importância para a fase final de diferenciação desta linhagem, sendo que camundongos com deficiência na produção deste hormônio, são capazes de produzir progenitores eritróides primitivos como BFU-E e CFU-E, entretanto esses animais morrem de severa anemia devido a não diferenciação destas células. (WU et al, 1995). A reduzida produção de EPO ocorre como resultado

da depleção protéica e pode ser revertida com reposição de proteínas (REISSMAN, 1964). A resposta da EPO ao estímulo de hipóxia é dependente da ingestão contínua de proteínas. Em situação de depleção protéica, mesmo as proteínas geradas pelo catabolismo muscular, não suprem as necessidades exigidas para a produção de EPO (ANAGNOSTOU et al, 1977).

Temos resultados que indicam que a anemia encontrada nos animais desnutridos não é ferropriva (manuscrito em redação), pois a concentração plasmática de ferro está elevada, juntamente com a ferritina medular e esplênica e a saturação da transferrina. A anemia, juntamente com a leucopenia presentes nesses animais foram atribuídas à hipoplasia, tanto medular quanto esplênica (BORELLI et al., 1995). A análise da eritropoese dos animais desnutridos revelaram bloqueio maturativo de eritroblastos e redução do número de células eritróides primitivas.

A redução da celularidade apresentada pelos animais desnutridos pode estar relacionada às alterações no microambiente medular, identificadas por VITURI et al., (2000). Naquele trabalho, o animais apresentaram quantidades aumentadas de fibronectina e laminina da matriz extracelular da medula óssea, dados confirmados por FAVERO, (2003) que evidenciou que estas proteínas localizam-se preferencialmente na região endosteal. Na análise ultraestrutural, FAVERO, (2003) observou rarefação celular, com aumento do espaço intercelular, juntamente com alterações na distribuição de proteoglicanos. VINOLO, et al., (2003), utilizando a técnica de impregnação com prata e de PCNA, identificaram menor número de células hemopoéticas em proliferação tanto na medula óssea como no baço.

As moléculas de adesão, especialmente selectinas e integrinas, participam da ligação das células tronco hematopoéticas e progenitoras aos componentes da matriz extracelular iniciando vias de sinalização diversas que controlam a proliferação, diferenciação e mobilização celular, podendo também potencializar a resposta de fatores de crescimento (SMITH, 2003). Em humanos, as células tronco hematopoéticas CD34⁺, expressam as integrinas

VLA-2, 4, 5 e 6 (antígenos de adesão vascular), destas, as VLAs 4 ($\alpha_4\beta_1$) e 5 ($\alpha_5\beta_1$), possuem receptores para a fibronectina, molécula de adesão que controla a proliferação da célula tronco (SIMMONS et al., 1992). Células progenitoras CD34⁺ humanas purificadas, estabelecidas em cultura, formaram colônias CFU-GEMM, BFU-E, CFU-E e CFU-M (células formadoras de colônias monocíticas) (WEINSTEIN, et al., 1988; ZHOW et al., 1993) dependente da presença de fibronectina e IL-3.

A hematopoese esplênica é ativa no período embrionário tardio e pré-natal. Entretanto, esta atividade se reduz gradativamente, podendo ser reativada em processos patológicos, causados, por exemplo, por radiação ionizante e uso de medicamentos. A gradativa redução da hematopoese esplênica, mais especificamente, da mielopoese, foi analisada em estudos realizados com células de camundongos no período embrionário e pós-natal. Os estudos utilizaram marcadores antigênicos hematopoéticos para célula tronco (*c-kit*) e para macrófagos (Mac-1, integrina CD11c/CD18) e revelaram a presença de população dominante de células positivas para Mac-1 em ambos os períodos, com decréscimo do número destas, juntamente com as células tronco, após o nascimento, quando observa-se o aumento do número de linfócitos. Os autores concluíram que a redução da mielopoese esplênica pode ser devido às alterações no microambiente causados pela idade (OHNO et al., 1993).

Poucos são os conhecimentos sobre as necessidades para a formação de colônias esplênicas. Entretanto, estudos realizados por CHABOT et al., (1988), revelaram ser o *c-kit* e seu ligante SCF, essenciais, visto que animais com mutação no receptor *c-kit* (mutação W), apresentam severa anemia macrocítica, e as células primitivas são incapazes de formar colônias esplênicas. O SCF, também conhecido como *kit ligant* ou fator de crescimento para mastócitos é uma citocina que inicia suas atividade biológicas ao ligar-se ao seu receptor *c-kit*. A ausência da proteína SCF ou de seu receptor, *c-kit*, causa mutações conhecidas como mutação SI ou mutação W, respectivamente

(BROUDY, 1997). As células progenitoras hematopoéticas exibem receptor *c-kit*. O cultivo de células com receptor *c-kit*⁺, selecionadas por anticorpos monoclonais, revelou a formação de colônias BFU-E, CFU-E, CFU-GM, CFU-Meg e CFU-GEMM, o mesmo não acontece quando as células são receptor *c-kit*⁻ (OGAWA, et al., 1991; BRIDDELL, et al., 1992). O SCF pode agir diretamente na célula tronco humana, induzindo a sua entrada no ciclo celular (LEARY et al., 1992), pode modular a adesão das células tronco a fibronectina e a VCAM-1 (KOVACH et al., 1995).

KELLER et al., (1983) revelaram que o estroma esplênico de camundongos normais não sustenta a hematopoese por longos períodos, evidenciando a ocorrência de diferenças significativas entre as culturas realizadas com células medulares e esplênicas, sendo que as principais estão relacionadas ao microambiente e ao tipo celular. Assim, células adiposas, presentes na camada aderente de LTBM (cultura de células de medula óssea de longa duração), não se desenvolvem em culturas de células esplênicas; o número de células esplênicas não aderentes é reduzido, quando comparado às presentes na medula óssea e quanto ao tipo celular, as culturas de células esplênicas revelaram a presença de neutrófilos, macrófagos e células da linhagem eritróide, juntamente com blastos indiferenciados enquanto que em LTBM, a maioria das células são da linhagem neutrofílica.

Estudos realizados por KONNO et al., (1990), identificaram que as moléculas de reconhecimento e ligação das células tronco hematopoéticas ao estroma, em LTMC, não são as mesmas presentes no estroma esplênico. Em LTMC, estão presentes moléculas de lecitina, galactosil e manosil, porém, concluíram que os mecanismos de reconhecimento presentes no estroma esplênico permanecem desconhecidos.

O sistema de cultura de células em meio semi-sólido e, ou sobre estroma, possibilita o estudo da hematopoese, pois permite que a mesma seja mantida *in vitro* por longos períodos. (KELLER et al., 1983). A medula óssea é o órgão hematopoético de excelência no indivíduo, após o nascimento,

porém, o microambiente esplênico, em condições patológicas, como na metaplasia mielóide, também permite a existência de atividade mielopoética. Ensaio *in vivo*, realizados em camundongos, demonstraram a formação de colônias macroscópicas, porém em menor extensão quando comparadas às formadas na medula óssea (TILL & McCULLOCH, 1961). Quanto ao tipo celular, as colônias esplênicas são primariamente eritrocíticas, diferindo das formadas na medula óssea, principalmente granulocítica (WOLF & TRENTIN, 1968).

