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

Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa
duração de estroma medular de camundongos submetidos à
desnutrição protéica.

GRAZIELA BATISTA DA SILVA

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora: Prof. Dra. Primavera Borelli

São Paulo
2011

Ficha Catalográfica

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

S586p Silva, Graziela Batista da
Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa
duração de estroma medular de camundongos submetidos à
desnutrição protéica / Graziela Batista da Silva. -- São Paulo,
2011.
75p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Borelli, Primavera

1. Hematologia 2. Medula óssea 3. Matriz extracelular :
Biologia 4. Desnutrição protéica : Medicina I. T. II. Borelli,
Primavera, orientador.

616.15 CDD

GRAZIELA BATISTA DA SILVA

Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa
duração de estroma medular de camundongos submetidos à
desnutrição protéica.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de *Mestre*

Profa. Dra. Primavera
Orientadora/presidente

Marinilce Fagundes dos Santos

1º. examinador

Laurecir Gomes

2º. examinador

São Paulo, 26 de setembro de 2011.

Aos meus pais, Valdir e Lúcia e aos meus irmãos Bruno e Douglas, que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida e que são o meu alicerce para que eu possa sempre ir mais longe.

Agradecimentos

A Deus por ter me concedido a vida, por me guiar nas veredas da justiça, por esta comigo nos momentos mais difíceis em que pensei que não poderia mais continuar.

A Prof.^a Dr.^a Primavera por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho e por ter orientado o mesmo com toda a dedicação e a confiança depositada em mim.

Ao Prof. Dr. Guilherme Xavier pelo incentivo e auxílio para que eu pudesse realizar este trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fock e Prof. Dr. Marcelo Rogero por terem participado da minha formação profissional e pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

As minhas companheiras de pós-graduação Luciana Simão, Jackeline Soares Beltran, Fabiana Lima, Mayara Caldas, Mariana Koèche, Alexandra Siqueira e Maria Carolina Borges pelo o apoio nos momentos difíceis; auxílio nos experimentos e a amizade.

Aos amigos Mayara Cortez, Júlio Monteiro e Luiz Fernando Galdino pela amizade, por bons momentos de convivência e auxílio nos momentos que precisei de ajuda.

A Amanda Crisma, Karina Nakajima, Mariana Ferreira pela amizade, conhecimento, paciência e o auxílio durante todo o tempo para a realização deste trabalho.

Aos amigos do laboratório de bioquímica; Martina Rudnicki, Fernanda César, Marcela Frota e Cristiane Saito pela amizade e a colaboração nos experimentos.

Ao Prof. Dr. Orlando Garcia, Iana Katz e Layra Albuquerque do laboratório de imunogenética do Instituto Butantan pela amizade e o auxílio na realização dos experimentos da análise proteômica e RT-PCR.

À Ivanir Pires, técnica do laboratório de Bioquímica da Nutrição, por estar sempre disposta a ajudar e pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

E a todos os colaboradores, alunos e estagiários do laboratório de hematologia que de alguma maneira contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado, e ao apoio financeiro também cedido pela CAPES para a realização desta pesquisa.

*"Aprender é um processo evolutivo e constante, porque a vida evolui
constantemente, e nela somos todos eternos aprendizes"*

Autor desconhecido

RESUMO

Silva, G. B. **Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição protéica.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A desnutrição acomete 925 milhões de pessoas em todo o mundo, independentemente da idade e classe social, os mais acometidos são indivíduos hospitalizados, crianças e idosos. A desnutrição causa alterações fisiológicas em diversos tecidos. O tecido hematopoiético é afetado na desnutrição protéica, por ser um tecido de elevada e constante necessidade de proteínas, levando a alterações hematológicas como anemia e leucopenia. Estudos do nosso laboratório têm demonstrado *in vivo*, alterações do microambiente hematopoiético, em camundongos submetidos à desnutrição protéica, bem como hipoplasia medular, mudanças quantitativas da matriz extracelular (MEC) como o aumento do depósito de fibronectina na região subendosteal (local da fixação das células tronco/ progenitoras hematopoiéticas), alterações do ciclo celular das células tronco/ progenitoras hematopoiéticas e alteração na expressão de VLA5; principal integrina na interação das células a fibronectina. Sendo assim propõe-se neste projeto avaliar possíveis isoformas da molécula de fibronectina, para melhor compreender o seu papel biológico no ciclo celular as células tronco/ progenitoras hematopoiéticas em um modelo de desnutrição protéica. Para isso foram utilizados camundongos C57BLI/6J machos, adultos, mantidos em gaioleiros metabólicos, separados em dois grupos. O grupo controle recebeu uma ração normoprotéica com 12% de proteína e o grupo desnutrido, uma ração hipoprotéica com 2% de proteína, num período de 5 semanas. Após este período os animais foram sacrificados para avaliação hematológica, celularidade da medula óssea, quantificação e pesquisa de isoformas da fibronectina, análise do perfil protéico no estroma medular em culturas de longa duração bem como a análise do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração. Os animais desnutridos apresentaram uma menor celularidade e uma diminuição