A formação reduzida de “clusters” e colônias, para CFC -Mix e CFC-GM a partir de células esplênicas de animais desnutridos, pode estar relacionada a alterações nos receptores dos fatores de crescimento e/ou a alterações em processos transducionais ou transcricionais.

Os processos que controlam a proliferação e diferenciação das células sanguíneas estão mais estudados na série eritrocítica, não sendo, contudo, totalmente conhecido (GHAFARI et al., 2001). O desenvolvimento normal das células eritróides é dependente do receptor para a proteína tirosina quinase *janus-kinase 2* (JAK2), sendo também importante para o receptor da EPO (EPO-R). A ligação da EPO ao seu receptor, causa ativação da JAK2, que, juntamente com a fosforilação do EPO-R, inicia a cascata de sinalização, eventos que ocasionam o desenvolvimento celular eritróide (GHAFARI, et al., 2001; LAPPIN, 2003). NEUBAUER et al., (1998), identificou bloqueio na eritropoese definitiva causada por alterações no gene JAK2. As *janus kinase* (JAKs), pertencentes à família das PTKs (proteína tirosina quinase), possuem características estruturais específicas, sendo que as JAKs 1, 2 e 3 participam da sinalização de receptores de citocinas (IHLE & KERR, 1995), como EPO-R, G-CSF-R (receptor para fator estimulador de colônias granulocíticas) e GM-CSF-R (receptor para fator estimulador de colônias grânulo-monocíticas). A ligação da JAK ocorre na região citoplasmática proximal da membrana, sendo que mutações ocorridas nesta, impossibilitam a ligação e conseqüentemente, a

capacidade de ativação e sinalização proliferativa (QUELLE et al., 1994; MIURA et al, 1993).

A sinalização mitogênica do HGF-R (receptor de fator de crescimento hematopoético), ocorre devido à ativação das JAKs. A JAK forma complexo com a STAT (sinal de tradução e ativador de transcrição), o complexo JAK/STAT é transportado para o núcleo, induzindo a expressão do gene e permitindo a resposta celular dos fatores de crescimento que reconhecem o complexo JAK-STAT ativado (IHLE & KERR, 1995). Estudos realizados por TEGLUND et al., (1998), revelaram redução na resposta para G-CSF e GM-CSF de camundongos com alterações nos genes STAT5a e STAT5b.

A avaliação de alterações celulares hematopoética pode ser realizada através da utilização de anticorpos conjugado á substâncias fluorescentes (KIPPS, et al., 1992).

Em nossos ensaios de imunofenotipagem os animais do grupo desnutrido revelaram aumento na percentagem de células CD34 positivas e células linfóides CD2, CD5, CD19 CD22 positivas. Contudo, o aumento relativo de células jovens, não se refletiu no aumento do compartimento de células maduras, uma vez que os resultados do esplenograma revelam hipocelularidade e no sangue periférico, encontra-se leucopenia e linfopenia, sugerindo comprometimento da hemopoese medular pela redução das células primitivas nestes animais. FRIED & SHAPIRO (1978) verificaram que camundongos desnutridos e irradiados apresentaram redução no número de unidades formadoras de colônias (CFU) no baço e na medula óssea.

Camundongos deficientes em CD34 demonstraram significativo retardo na diferenciação mielóide (CHENG ET AL., 1996). Tanto na medula óssea como no baço de animais desnutridos foi observado aumento da proporção de células blásticas em relação aos animais controles, sugerindo um possível bloqueio maturativo (BORELLI, et al 1995), este pode estar relacionado a alterações do microambiente desses órgãos (FAVERO, 2003; VITURI *et al.*,

2000; XAVIER, 1999), e/ou a produção deficiente de citocinas e fatores de crescimento (FOCK *et al.*, 2002) e/ou alterações intrínsecas a célula.

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que animais submetidos à desnutrição protéica apresentaram no baço, aumento relativo na população célula primitiva CD34+ e na população de células progenitoras linfóides B e T.

As células hemopoéticas esplênicas dos animais desnutridos não responderam adequadamente a estimulação *in vitro*, frente a fatores de crescimento específicos, sugerindo a ocorrência de alterações em receptores e/ou, mecanismos transducionais e/ou transcricionais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISSON, S.P. Malnutrition, disease and outcome. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.590-593, 2000.
- AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T. A clonogenic common myeloid progenitors that gives rise to all myeloid lineages. **Nature**. v.404, p.193-197, 2000.
- ANAGNOSTOU, A.; SCHADE, S.; ASHKINAZ, M.; BARONE, J.; FRIED, W. Effect of protein deprivation on erythropoiesis. **Blood**. v.50, p.1093-1097, 1977.
- AVALOS, B.R. Molecular analysis of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. **Blood**. v.88, p.761-777, 1996.
- BACHOU, H. The nutrition situation in Uganda. **Nutrition**, v.18, 356p, 2002.
- BALL, T.C.; HIRAYAMA, F.; OGAWA, M. Modulation of early B lymphopoiesis by interleukin-3. **Exp. Hematol**. v.24, p.1225-1231, 1995.
- BANNERMAN, R.M. Hematology. In: FOSTER, H.L., SMALL, J.D., FOX, J.G. eds **The mouse in biomedical research**. New York: Academic Press, 1983, v.3, cap. 12, p.239-312. (American College of Laboratory Animal Medicine).
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendência regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**. v.19, (supl 1), p.2003.

- BAZAN, J.F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.87, p.6934-6938, 1990.
- BEARD, J.L. Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. **J. Nutr.** v.131, p568S-579S, 2001.
- BEARMAN, S.; NIETO, Y.; JONES, R.; MCNIECE, I.; SHPALL, E.J.; CAGNONI, P. Ex-vivo expansion of hematopoietic progenitors cell: Preliminary results in breast cancer. **Hematology and cell therapy**. v.41, iss.,2, 1999.
- BECK, F.W.J.; PRASAD, A.S.; KAPLAN, J.; FITZGERALD, J.T.; BREWER, G.J. Changes in cytokine production and T cell subpopulations in experimentally induced zinc-deficient humans. **Am. J. Physiol.** v.272, p.E1002-E1007, 1997.
- BERTONCELO, I.; MCNIECE, I.K.; KRIEGLER, A.B.; QUESENBERRY, P.J. Colony forming cells with high proliferative potential (*HPP-CFC*). **Int. J. Cell. Cloning**, v.8, p.146, 1990.
- BETANCOURT, M.; ORTIZ, R.; GONZALEZ, C. Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. **Mutat Res.** v. 283(3), p.173-7, 1992.
- BHASKARAM, P. Immunobiology of mild micronutrient deficiencies. **Br. J. Nutr.** v.85, Suppl 2, p.S75-80, 2001.
- 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, n.10, p.1477-1485, 1995.

BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z.; KANG, H.C.
Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of mouse macrophages. **Ann. Nutr. Metab., Basel**, v.42, p.367-373, 1998.

BORSATTO, E.; BORELLI, P. Alterations in the proliferation n maturation of granulocyte-macrophage precursor cells in protein malnutrition in mice. **J. Leukocyte Journal**. Submetido 1999.

BORELLI, P.; NARDINELLI, L. Protein-calorie malnutrition: decrease in the macrophage respiratory burst capacity. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37(1), p.51-60, 2001.

BRADLEY, T.R.; HODGSON, G.S.; KRIEGLER, A.B.; MCNIECE, I.K. A growth factor produced by WEHI-3 cells for murine high proliferative potential GM-progenitor colony forming cells. **Cell. Biol. Int. Rep.**, v.6, p.243, 1982.

BRADLEY, T.R.; METCALF, D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.** v.44 p.287, 1966.

BRIDDEL, R.A.; BROUDY, V.C.; BRUNO, E.; BRANDT, J.E.; SROUR, E.F.; HOFFMAN, R. Furter phenotypic characterization and isolation of human hematopoietic progenitor cells using a monoclonal antibody to the c-kit receptor. **Blood**. v.79, p.3159, 1992.

BURROWS, P.D.; COOPER, M.D. B—cell development in man. **Curr. Opin Immunol.** v.5, p.201, 1993.

CHABOT, B.; STEPHENSON, D.A.; CHAPMAN, W.M.; BESMER, P.; BERNSTEIN, A. (1988) *Nature* 335, 88, *apud* OHNO, H.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, S.; HAYASHI, S.; KUNISADA, T.; NISHIKAWA, S. Conditions

required for myelopoiesis in murine spleen. **Immunology Letter**. v.35, p.197-204, 1993.

CHANDRA, R.K. Interactions between early nutrition and immune system. **Ciba Found Symp**. v. 156, p.77-89, 1991.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: An introduction. **Am. J. Nutr**. v.66, p.460S-3S, 1997.

CHARBORD, P.; COULOMBEL, L.; TAVIAN, M. Early ontogeny of human hematopoietic system. **C. R. Seances Soc. Biol. Fil**. v.189, p.617-627, 1995.

CLARK, S.C.; KAMEN, R. The human hematopoietic colony-stimulating factors. **Science**, v.231, p.1229-1237, 1987.

CLINE, M.J.; GOLDE, D.W. Regulation of granulopoiesis. **N. Engl. J. Med.**, v.291, p.1388-1395, 1974.

COETZEE, T. Clinical anatomy and physiology of the spleen. **S. Afr. Med. J.**, v.61, p.737-746, 1982.

CONLON, P.J.; EISENMAN, J.R.; MOCHIZUKI, D.Y. Interleukin-1 regulates hematopoietic activity, a role previously ascribed to hemopoietin -1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.84, 5267p, 1987.

CONOVER, W.R.; KRETCHMAR, A.L. A difference between spleen-derived colony-forming units in ability to protect lethally irradiated mice. **Blood**, v.36, p.772-776, 1970.

- CORTES, E. GONZALEZ, C., BETANCOURT. M., ORTIZ, R. Assessment of DNA damage in spleen, bone marrow and peripheral blood from malnourished rats by single gel electrophoresis assay. **Teratog Carcinog Mutagen**. v.21(3), p.231-47, 2001. SOMENTE ABSTRAT
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Environmental and Nutrition Pathology in: Cotran, Kumar and Collins. – 6^a ed. **Robbins Pathologic Basis of Disease**. Copyright, 1999, cap 10, p.403-457.
- DACIE, J.V.; LEWIS, S.M. **Practical Haematology** 8 ed. New york, p.57-58, 1995.
- DAÍ, G.; PHALEN, S.; McMURRAY, D.N. Nutritional modulation of host responses to mycobacteria. **Front Biosci**. v.3, p.110-22, 1998.
- D'ANDREA, A.D. Hematopoietic growth factors and the regulation of differentiative decisions. **Current Opinion in Cell Biology**, v.6, p.804-808, 1994.
- DEXTER, T.M.; ALLEN, T.D.; LAJTHA, L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. **J. Cell Physiol.**, v.91, p.335-344, 1976.
- DRIVER, A.G.; McALEVY, M.T.; SMITH, J.L. Nutrition assessment of patient with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure. **Chest**, v.82, p.568, 19
- FAVERO, M.E. Avaliação imuno-histoquímica e ultra-estrutural da matriz extracelular de medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição

protéica. São Paulo, 2003, 92p. (Disertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo).

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

FRIEDMAN, A.; SKLAN, D. Antigen-specific immune impairment in the chick as influenced by dietary vitamin A. **J. Nutr.** v.119, p.790-795, 1989.

GABR, M. Malnutrition during pregnancy and lactation. **Word Rev. Nutr. Diet.**, v.36, p.90, 1981.

GALLICCHIO, V.S. Hematopoiesis in review of genetics. In: Stiene-Martin, E.A Lotspeich-Steininger, C.A., Koepke, J. A. Clinical Hematology – **Principles, Procedures, Correlations**. New York: Lippincott. 2ª ed. 1998, cap. 5, p. 46-47.

GAMBERT, S.R. Nutritional assessment in the elderly. **Wisc. Med. J.** v.81, p. 18, 1982.

GAMBERT, S.R. GUANSING, A.R. Protein-calorie malnutrition in the elderly. **J. Am. Gerontol. Soc.** v.26(6), p.272, 1980.

GARCIA, P.B. Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica: análise da mobilização celular e da hematopoese. São Paulo, 1992, v.1, p.183 (Tese de Doutorado – Faculdade de Veterinária e Zootecnia – USP).

- GAY, S.; PRINCE, C.W.; ZUCKERMAN, K.S. The hemopoietic extracellular matrix. In: Tavassoli, M. **Handbook of hemopoietic microenvironment**. Human Press Clifton, NJ. p.399-432, 1989.
- GHAFFARI, S.; KITIDIS, C.; FLEMING, D.; NEUBAUER, H.; PFEFFER, K.; LODISH, H.F. Erythropoiesis in absense of janus-kinase 2: BCR-ABL induces red cell formation in JAK2-/- hematopoietic progenitors. **Blood**. v.98, n°10, p.2948-2957, 2001.
- GEDULDIG, U.; WEIDANZ, W.P.; WEISS, L. Mechanisms of splenic control of malaria: Reticular cell ativation and the development of a blood-spleen barrier. **Am. J. Anat.** v.176, p.251, 1986.
- GIETZEN, D.W.; ERICIUS, L.F.; ROGERS, G.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.
- GOMEZ, J.L; CAMPOS, C.; RANGEL, P.; ORTIZ R., Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. **Mutat. Res.** v.352 (1-2), p.57-60, 1996.
- GOPALAN, S. Malnutrition: causes, consequences and solutions. **Nutrition**. v.16 n.7/8, p.556-558, 2000.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. **J. Biol. Chem.**, Bethesda, v.177, p.751-766,1949.