significativa de células jovens na medula óssea. O estroma medular estabelecido em culturas de longa duração dos animais do grupo desnutrido apresentaram uma menor confluência em relação ao grupo controle. Também foi observado nas culturas de longa duração um aumento significativo da fibronectina no 28º dia de cultura, mas com uma diminuição da fibronectina no 35º dia, porém com uma menor quantidade de região EDA nos dois períodos analisados (sítio de ligação das integrinas a fibronectina) quando comparados aos animais do grupo controle. A pesquisa de isoformas de fibronectina no estroma medular, por meio de RT-PCR, revelou que tanto os animais do grupo controle quanto os animais do grupo desnutrido apresentaram diferentes isoformas de fibronectina, porém não foi possível fazer uma análise quantitativa das regiões de splicing alternativo. O perfil protéico das culturas de longa duração analisado por meio de eletroforese bidimensional demonstrou que os animais do grupo desnutrido possuem um perfil protéico diferente dos animais do grupo controle, também foi observado uma diferença do perfil protéico entre os 28º e 35º dias de cultura. Portanto a alteração quantitativa da molécula de fibronectina e da região EDA, bem como a presença de diferentes isoformas de fibronectina, juntamente com as alterações do perfil protéico podem ser devido a um aumento e ou degradação das proteínas de matriz extracelular. E estas alterações podem ser responsáveis pela hipoplasia medular e alteração do ciclo celular das células tronco/ progenitoras hematopoiéticas e estromais, talvez pela menor interação com as integrinas, sendo esta interação fundamental para a modulação de diversas funções celulares tais como proliferação e diferenciação e para a regulação do remodelamento da matriz extracelular. Mas ainda se faz necessário a quantificação das regiões de splicing alternativo, seqüenciamento das proteínas da matriz extracelular e a identificação das possíveis metalaproteínases presentes no estroma medular para melhor elucidar as funções da fibronectina e outras proteínas da matriz extracelular na manutenção da hemopoese.

Palavras-chave: Fibronectina, isoformas de fibronectina, matriz extracelular, medula óssea, nicho hemopoético, hemopoese e desnutrição protéica.

ABSTRACT

Silva, G. B. **Search fibronectin isoforms in cultures of long-term bone marrow stroma of mice submitted to protein malnutrition.** 2011. Dissertation (Masters) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2011.

Malnutrition affects 925 million people worldwide, regardless of age and social class, the most affected individuals are hospitalized, children and elderly. Malnutrition causes physiological changes in various tissues. The hematopoietic tissue is affected in protein malnutrition, because it is a tissue of high and constant need of proteins, leading to hematological abnormalities such as anemia and leucopenia. Studies from our laboratory have demonstrated in vivo changes in the hematopoietic microenvironment in mice submitted to protein malnutrition, and bone marrow hypoplasia, quantitative changes of the extracellular matrix (ECM) as the increase in deposit fibronectin in the region subendosteal (site of attachment of the cells stem / progenitor), changes in cell cycle of stem cells / progenitor and changes in the expression of VLA5; main integrin interaction of cells to fibronectin. Therefore this project proposes to evaluate possible isoforms of fibronectin molecule, to better understand its biological role in cell cycle stem cells / progenitor in a model of protein malnutrition. Mice were used for this C57BLI/6J male adults were kept in metabolic gaioleiros, separated into two groups. The control group received a ration normoproteíca with 12% protein and the malnourished group, a low protein diet with 2% protein over a period of 5 weeks. After this period the animals were sacrificed for hematological evaluation, bone marrow cellularity, and quantification of fibronectin isoforms research, analysis of protein profiles in marrow stroma in long-term cultures and analysis of the establishment of bone marrow stroma in long-term cultures. The malnourished animals showed a lower cellularity and a significant decrease of young cells in the bone marrow. The bone marrow stromal cultures established in long-term animal malnourished group had a lower convergence in the control group. It was also observed in cultures long term a significant increase in fibronectin on the 28th day of culture, but with a