GRABSTEIN, K.H.; URDAL, D.L.; TUSHINSKI, R.J. Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Science**. v.232, p.506, 1986.

GRAHAM, G.S. Benzidine as a peroxidase reagent for blood smears and tissues. **J. Med. Res.**, Boston, v.39, p.15-24, 1918

GREGORY, C.J.; EAVES, A.C. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. **Blood**. v.49, p.865-864, 1977.

GROOM, A.C.; MACDONALD, I.C.; SCHMIDT, E.E. The intermediation circulation in the nonsinusoidal spleen of the cat, studied by scanning electron microscopy of microcorrosion casts. **J. Morphol.**, v.178, p.125, 1983.

GROOM, A.C.; SCHMIDT, E.E. Microcirculatory blood flow through the spleen. In: Bowdler, A.J., **The Spleen: Structure, Function and Clinical Significance**, Chapman and Hall, London, 1990, p.45-102.

HAGMAN, J.; GROSSCHEL, R.. Regulation of genes expression at early stages of B-cell differentiation. **Curr. Opin Immunol.** v.6, p.222, 1994.

HALLQUIST, N.A.; McNEIL, L.K.; LOCKWOOD, J.F.; SHERMAN, A.R. Maternal iron-deficiency effects on peritoneal macrophage and peritoneal natural killer cell cytotoxicity in rat pups. **Am J.Clin Nutr.** v.55, p.741-746, 1992.

HAO, QI.; THIERMANN, FT.; PETERSEN, D. Extended long-term culture reveals a highly quiescent and primitive human hematopoietic progenitor population. **Blood**, v.88, p.3306-3313, 1996.

- HARRIS, R.B.S.; KASSER, T.R.; MARTIN, R.J. Dynamics of recovery of body composition after overfeeding, food restriction or starvation of mature female rats. **J. Nutr.** v.116, p.2536-2546, 1986.
- HARRY, P.; GABRILOVE, J.L.; WELTE, K. Pluripoietin alpha: a second human hematopoietic colony-stimulating factor produced by human bladder carcinoma cell line 5637. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.83, p.2478, 1986.
- HILL, J.O.; DORTON, J.; SYKES, M.N.; DiGIROLAMO, M. Reversal of dietary obesity is influenced by its duration and severity. **Int J. Obes.** V.13, p.711-722, 1989.
- HOLYOAKE, T.L.; NICOLINI, F.E.; EAVES, C.J. Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood and bone marrow. **Exp. Hematol.** v.27, p.1418-1427, 1999.
- IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)/UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância), 1992. Perfil Estatístico de Crianças e Mães no Brasil: Aspectos Nutricionais, 1989. Rio de Janeiro: IBGE.
- IBGE (Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística)/UNICEF (Fundo das Nações Unidas para a Infância), 1982. Perfil Estatístico de Crianças e Mães no Brasil: Aspectos Nutricionais, 1974-75. Rio de Janeiro: IBGE.
- IHLE, J.N.; KER, I.M. (1995) Jaks and Stats is signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet.* 11, 69-74, *apud* SOEDE-BOBOK, A.A.; TOUW, I.P. Molecular understanding of hematopoietin/cytokine receptor signaling defects in hematopoietic disorders. **J. Mol Med.** v.75, p.470-477, 1997.

ISCOVE, N.N.; SIEBER, F.; WINTERHALTER, K.H. Erythroid colony formation in cultures of mouse and human bone marrow: Analysis of the requirement for erythropoietin by gel filtration and affinity chromatography on agarose-concanavalin. **A. J. Cel. Phisiol.**, v.83, p.309-320, 1974.

ISCOVE, N.N.; MAGLI, M.C.; ODARTCHENKO, N. Transient mature of early haematopoietic spleen colonies. **Nature**, v.295, p.527-529, 1982.

JAMRA, M.; LORENZI, T. **Baço: anatomia, fisiopatologia, clínica, cirurgia.** São Paulo: MEDSI, 1988. 3p.

JEEJEEBHOY, K.N. Nutrition assessment. **Nutrition**, v.16 n.7/8, p.585-590, 2000.

JOHNSON, G.R.; METCALF, D. Pure and mix erytroid colony formation in vitro by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. **Proc. Natl. Acad Sci USA**. v.74. p.3879-82, 1977.

KATZ, F.E.; JOSHI, G.; MILLAR, J.L.; MYERS, C.D. A cell line secreting stimulating factors for CFU-GEMM cultures. **Blood**, v.64, n.1, p.152-155, 1984.

KELLER, G.M.; JOHNSON, G.R.; PHILLIPS, R.A. Hemopoiesis in spleen and bone marrow cultures. **Journal of Cellular Phisiology**. v.116, p.7-15, 1983.

KEUSCH, G.T. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. **J. Nutrition**, v.133, p.336S-340S, 2003.

KINA, T.; IKUTA, K.; TAKYM, E.; WADA, K.; MAJUNDAR, A S.; WEISSMAN, I.L.; KATSURA, Y. The monoclonal antibody TER-119 recognizes a molecule associated with glycophorin A and specifically marks the late stages of murine erythroid lineage. **British Journal of Haematology**, v.109, p.280-287, 2000.

KIPPS, T.J.; MEISENHOLDER, G.W.; ROBBINS, B.A. New developments in flow cytometric analyses of lymphocytes markers. **J. Clin.Lab. Anal.** v.12, p.237,1992.

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

KONNO, M.; HARDY , C.; TAVASSOLI, M. Murine spleen culture: homing of hemopoietic progenitor cells to spleen is not mediated by a similar mechanism to that in marrow. **Exp. Hematol.** v.18, p.65-68, 1990.

KRAHN, D.D.; GOSNELL, B.A.; LEVINE, A.S.; MORLEY, J.E. Behavioral effects of corticotropin-releasing factor: localization and characterization of central effects. **Brain Res.** v.443, p.63-69, 1988.

KRAHN, D.D.; GOSNELL, B.A.; MAJCHZAK, M.J. The anorectic effects of CRH and restraint stress decrease with repeated exposure. **Biol Psychiatry**, v.27, p.1094-1102, 1990.

KRANTZ, S. Erythropoietin. **Blood**, v.77, n.3, p.419-734, 1991.

KELLER, G. Haematopoietic stem cell. **Curr. Opin. Immunol.** v.4, p.133, 1992.