decrease in fibronectin 35 th day, but with a smaller amount of EDA region in both periods analyzed (binding site of integrins to fibronectin) compared to the control group. The survey of isoforms of fibronectin in bone marrow stroma, by RT-PCR revealed that both control animals and animals in the malnourished group presented different isoforms of fibronectin, but it was not possible to make a quantitative analysis of the regions of alternative splicing. The protein profile of long-term cultures analyzed using two-dimensional electrophoresis showed that animals of the malnourished group have a protein profile different from the control group was also observed a difference in protein profile between 28° and 35° day of culture. Therefore, the quantitative change of the molecule fibronectin and the region of EDA, as well as the presence of different isoforms of fibronectin, together with changes in protein profile may be due to an increase, or degradation of extracellular matrix proteins. And these changes may be responsible for bone marrow hypoplasia and alteration of the cell cycle of stem cells / progenitor and stromal cells; perhaps because of less interaction with integrins, this interaction is essential for the modulation of various cellular functions such as proliferation and differentiation and to regulation of extracellular matrix remodeling. But it is still necessary to quantify the areas of alternative splicing, sequencing of the extracellular matrix proteins and identification of possible metalaproteinases present in bone marrow stroma to better elucidate the roles of fibronectin and other extracellular matrix proteins in maintaining hemopoese.

Keywords: Fibronectin, fibronectin isoforms, extracellular matrix, bone marrow, hemopoieic niche, hemopoese and protein malnutrition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 :Estrutura da fibronectina e seus domínios.....	22
Figura 2: Estrutura da fibronectina e os splicing alternativos.....	23
Figura 3: Consumo de ração,proteína e água.....	44
Figura 4: Variação e porcentagem da variação da massa corporal.....	45
Figura 5: Celularidade da medula óssea.....	50
Figura 6: Fotomicrografia do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração.....	53
Figura 7: Fotomicrografia do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração.....	54
Figura 8: Análise do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração pelo sistema de escore.....	55
Figura 9: Determinação de fibronectina total e região EDA do 28° e 35° dia de cultura por Western Blotting.....	57
Figura 10: Marcação de fibronectina por imunocitoquímica do 28° dia de cultura.....	58
Figura 11: Pesquisa de isoformas da fibronectina pelo RT-PCR.....	60
Figura 12: Eletroforetograma bidimensional (2D) do 28° dia de cultura.....	62
Figura 13: Eletroforetograma bidimensional (2D) do 35° dia de cultura.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das rações.....	29
Tabela 2: Composição da mistura salínica.....	30
Tabela 3: Composição da mistura vitamínica.....	31
Tabela 4: A análise do estroma do estabelecimento.....	34
Tabela 5: Seqüência de primers.....	39
Tabela 6: Concentração plasmática de proteínas totais e albumina.....	46
Tabela 7: Concentração sérica de sódio e potássio.....	46
Tabela 8: Parâmetros de eritrograma e índices hematimétricos.....	48
Tabela 9: Parâmetros do leucograma.....	49
Tabela 10: Valores referentes a diferenciação dos tipos celulares presentes na medula óssea.....	51

LISTA DE SIGLAS

cFN	Fibronectina celular
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
DAB	Diamiobenzidina
DTT	Dithiothreitol
EDA	Extra domains A (Região EDA)
EDB	Extra domains B (Região EDB)
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
FAK	Focal adhesion kinase (Quinase de adesão focal)
FAO	Food and Agriculture Organization
FN	Fibronectina
G0	Estágio quiescente do ciclo celular
HCM	Hemoglobina corpuscular média
IIICS	III Connecting segment (Segmento associado ao tipo III)
INF-γ	Interferon-gama
LIN⁻	Célula tronco/progenitora hematopoiética
MAPK	Mitogen-activated protein kinase (Proteína quinase ativada por mitógeno)
MEC	Matriz extracelular
NaF	Fluoreto de sódio
PBS	Phosphate buffer solution (Solução tampão fosfato)
PCR	Polymerase chain reaction
pFN	Fibronectina plasmática
PMSF	Phenylmethylsulphonyl fluoride (Fluoreto de fenilmetilssulfonila)
S	Fase S do ciclo celular
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poli(acrilamida) dodecil sulfato de sódio

TBS	Tris buffered saline (Solução tampão fosfato)
TGF-β	Transforming growth factor beta (Fator de transformação do crescimento beta)
TNF-α	Tumor necrosis factor alfa (Fator de necrose tumoral alfa)
VCM	Volume corpuscular médio
VLA-4	Very late antigen $\alpha_4\beta_1$ (Antígeno de expressão tardia $\alpha_4\beta_1$)
VLA-5	Very late antigen $\alpha_5\beta_1$ (Antígeno de expressão tardia $\alpha_5\beta_1$)
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1. Introdução.....	17
1.1 Desnutrição.....	17
1.2 Hemopoese e desnutrição.....	19
1.3 Fibronectina.....	21
1.4 Fibronectina e Hemopoese.....	24
2.0 Objetivos.....	27
3.0 Delineamento Experimental.....	27
4.0 Material e Métodos.....	28
4.1 Animais.....	28
4.2 Indução da desnutrição.....	28
4.3 Ração.....	28
4.4 Avaliação do estado nutricional dos animais.....	32
4.5 Obtenção de amostras biológicas.....	32
4.6 Hemograma e contagem de reticulócitos.....	32
4.7 Determinação de proteínas totais e albumina plasmática.....	32
4.8 Determinação de sódio e potássio.....	33
4.9 Obtenção de células da medula óssea e mielograma.....	33
4.10 Estabelecimento do estroma medular: Culturas de longa duração.....	34
4.11 Extração de proteínas totais da cultura de estroma medular.....	35
4.12 Determinação de proteínas totais extraídas da cultura de estroma medular.....	35
4.13 Avaliação da fibronectina por Western Blotting.....	37
4.14 Avaliação da fibronectina por imunocitoquímica.....	37
4.15 Análise da fibronectina e suas isoformas por RT-PCR.....	38
4.15.1 Extração do RNA.....	38
4.15.2 Síntese do DNA complementar (cDNA).....	38
4.15.3 Reação de RT-PCR.....	39

4.16	Análise de proteínas totais da cultura de estroma medular em gel SDS-PAGE bidimensional (2D).....	40
4.16.1	Coloração dos géis da eletroforese 2D por nitrato de prata.....	41
4.17	Análise estatística.....	42
5.0	Resultados.....	43
5.1	Determinação da concentração protéica da ração.....	43
5.2	Avaliação do estado nutricional.....	43
5.3	Determinação de sódio e potássio.....	46
5.4	Avaliação hematológica.....	47
5.4.1	Eritrograma.....	47
5.4.2	Leucograma.....	47
5.5	Células totais da medula óssea e mielograma.....	50
5.6	Avaliação do estabelecimento do estroma medular: Culturas de longa duração.....	52
5.7	Determinação de fibronectina presente na cultura de longa duração de células da medula óssea por Western Blotting.....	56
5.8	Avaliação da fibronectina presente na cultura de longa duração de células da medula óssea por Imunocitoquímica.....	56
5.9	Pesquisa da fibronectina e suas isoformas.....	54
5.10	Análise eletroforética bidimensional das proteínas obtidas do estroma medular das culturas de longa duração.....	61
6.0	Discussão.....	64
7.0	Conclusão.....	69
8.0	Referências bibliográficas.....	70
Anexo A: Parecer da Comissão de Ética em experimentação Animal		

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Desnutrição

A desnutrição é definida como decorrente da diminuição ou desequilíbrio da ingestão e ou absorção inadequada de proteínas, calorias e micronutrientes, por infecções freqüentes ou algumas patologias (WHO, 2000).

Em 2010 a desnutrição atingiu cerca de 925 milhões de pessoas em todo o mundo. Em sua grande maioria, os indivíduos desnutridos encontram-se nos países em desenvolvimento: na Ásia e Pacífico, estima-se que 578 milhões de pessoas apresentem-se cronicamente desnutridos; sendo na África Sub-Saariana, 239 milhões; na África do Norte, 37 milhões e na América Latina e Caribe, 53 milhões. (FAO, 2010)¹. Já nos países desenvolvidos, a desnutrição afeta, aproximadamente, 15 milhões de pessoas. Segundo a FAO (2004) no Brasil mais de 13 milhões de pessoas apresentaram algum tipo de desnutrição. Dados mais recentes da FAO (2010)² relatam o número é de 12,10 milhões de pessoas, correspondendo 6% da população brasileira.

A desnutrição é responsável por 55% das mortes de crianças no mundo inteiro. Está associada a várias outras doenças e ainda hoje é considerada a principal causa de mortalidade em crianças abaixo de cinco anos (SAWAYA, 2006). Dados do IBGE publicados em 2010 relatam que a desnutrição infantil diminui no Brasil.

A desnutrição acomete principalmente crianças, idosos e indivíduos hospitalizados sob alimentação parenteral ou que apresentam distúrbios alimentares (WAITZBERG *et al.*, 1999; MARCOS, 2000; BRUNDTLAND *et al.*, 2000; GADDUCCI *et al.*, 2001; AKNER & CEDERHOLM, 2001; NOVA *et al.*, 2002; KEUSCH, 2003). A prevalência de desnutrição em indivíduos hospitalizados varia de 20% a 50% dependendo do estado clínico do paciente (NORMAN *et al.*, 2008). BAUER e tal (2002) relatam que 76% dos pacientes com câncer são desnutridos. BORGES *et al.* 2010 observaram que pacientes desnutridos com câncer apresentaram pior qualidade de vida e relataram também um aumento de risco nutricional em 41,6% dos pacientes avaliados.