- KOVACH, N.L.; LIN, N.; YEDNOCK, T.; HARLAN, J.M.; BROUDY, V.C.; Stem cell factor modulates avidity of $\alpha_4\beta_1$ and $\alpha_5\beta_1$ integrins expressed on hematopoietic cell lines. **Blood**. v.85, p.159, 1995.
- LABADARIOS, D Nutrition in Africa. **Nutrition**. v.18, p.355, 2002.
- LAPPIN, T. The cellular biology of erythropoietin receptor. **The oncologist**. v.8, (1), p.15-18, 2003.
- LAPPIN, T.R.J.; RICH, I.; GOLDWSSER, E. The effect of erythropoietin and other factors on DNA synthesis by mouse spleen cells. **Exp. Hematol**. v.11, p.661-666, 1983.
- LA PUSHIN, R.W.; TRENTIN, J. Identification of stromal elements in erythroid and neutrophil granuloid spleen colonies: light and electron microscopy study. **Exp. Haematol.**, v.5, p.505-522, 1977.
- LAWRENCE, MB.; SPRINGER, T.A. Leukocyte roll on a selectin at physiologic flow rates. Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. **Cell**. v.65, p.859, 1991.
- LEARY, A.G.; ZEN, HQ.; CLARK, S.C.; OGAWA, M. Growth factor requirements for survival in G_0 and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. *Proc. Natl Sci USA*. v.89, p. 4013, 1998.
- LEBIEN, W.T. Lymphocyte ontogeny and homing receptors. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J. **Williams Hematology**. United States. Copyright, 1995, cap 95, p.921-929.

- LESOURD, B. Protein energy malnutrition. **Nutrition Today**. v.32, n6, p.240-248, 1997.
- LEUNG, PM.; HORWITS, BA Free-feeding patterns of rats in response to changes in invironmental temperature. **Am J Physiol**. v.231, p.1220-1224, 1976. *apud* **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**. v.282, pR77-R88, 2002.
- LOWRY, PA. Hematopoietic stem cell cytokine response. **J. Cell Biochem**. v.58, p.410-415, 1995.
- LYMAN, S.D.; WILLIAMS, D.E. Biological activities and potential therapeutic uses of steel factor. A new growth factor active on multiple hematopoietic lineages. **American Journal of Pedriatric Hematology/Oncology**. v.14(1), p. 1-7, 1992.
- MAYANI, H.; GUILBERT, L.J. JANOWSKA-WIECZOREK. Biology of the hemopoietic microenvironment. **Eur. J. Haematol.**, v.49, p.225-233, 1992.
- McNIECE, I.K. Synergism of hematopoietic colony-stimulating factors. **Am. J. Pedr. Hematol**. v.14 (1), p.31-38, 1992.
- McNIECE, I.K.; McGRATH, H.E.; QUESENBERRY, P.J. Granulocyte colony-stimulating factor augments *in vitro* megacariocyte colony formation by interleukin-3. **Exp. Hematol**. v.16, p. 807, 1988.
- MESSNER, H.A. Assessment and characterization of hemopoietic stem cell. **Stem cell.**, v.13, suppl.3, p.13-18, 1995.

- METCALF, D. Lineage commitment of hemopoietic progenitor cells in developing blast cell colonies: Influence of colony-stimulating factors. **Proc. Ntl. Acad. Sci. USA.** v.88, p.11310-11314, 1991.
- METCALF, D. The molecular biology and functions of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood** v.67, p.257, 1986.
- MITSUMORI, K.; TAKEGAWA, K.; SHIMO, T.; ONODERA, K.; YASUHARA, K.; TAKAHASHI, M. Morphometric and immunohistochemical studies on atrophic changes in lympho-hematopoietic organs of rats treated with piperonil butoxide or subjected to dietary restriction. **Arch Toxicol.** vol. 70:12, p.809-14, 1996.
- MIURA, O.; CLEVELAND, J.L.; ILHE, J.N. Inactivation of erythropoietin receptor function by point mutations in a region having homology with other cytokine receptors. **Mol. Cell. Biol.** v.13, p.1788-1795, 1993.
- MIYAGUCHI, J.; WANG, C.; KELLECHER, C.A. The effects of recombinant CSF-1 on the blast cells of acute myeloblastic leukemia in suspension culture. **J. Cell Physiol.** v.135, p.55. 1988.
- MOHS, M.E. Protein-calorie malnutrition (PCM) in women of child-bearing age in developing countries. In: **Watson R.R. Handbook of Nutrition in the Aged** - 2ª ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. Cap 9, p.145-164.
- MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; SOUZA, A. L.M.; POPKIN, B.M. Da desnutrição para a obesidade: A transição nutricional no Brasil. In: **Velhos e Novos Males da Saúde no Brasil** (C.A. Monteiro, org.), pp. 247-255, 2ª. ed., São Paulo: Editora Hucitec.

- MORRISON, S.J.; UCHIDA, N.; WEISSMAN, IL. The biologia of stem cells. **Annu Rev Cell Biol.** v.11, p.35-71, 1994.
- MORSTYN G.; BURGESS, A.W. Hemopoietic Growth Factors: A Review. **Cancer Research.** v.48, p.5624-5637, 1988.
- 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.**, Bethesda, v.111, p.2133-2143, 1981.
- NAKAHATA, T.; OGAWA, M.. Clonal origin of murine hemopoietic colonies with apparent restriction to granulocyte-macrophage-megakaryocyte (GMM) differentiation. **J. Cell. Physiol.**, v.111, p.239, 1982.
- NEUBAUER, H.; CUMANO, A.; MULLER, M.; WU, H.; HUFFSTADT, U.; PFEFFER, K. Jak 2 deficiency defines an essential development checkpoint in definitive hematopoiesis. **Cell.** v.93, p.397-409, 1998.
- NIJHOF, W.; WIERENGA, P.K. Isolation of hemopoietic pluripotent stem cells from spleens of thiamphenicol-pretreated mice. **Exp. Cell Res.** v.155, p.583-587, 1984.
- NIJHOF, W.; WIERENGA, P.K. Isolation and characterization of the erythroid progenitors cell: CFU-E. **The Journal of Cell Biology.** v.96, p.386-392, 1983.
- NIJHOF, W.; WIERENGA, P.K.; GOLDWASSER, E. The regeneration of stem cells after a bone marrow depression induced by thiamphenicol. **Exp Hematol.** v. 10, p.36-46, 1982.
- OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. **Blood.** v.81, p.2844-2853, 1993.

- OGAWA, M.; MATSUZAKI, Y.; NISHIKAWA, S.; HAYASHI, S.I.; KUNISADA, T.; SUDO, T.; KINA, T.; NAKAUCHI, H., NISHIKAWA, S.I. Expression and function of *c-kit* in hemopoietic progenitors cells. *J.Exp. Med.* v.174, p174-63, 1991.
- OHNO, H.; OGAWA, M.; NISHIKAWA, S.; HAYASHI, S.; KUNISADA, T.; NISHIKAWA, S. Conditions required for myelopoiesys in murine spleen. **Immunology Letter.** v.35, p.197-204, 1993.
- ORTIZ, R.; CORTEZ, L.; GONZALES-MARQUEZ, H.; GOMEZ, J.L., CONZALES, C.; CORTES, E. Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. **Br. J. Nutr.** v.86 (5), p.545-548, 2001.
- OPPENHEIMER, S.J. Iron and its relation to immunity and infection disease. **J. Nutr.** v.131, p.616S-633S, 2001.
- OWEN, M. Marrow stromal stem cells. *J. Cells Sci*, 1988, supp 10: 63-76, *apud* MAYANI, H., GUILBERT, L.J., JANOWSKA-WIECZOREK. Biology of the hemopoietic microenvironment. **Eur. J. Haematol.**, v.49, p.225-233, 1992.
- PABST, R.; WESTERMANN, J.; WILLFUHR, K.U. Absolute number of lymphocytes subsets migrating through the compartments of the normal and transplanted rat spleen. **Eur. J. Immunol.**, v.20, p.903,1990.
- PALACIOS, R.; PELKONEN, J. (1988). Prethymic and intrathymic mouse T-cell progenitors. Growth requirements and analysis of the expression of genes encoding TCR/T3 components and other T-cell specific molecules. *Immunol Rev.*, 158 *apud The Cytokine Handbook*, 3^a ed., 1990, 109p.

- PELLAS, T.; WEISS, L. Migration pathway of recirculating murine B cells: CD4+ and CD8+ lymphocytes. **Am. J. Anat.**, v187, p.355, 1990.
- PLATZER, E.; WELTE, K.; GABRILOVE, J.L. Biological activities of human pluripotent hemopoietic colony stimulating factor on normal and leukemic cells. **J. Exp. Med**, v.162, p.1788, 1985.
- PLATZER, E.; OEZ, S.; WELT, K., Human pluripotent hematopoietic colony stimulating factor: Activities on human end murine cells. **Immunobiology**, v.172, p.185, 1986.
- POWANDA, M.C.; BEISEL, W.R.; Metabolic effect of infection on protein and energy status. **Nutrition**. v.133, p.322S-327S, 2003.
- PRASAD, A.S. Effects of zinc deficiency on Th1 and Th2 cytokine shifts. **J. Infect Dis**. v.182, (Suppl. 1), p.S62-S68, 2000.
- PRASAD, A.S. Zinc and immunity. **Mol. Cell Biochem**. v.188, p.63-69, 1998.
- QUELLE, F.W.; SATO, N.; WITTHUHN, B.A.; INHORN, R.C.; EDER, M.; MIYAJ-IMA, A.; GRIFFIN, J.D.; IHLE, J.N. Jak2 associate with the β_c chain of the receptor for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and its activation requires the membrane-proximal region. **Mol. Cell. Biol**. v.14, p.4335-4341, 1994.
- REBEL, V.I.; DRAGOWSKA, W.; CONNIE, J.; EAVES, R., HUMPHRIES,, K.; LANDSDORP, P.M. Amplification of Sca-1⁺ Lin⁻ WGA⁺ cells in serum-free cultures containing steel factor, interleukin-6 and erythropoietin with

maintenance of cells with long-term in vivo reconstituting potential. **Blood.** v.83, p.128-136, 1994.

REDMOND, H.P.; SHOU,J.; KELLY, C.J.; LEON, P.; DALY, J.M. Immunossuppressive mechanisms impairs host defense against *Candida albicans*. **J. Surg. Res.** v.50, p.552-559, 1991a.

REDMOND, H.P.; SHOU, J.; KELLY, C.J.; SREIBER, S.; MILLER, E.; LEON, P.; DALY, J.M. Immunossuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition. **Surgery.** v.110, n2, p311-317, 1991b.

REDMOND, H.P.; LEON, P.; LIEBERMN, M.D.; HOFFMAN, K.; SHOU, J.; REYNOLDS, J.V.; GOLDFINE, J.; JOHNSTON, R.B.P.; DALY, J.M. Impaired macrophage function in severa protein-energy malnutrition. **Arch. Surg.** Chicago, v.126, p.192-196, 1991c.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY, Jr. G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A rodente diet. **J. Nutr.** v.123, p.1939-1951, 1993.

RODKEY, F.L. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. **Clin. Chem.**, Baltimore, v.1, p. 478, 1965.

ROGERS, C.E.; BRADLEY, M.S.; PALSSON, B.O.; KOLLER, M.R. Flow cytometric analysis of human bone marrow perfusion cultures: erytroid development and relationship with burst.forming units-erythroid. **Exp. Hematol.** v. 24(5), p.597-604, 1996.

- ROSEMBERG, N.; KINKADE, P.W. B lineage differentiation in normal and transformed cells and the microenvironment that support it. **Curr. Opin Immunol.** v.6, p.203, 1994.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de extensão sangüíneas. Noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v.20, p. 315-328, 1947.
- RUDIN, C.M.; THOMPSON, C.B. Apoptosis and disease: Regulation and clinical relevance of programmed cell death. **Annu. Rev. Med.** v.48, p. 267-81, 1997.
- SANTOS, A.M.W.; CHIMELLI, M.; FADEL, S.M.; MELLO, L.M.; ANDRIGHETTI, C.R. Detecção de progenitores eritróides (BFU-E e CFU-E) em medula óssea, sangue de cordão umbilical e sangue periférico usando rh-EPO. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**. v.27(1), p.19-24, 1994.
- SATO, T.; LAVER, J.H.; OGAWA, M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. **Blood**. v.94, p.2548, 1999.
- SCHRADER, J.W. Interleukin-3. In: THOMSON, A. **The cytokine handbook**. New York, Academic Press, 1998, cap. 5, p.105-132.
- SCRIMSHAW, N.S.; SANGIOVANNI, J.P.; Synergism of nutrition, infection, and immunity: an overview. **Am. J. Clin. Nutr.** v.66, p. 464S-77S, 1997.
- SHIVDASANI, R.A.; ORKIN, S.H. The transcriptional control of hematopoiesis. **Blood**. v.87, nº10, p.4025-4039, 1996.

SIEGEL, S. Estatística não paramétrica. São Paulo. McGraw-Hill do Brasil, 1991. 350p.

SIMMONS, P.J.; MESINOSKY, B.; LONGENECKER, B.M.; BERENSON, R.; TOROK-STORB B.; GALLATIN, W.M. Vascular-cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediated the binding of hematopoietic progenitors cells. **Blood**. v.80, p.388, 1992.

SMAGIN, GN.; HOWEL, L.A.; REDMANN, S.; RYAN, D.H.; HARRIS, R.B.S. Prevention of stress-induced weight loss by third ventricle CRF receptor antagonist. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol**. v.276, p. R1461-1468, 1999.

SMITH, C. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. **Cancer Control**. v.10, p.9-16, 2003.

SMITHGALL, T.E. Signal transduction pathways reguating hematopoietic differentiation. **Pharmacological Reviews**. v.50, (1), p.1-20. 1998.

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

STEPHENSON, L.S.; LATHAN, M.C.; OTTESEN, E.A. Global Nutrition. **Parasitology**. v.121, p.S5-22, 2000.

SUDA, J.; SUDA, T.; OGAWA, M. Disparatte differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.81, p.2520, 1984.