A cada três indivíduos um é acometido pela desnutrição, independentemente da idade ou classe social, porém populações carentes são mais acometidas. A redução da oferta de alimentos e a crise econômica mundial têm sido apontadas como os principais responsáveis pela dificuldade de acesso ao alimento (FAO, 2009).

Clinicamente as consequências da desnutrição dependem da idade do indivíduo, da intensidade, da duração e da causa da deficiência e, na dependência dos mesmos, pode-se observar o comprometimento do desenvolvimento psico-motor, no caso de crianças, alterações histológicas e funcionais em diversos órgãos como coração, pulmão, rins, trato gastro-intestinal; tal como atrofia das vilosidades e alteração da permeabilidade intestinal, alterações do sistema imunológico levando a um aumento da susceptibilidade às infecções (DE ANGELIS, 1986; AUGUSTO *et al.*, 1995; COTRAN *et al.*, 2000), alterações do sistema endócrino afetando principalmente hormônios da tireóide, insulina e o hormônio do crescimento e alterações hematologias (GROVER *et al.*, 2009;). Estas alterações, de maneira geral, levam a problemas de saúde, e que contribuem para a deterioração do estado nutricional. Esses efeitos são observados principalmente em crianças, sendo que dados de 2001 (WHO) indicam que, aproximadamente, 54% dos casos de mortalidade infantil no mundo foram decorrentes da desnutrição. Estudos evidenciam que a morbidade causada por diarreia em crianças desnutridas é maior em relação às crianças nutridas (BERKOWITZ, 1992; CHANDRA, 1991) uma vez que a desnutrição pode modificar a imunidade mediada por células (CHANDRA, 1991, 1997; GOOD & LORENZ, 1988). Indivíduos desnutridos são susceptíveis a infecções por patógenos intracelulares que, reconhecidamente, acometem indivíduos com imunidade celular deprimida (REYNOLDS *et al.*, 1992).

Muitos autores reconhecem, na desnutrição, a existência de duas síndromes clínicas - *Kwashiorkor* e *Marasmus* (WATERLOW, 1971). Considera-se que *Kwashiorkor* e *Marasmus* representem dois aspectos do desbalanço e inadequação nutricional mais do que duas entidades separadas com origens em dietas diferentes (WATERLOW, 1971; CHANDRA, 1977). Assim, os quadros clínicos não podem ser definidos como resultantes de carências específicas de proteínas e/ou de calorias (DE ANGELIS, 1977); *Kwashiorkor* e *Marasmus* são os dois extremos da desnutrição, porém muitos estados

intermediários são reconhecidos sendo que em todos eles é freqüente a presença de infecções (OLSON, 1975; CHANDRA, 1981). Assim, pode-se dizer que a desnutrição é geralmente composta de deficiências múltiplas de nutrientes em extensões variáveis (CHANDRA, 1981).

1.2 Hemopoese e desnutrição

A hemopoese ocorre em regiões anatômicas específicas onde existem localizações histo-anatômicas denominados de microambientes e que permitem a formação das diferentes linhagens sanguíneas. O microambiente hemopoético é constituído por células sanguíneas em diferentes estágios de maturação, células estromais (células reticulares, macrófagos, fibroblastos, adipócitos), uma matriz extracelular formada principalmente por fibronectina, laminina, colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico, e por substâncias solúveis (EVANS *et al.*, 1991; BRACH & HERMANN, 1991; MAYANI *et al.*, 1992; ABBOUD & LICHTMAN, 2001), apresentando-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica que, além de fornecer a estrutura de sustentação para as células hemopoéticas, permite um "ambiente bioquímico" fundamental para a proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (MAYANI *et al.*, 1992; OPAS, 1994; ABBOUD & LICHTMAN, 2001; Xavier *et al.* 2007). Dessa maneira, supõe-se a existência de fatores regulatórios que formariam microambientes indutivos (TRENTIN, 1978; TESTA & DEXTER, 1990) controlando a hemopoese pela produção e secreção local de citocinas e/ou hormônios, pelas células estromais, pela co-localização de citocinas para as células tronco nos locais de contato célula-célula e/ou célula - MEC ou ainda, por estímulo direto pelo contato celular (RIOS & WILLIAMS, 1990; METCALF, 1992; OPAS, 1994; ABBOUD & LICHTMAN, 2001), podendo este microambiente modulado pelo estado nutricional do indivíduo (BORELLI, *et al.*, 1995; VITURI, *et al.*, 2000; XAVIER, *et al.*, 2007). A elevada e constante necessidade de proteínas por parte do tecido hematopoético faz com que seja comum o encontro de alterações hematológicas como anemia e leucopenia em desnutrição protéica (WATERLOW, 1996; BORELLI *et al.*, 2004), embora a natureza das mesmas ainda não esteja totalmente esclarecida.

Um dos pré-requisitos para a hemopoese é a fixação da célula em microambientes particulares, possibilitando interações célula-célula e célula - MEC (TAVASSOLI & MINGUELL, 1991). Demonstrou-se que a implantação da célula tronco é dependente de migração intramedular seguida de retenção seletiva em nichos endosteais específicos (NILSSON, *et al.*, 2001), sendo que a interação das células primitivas e o estroma depende da presença de proteoglicanos na MEC secretados pelas células estromais (MAYANI; *et al.*, 1992). Proteoglicanos associados à membrana celular podem interagir com outros componentes da MEC como fibronectina, constituindo um sistema de regulação da proliferação celular (TAVASSOLI & MINGUELL, 1991). São poucos os trabalhos relacionando desnutrição e a MEC. LYRA *et al.*, (1993), avaliaram os efeitos da desnutrição sobre o timo de crianças desnutridas observando aumento na densidade da MEC o que foi considerando responsável pela depleção dos timócitos. REIF *et al.*, (1993) encontraram, em indivíduos desnutridos, diminuição de componentes da MEC do fígado, porém, a relação protéica/tecido não apresentou diferença significativa, sugerindo que a causa tenha sido a infiltração gordurosa com esteatose hepática. AXELLSON *et al.*, (1990) observaram mineralização óssea, inferindo que a desnutrição leva à síntese de proteoglicanos de peso molecular mais elevado acarretando inibição da calcificação. Os mecanismos que levam a estas alterações ainda não foram elucidados, mas, considerando que as moléculas da MEC estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação, diferenciação e migração das células hematopoéticas exercendo desta forma controle sobre a hemopoese medular, estas alterações podem ser significativas para a fisiologia do tecido (BORELLI, *et al.*, 1995; VITURI, *et al.*, 2000; XAVIER, *et al.*, 2007).

Estudos de nosso laboratório tem encontrado em desnutrição protéica, hipoplasia de medula óssea de camundongos (BORELLI *et al.*, 1995, 2001, 2007) com evidências histológicas de alteração da matriz extracelular. VITURI *et al.* (2000) encontrou alterações na proporção de proteínas, especialmente de fibronectina, trombospondina e laminina, na MEC de camundongos desnutridos, situação que poderia contribuir para a hipoplasia observada. Mais recentemente, a partir da caracterização imuno-histoquímica e ultra-estrutural de tais alterações evidenciou-se aumento na deposição de fibronectina na medula óssea esternal de animais desnutridos especialmente em sítios

endosteais/paratrabeculares (regiões de fixação de células tronco hematopoética) e aumento na deposição de laminina, particularmente em regiões perisinusais (XAVIER *et.al.* 2007). Tais alterações podem modificar a co-localização de uma série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de crescimento e diferenciação de células hematopoéticas (BORELLI *et al.*, 1995, 2001, 2007; KLEIN, 1995; VITURI, 2000).

Alterações hematológicas quantitativas como anemia (MARTINS *et al.*, 1971; DE ANGELIS, 1986; AUGUSTO, 1995; LEE & HERBERT, 1999; COTRAN *et al.*, 2000), leucopenia (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995, 1998, 2001, 2007) linfocitopenia (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995; AUGUSTO, 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI *et al.*, 1995, 1998, 2001, 2006; BARON, 1997) são um reflexo do comprometimento dos órgãos linfo-hematopoéticos em condições de desnutrição e estão associadas à modificação da resposta imune que se traduz por maior suscetibilidade a infecção (SCRIWSHAW, 1969; GROSS & NEWBERNE, 1980; TOMKINS, 1986; VICTORIA & HERNANDEZ, 1990).

1.3 Fibronectina

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína multifuncional encontrada no plasma e na matriz extracelular (MEC) dos tecidos. A FN é uma molécula que consiste de duas subunidades similares ou idênticas de 230 - 250 KDa e estão unidas por duas pontes de dissulfeto na região carboxi-terminal, formando um dímero (TAMKUN *et al.*, 1984; WHITE *et al.*, 2008).

A FN é expressa por vários tipos celulares podendo ser sintetizada pelas células estromais da medula óssea (KLEIN, 1995), estando envolvida em vários eventos fisiológicos durante a embriogenese, hemostasia, cicatrização e manutenção da integridade do tecido, processos estes que dependem da interação entre célula e MEC (YANG *et al.*, 2002; WHITE *et al.*, 2008).