- SUTTON, R.E.; KOOB, G.F.; LeMOAL, M.; RIVIER, J.; VALE, W. Corticotropin releasing factor produces behavioural activation in rats. **Nature**. v.297, p.331-333, 1982.
- TEGLUND, S.; McKAY, C.; SCHETZ, E. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant roles in cytokine responses. **Cell**. v.93, p.841-850, 1998.
- TERSTAPPEN, L.W.M.M.; HUANG, S.; PICKER, L.J. Flow cytometric assessment of human T cell differentiation in thymus and bone marrow. **Blood**. v.79, p.666, 1992.
- TILL, J.E.; MCCULLOCH, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal bone marrow cells. **Rad. Res.**, v.14, p. 213-222, 1961.
- TWINING, S.S.; SCHULTE, D.P.; WILSON, P.M.; FISH, B.L.; MOULDER, J.E. Vitamin A deficiency alters rat neutrophil function. **J. Nutr.** v.127, p.558-565, 1997.
- UCHIDA, N.; DONGPING, H.; FRIERA, A.; REITSMA, M.; SASAKI, D.; CHEN, B.; TSUKAMOTO, A. The unexpected G₀/G₁ cell cycle status of mobilized hematopoietic stem cells from peripheral blood. **Blood**. v.89, n°2, p.465-472, 1997.
- UCKUN, F.M. Regulation of human B cell ontogeny. **Blood**. v.76, p.1908-23, 1990.
- VANNUCCHI, A. M.; PAOLETTI, F.; LINARI, S.; CELLAI, C.; CAPORLI, R.; FERRINI, P.R.; SANCHES, M.; MIGLIACCIO G.; MIGLIACCIO, A.R. Identification and characterization of a bipotent (erythroid and megakaryocytic)

cell precursor from the spleen of phenylhydrazine-treated mice. **Blood** v.95, p.2559-2568, 2000.

VINOLO, M.A.R.; CRISMA, A.R.; SOUZA, A.C.; FAVERO, M.E.; FERREIRA, M.; FOCK, R.A., BLATT, S.L. Redução da proliferação de células hematopoéticas da medula óssea e baço em desnutrição protéica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v.39, supl.3, 21p, 2003.

VILLAREAL, M.E.; KENT, G. Promoting nutrition rights in Latin America. **Food Policy**. v.21, n.1, p.103-110, 1996.

VITURI, C.L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Alterations in proteins of marrow extracellular matrix in undernourished mice. **Braz J Med. Biol. Res.** vol. 33(8), p. 889-895, 2000.

WEINSTEIN, R.; RIORDAN, M.A.; WENC, K., KRECZKO,S.; ZHOU, M.; DAINIAK, N.; Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation. **Blood**. v.73, p.111, 1988.

WEISS, L. The structure of the spleen. In: Beutler, E., Lichtman M., Coller, S. B., Kipps, T.J. **Williams Hematology**. New York: McGraw-Hill, 5^a ed. 1995. cap.5, p.38-42, 1995.

WEISSMAN, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration and units in evolution. **Cell**. v.100, p.157-168, 2000.

WELTE, K.; PLATZER, E.; LU, L. Purification and biological characterization of human pluripotent hematopoietic colony stimulation factor. **Proc. Natl. Acad Sci USA**. v.82, p.1526, 1985.

- WOLF, N.S.; TRENTIN, J. Effects of hemopoietic organ stroma on differentiation of pluripotent stem cell. *J. Exp. Med.* 1968; 127: 205-214, apud MAYANI, H., GUILBERT, L.J., JANOWSKA-WIECZOREK. Biology of the hemopoietic microenvironment. **Eur. J. Haematol.**, v.49, p.225-233, 1992.
- WU, H.; LIU, X.; JAENISCH, R.; LODISH, H.F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors doe not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. **Cell.**, v.83, p59-67, 1995.
- WYLLIE, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. **Nature** v.284, p.555-56, 1980.
- XAVIER, J.G. Repercurssões estruturais da desnutrição protéica e renutrição em tecidos linfo-hematopoéticos de camundongos. São Paulo, 1998, 254p (Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – USP).
- XAVIER, J.G., BORELLI, P.; EL-CHEIKH, M.C.; BOROJEVIC, R. Nutritional protein deficiency: lymphocyte depletion, fibrosis and myofibroblast activation in spleen. *Int. J. Exp. Pathol.*, Oxford [no prelo].
- ZAMBRANO-RAMIREZ, I.R.; SANTIAG-OSORIO, E.; WEISS-STEIDER, B., CACERES-CORTES, JR. Biology of hematopoietic stem cell. **Res Invest Clin.** v.51(1), p.53-68, 1999.
- ZIEGLER, B.; VALTIERI, M.; PORADA, G.; De MARIA, R.; MUELLER, R.; MASELLA, B.; GABIANELLI, M.; CASELLA, I.; PELOSI, E.; BOCK,T.; ZANJANI, E.; PESCHLE, C. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. **Science.** v.285, p.1553, 1999.

ZHOW, Y.Q.; LEVESQUE, JP.; HATZFELD, A.; CARDOSO, A.A.; LI, M.L.; SANSILVESTRI, P.; HATZFELD, J. Fibronectin potentiates the effect of interleukin 3 on early human hematopoietic progenitors. **Blood**. v.82, p.800, 1993.

ZSEBO, K.M.; COHEN, A.M.; MURDOCK, D.C., Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: Molecular and biological characterization. **Immunology**, v.172, p. 175, 1986.

ANEXOS

7. Anexo 1

FIGURA 22 - Representação gráfica da imunofenotipagem de células hematopoéticas esplênicas, utilizando antígenos de membrana anti CD2, Anti CD5 e anti CD19. Foram adquiridas 10^6 células em citômetro de fluxo Facs Calibur (Becton Dickinson), com laser de argônio 488nm, sendo adquiridos 10.000 eventos, a partir da região selecionada, R1. Valores em porcentagem do total de células marcadas.

	Controle	Desnutrido
Anti CD2	46%	70%
Anti CD5	39%	43%
Anti CD19	28%	47%

FIGURA 23 - Representação gráfica da imunofenotipagem de células hematopoéticas esplênicas, utilizando antígenos de membrana anti CD22 e anti CD34. Foram adquiridas 10^6 células em citômetro de fluxo Facs Calibur (Becton Dickinson), com laser de argônio 488nm, sendo adquiridos 10.000 eventos, a partir da região selecionada, R1. Valores em percentagem do total de células marcadas.

	Controle	Desnutrido
Anti CD 22	32%	35%
Anti CD 34	2,35%	2,59%

7. ANEXO 2 – Reagentes e Metodologias

7.1 ALBUMINA BOVINA (BSA)

BSA (Sigma® - Chemical Company – USA)	10 g
Iscove's (Gibco®-BRL, Life -Ternologies-USA)	100mL

A diluição foi feita em meio Iscove's 1x concentrado. A solução foi esterilizada por filtração em membrana de poro 0,22µm (Millipore® - USA).