A FN possui múltiplos domínios para a ligação de células, outras moléculas de fibronectina e componentes da MEC tal como colágeno ou heparan sulfato

Cada monômero da fibronectina apresenta uma combinação de 3 diferentes tipos de domínios homólogos, denominados tipo I, II e III. O tipo I tem 12 módulos constituídos por 40 aminoácidos, o tipo II tem 2 módulos constituídos por 60 aminoácidos e o tipo III tem 15 módulos constituídos de 90 aminoácidos. O domínio tipo III constitui a maior parte da molécula de FN (FRENCH_CONSTANT, 1995; PANKOV & YAMADA, 2002; BRENMÖEHL *et al*, 2007; WHITE *et al*, 2008) (figura 1).

"spliced" alternativo do domínio homólogo tipo III nomeado de domínio A (EDA) e domínio B (EDB) e uma região não homóloga denominado "segmento associado ao tipo III" (IIICS) também denominada de região variável (V) (WHITE *et al*, 2008) (figura 1).

Figura 2: Estrutura da Fibronectina e os "splicing" alternativos dos domínios EDA, EDB e IIICS. Fonte: CHAUHAN *et al*, 2003 (modificado).

Os segmentos EDA e EDB são inteiramente incluídos ou excluídos ("exon skipping") e o IIICS pode ser incluído (V120), excluído (V0) ou parcialmente incluído (V95) na molécula de FN, este último varia de acordo com a espécie (BRENMOEHL *et al*, 2007, 2008; WHITE *et al*, 2008) (Figura 2). O "splicing" dos domínios EDA e EDB são similares em todas as espécies, enquanto que o domínio IIICS é espécie - específico resultando em 5 variantes em humanos, originando 20 isoformas diferentes de FN, 3 variantes em ratos dando origem a 12 isoformas de FN e, por fim, 2 variantes em galinhas; dando origem a 8 isoformas de FN (FRENCH_CONSTANT, 1995; WHITE *et al*, 2008). As isoformas de fibronectina resultantes podem ocasionar diferenças funcionais, tendo sido observados alterações na afinidade com receptores - integrinas (FRENCH_CONSTANT, 1995).

A inclusão dos domínios por "splicing" alternativo é elevada durante o desenvolvimento embrionário e diminui substancialmente depois do nascimento e com envelhecimento. Contudo, o padrão de "splicing" embrionário é temporalmente re-estabelecido na vida adulta em certas circunstâncias, como por exemplo, reparação tecidual, fibrose e angiogenese (WHITE, 2008).

A fibronectina pode ser encontrada no plasma sendo denominada fibronectina plasmática (pFN), apresentando a estrutura dimérica, forma esta secretada por

hepatócitos. A fibronectina plasmática não possui a sequência de domínios A e B, denominados EDA e EDB respectivamente, e que fazem parte do segmento tipo III. Outro tipo de fibronectina é a celular (cFN), encontrada na MEC dos tecidos e que contém uma proporção variável dos domínios EDA e EDB. Não é conhecida a função biológica do domínio EDB, mas numerosas funções são descritas para o domínio EDA, incluindo adesão, diferenciação celular, cicatrização, ligação à matriz, progressão do ciclo celular e sinal de transdução mitogênico entre outros (WHITE *et al*, 2008). O variante *splicing* EDA tem um importante papel relacionado à regulação da proliferação celular e diferenciação de adipocitos e fibroblastos em miofibroblastos, na promoção do "spreading" e migração celular. A molécula de FN contendo o domínio EDA é significativamente mais potente do que a FN sem o domínio EDA (BERNMOEHL *et al*, 2008). O domínio EDB é um marcador da angiogenese (BERNMOEHL *et al*, 2007).

Como seria de esperar, uma vez que não há presença dos domínios EDA ou EDB na pFN, foi observado que não existe diferença na trombose vascular em camundongos EDA^{-/-} e EDB^{-/-}. No entanto, surpreendentemente, a inclusão constitutiva da EDA na molécula de FN (EDA^{+/+}) de camundongos confere atividade pró-trombótica, contribuindo para uma interação fibronectina-plaqueta. Estes animais, apesar de ter apenas 20% dos níveis normais pFN, desenvolveram mais rapidamente uma trombose oclusiva em artérias danificadas por cloreto férrico e foram mais sensíveis à embolia pulmonar após a infusão de colágeno e epinefrina na corrente sanguínea. Estas alterações conformacionais na molécula de FN ocasionam alteração na sua função (WHITE *et al*, 2008).

1.4 Fibronectina e hemopoese

Na medula óssea, as células tronco/progenitoras estão em contato íntimo com a fibronectina, sendo que integrinas expressas por essas células, VLA-4 (very late antigen $\alpha_4\beta_1$) e VLA-5 (very late antigen $\alpha_5\beta_1$), são reconhecidas como mediadoras da interação entre essa população celular e a fibronectina tanto em camundongos quanto em humanos (WILLIAMS, *et al*, 1991; LOO, 1998). Alguns estudos demonstraram que a expressão

dessas integrinas em células progenitoras hemopoéticas é modulada após contínua exposição a citocinas em culturas *ex vivo* (BECKER, 1999; PROSPER, 1998), sendo verificada relação importante entre o ciclo celular e a adesão dessas células, via VLA-4 e VLA-5.