7.2 2-MERCAPTOETANOL - 14,2mol/L

2-Mercaptoetanol (Sigma® - Chemical Company – USA),	0,07mL
Iscove's (Gibco®-BRL, Life -Ternologies-USA)	1,0mL

A solução estoque de 2-Mercaptoetanol foi feita pela diluição de 0,07mL de 2-Mercaptoetanol em 1,0mL de meio de cultura Iscove's 1x concentrado. Desta diluição foi retirado o volume de 0,4mL e completado para 30,0mL com meio de cultura Iscove's (1x concentrado). Diluições sucessivas foram realizadas e abaixo representadas:

0,07mL ----- 1,0mL (solução estoque)

0,4mL ----- 4,0mL

3,0mL ----- 30,0mL (solução de uso)

A solução de uso foi esterilizada por filtração em membrana Millipore, de poro 0,22µm (Millipore® - USA), aliqotada e conservada a 4°C.

7.3 LÍQUIDO DE TURK

Ácido Acético Glacial	30mL
Violeta Genciana	0,10mL
Água Destilada (q.s.p.)	1000mL

Após a diluição, o corante foi filtrado, aliqotado e conservado a -4°C .

7.4 MAY-GRUNWALD-GIEMSA, MODIFICADO (ROSENFELD, 1947)

May-Grunwald-Giemsa (Merck®-Alemanha)	0,53g
Giemsa (Merck®-Alemanha)	0,97g
Metanol p.a. (Merck®-Alemanha)	1000mL

Após a diluição, o corante foi homogeneizado e armazenado em frasco âmbar, ao abrigo da luz.

7.5 METILCELULOSE - 4.000 *centiPoise*

Água tridestilada (Sistema Milli Q®)	125mL
metilcelulose (Fischer's®-USA)	5g
Meio Iscove's (Gibco®-BRL)	125mL
Soro Bovino Fetal (Cultilab®-Brasil)	170,45mL
BSA (Sigma® - Chemical Company -USA)	10g
Metilprednisolona (Rhodia®)	496,35g/mol
2-Mercaptoetanol (Sigma® - Chemical Company -USA)	14,2mol/L

A metilcelulose foi diluída em água destilada. Posteriormente foram acrescentado os demais reagentes, sendo a matriz aliqotada e congelada a -40°C .

7.6 METILPREDNISOLONA - 496,38g/mol

Metilprednisolona (Pharmacia & Upjohn Ltda. - São Paulo	125mg
Iscome's (Gibco®-BRL, Life -Tecnologies-USA)	2,0 mL

A solução estoque de metilprednisolona foi feita pela diluição de 125mg de metilprednisolona para um volume final de 2,0 mL de meio de cultura Iscome's 1x concentrado. Desta diluição foi retirado o volume de 0,79mL e completado para 1,0mL com meio de cultura Iscome's. Diluições sucessivas foram realizadas para um volume final de 3,0mL e abaixo representadas:

125mg ----- 2,0mL (solução estoque)
 0,79mL ----- 1,0mL
 0,1mL ----- 1,0mL
 0,4mL ----- 4,0mL
 3,0mL ----- 3,0mL (solução de uso)

A solução de uso foi esterilizada por filtração em membrana Millipore®, de poro 0,22µm(Millipore®-USA), aliquoteada e conservada a 4°C.

7.7 PARAFORMALDEÍDO (1%)

Paraformaldeído (Sigma®, Chemical Company –USA)	10g
Água destilada (q.s.p.)	1000mL

7.8 PBS (10x concentrado)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®-Brasil)	26,5g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®-Brasil)	3,6g
NaCl p.a. (Merck®-Brasil)	81,7g
Água tridestilada q.s.p. (Sistema Milli-Q®)	1000mL

Os reagentes foram dissolvidos em solução aquosa, sendo posteriormente armazenados em frasco âmbar e mantidos a 4°C.

7.9 PBS-Azida (0,1%)

PBS (10x concentrado)	100mL
Azida (Merck-Alemanha)	100g
Água tridestilada q.s.p. (Sistema Milli-Q®)	1000mL

7.10 PBS DULBELCCO

NaCl p.a. (Merck®-Brasil)	8,0g
KCl p.a. (Merck®-Brasil)	0,2g
CaCl_2 p.a. (Merck®-Brasil)	0,1g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®-Brasil)	0,1g
NaPO_4 p.a. (Merck®-Brasil)	0,91g
KH_2PO_4 p.a. (Merck®-Brasil)	0,2g
Glicose p.a. (Merck®-Alemanha)	1,0g
Água tridestilada q.s.p. (Sistema Milli Q®)	1000mL

7.11 SOLUÇÃO CORANTE DE AZUL DE TRIPANO (0,1%)

Azul de Trypan (Merck®-Alemanha)	10g
PBS	100mL

Após a diluição, o corante foi filtrado, aliquotado e conservado a -4°C .

7.12 SOLUÇÃO HEMOLISANTE DE GEY'S

Solução A	
NH_4Cl p.a. (Merck®-Brasil)	35,0g
KCL p.a. (Merck®-Brasil)	1,85g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®-Brasil)	1,5g
KH_2PO_4 p.a. (Merck®-Alemanha)	0,12g
Glicose p.a. (Merck®-Alemanha)	5,0g
Vermelho de fenol p.a. (Merck®-Alemanha)	50,0mg
Água tridestilada q.s.p. (Sistema Milli Q®)	1000mL

Solução B	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®-Brasil)	0,42g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®-Brasil)	0,14g
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®-Alemanha)	0,45g
Água tridestilada q.s.p.. (Sistema Milli Q®)	100mL

Solução C	
NaHCO_3 p.a. (Merck®-Brasil)	2,25g
Água tridestilada q.s.p.. (Sistema Milli Q®)	1000mL

Após a diluição dos reagentes, a solução foi esterilizada por filtração em membrana de poro $0,22\mu\text{m}$ (Millipore®, USA), aliquotada e conservada a

4°C, após ajuste do pH para 7,4. Na hora do uso, as soluções foram preparadas na proporção de 4:1:1 (v/v).

7.13 SOLUÇÃO SALINA – BSS (sem Ca⁺⁺, sem Mg⁺⁺)

NaCL p.a. (Merck®-Brasil)	8,0g
KCL p.a. (Merck®-Brasil)	0,4g
Na ₂ SO ₄ p.a. (Merck®-Brasil)	0,1g
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O p.a. (Merck®-Brasil)	0,39g
KH ₂ PO ₄ p.a. (Merck®-Alemanha)	0,15g
Glicose p.a. (Merck®-Alemanha)	1,1 g
Vermelho de fenol p.a. (Merck®-Alemanha)	0,0025g
Água tridestilada q.s.p.. (Sistema Milli Q®)	1000mL

Após a diluição dos reagentes, foi acrescentado soro bovino fetal na concentração de 10%. A solução foi esterilizada por filtração em membrana de poro 0,22µm (Millipore® - USA), aliquoteada e conservada a 4°C, após ajuste do pH para 7,4.