A população de células progenitoras nas fases S/G2/M do ciclo celular estaria predominantemente aderida à fibronectina enquanto que as células em quiescência seriam encontradas com mais frequência na população de células não aderidas, sugerindo que a transição de um estado quiescente para a ativação do ciclo celular esteja associada ao potencial de adesão à fibronectina (GIET *et al*, 2001 e 2002). Porém, a ativação do ciclo celular não causa a adesão da célula à fibronectina, uma vez que são encontradas células em ciclo na fração não aderente. Giet (2001) verificou também que a adesão das células em ciclo é mediada, preferencialmente, por VLA-5, e que a estimulação por citocinas permite a superexpressão desse receptor.

A porção citoplasmática das integrinas é capaz de interagir com o citoesqueleto celular, logo, estão intimamente relacionadas à morfologia e à migração celular. No entanto, a importância das integrinas não está relacionada somente com a adesão/migração da célula. Verifica-se também que a ativação dessas moléculas induz a transdução de sinal afetando a expressão gênica (HANKS, 1997; DANEN, 2001). A interação entre integrinas e a MEC ativa a via da FAK ("focal adhesion kinase") que se une à via da MAPK ("mitogen-activated protein kinase") promovida por fatores de crescimento. Dessa forma, a interação das células tronco/progenitoras à fibronectina intensifica o crescimento e a sobrevivência das mesmas (EZOE *et al*, 2004). Resultados preliminares do nosso laboratório demonstram que os animais desnutridos apresentaram significativa expressão de receptores para fibronectina, VLA-4, e VLA-5, na população de células tronco/progenitoras (Lin⁻). Também foi verificado aumento da população de células Lin⁻ nos estágios iniciais do ciclo celular (G0/G1) quando comparados com os animais controle (BORELLI *et al*, 2009), além de redução da expressão de ciclina D1 e um aumento da expressão de p21 e p27. Em culturas *ex vivo*, as células Lin⁻ obtidas da medula óssea de animais desnutridos responderam aos estímulos promovidos por fatores de crescimento e pelo contato com a matriz de fibronectina de maneira satisfatória e

até mais intensamente quando comparados com as células dos animais controle (NAKAJIMA, 2010). Desta forma, podemos sugerir que as células Lin⁻ de animais desnutridos apresentaram menor capacidade proliferativa, *in vivo*, quando comparado com animais controles, possivelmente devido ao comprometimento do microambiente medular dos camundongos desnutridos, uma vez que as células destes responderam de forma adequada quando estimuladas para a indução do ciclo celular. Portanto, o aumento do depósito de fibronectina seria de certa forma, paradoxal aos dados recentes, uma vez que essa matriz não estaria estimulando de forma apropriada a proliferação das células hemopoéticas. Uma das hipóteses seria a de que a fibronectina apresente alterações conformacionais em sua estrutura, decorrentes de isoformas, o que poderia resultar na perda e/ou modificação funcional.

2.0 OBJETIVOS

Em função da importância na biologia celular da interação da fibronectina aos seus ligantes, modulando diferentes funções celulares como a proliferação, e considerando trabalhos do grupo que evidenciaram alterações no ciclo celular de células tronco/progenitoras na medula óssea de camundongos desnutridos, ocasionando hipoplasia, propõem - se neste projeto pesquisar a presença de isoformas de fibronectina em culturas de longa duração de células estromais da medula óssea em camundongos em decorrência a desnutrição protéica.

3.0 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para atingir este objetivo, propomos o seguinte delineamento experimental;

- Indução da desnutrição protéica, pelo oferecimento de ração hipoproteica contendo 2% de proteína;
- Avaliação do estado nutricional dos animais, determinando o consumo da ração, consumo de água, avaliação do peso corpóreo, dosagem de proteínas totais e albumina plasmática, e dosar sódio e potássio sérico;
- Avaliação do perfil hematológico dos animais através do hemograma e mielograma;
- Avaliar o estabelecimento do estroma medular, por meio do estabelecimento de culturas de longa duração de células estromais da medula óssea;
- Quantificar, por técnica de Western Blott e imunohistoquímica, a fibronectina produzida *in vitro*, em modelo de culturas de longa duração de células estromais da medula óssea;
- Pesquisa, por RT-PCR, da presença de isoformas de fibronectina em culturas de longa duração de células estromais da medula óssea;
- Análise do perfil protéico do estroma medular, utilizando a técnica de eletroforese bidimensional (2D).

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem **C57Bl/6J**, machos, de dois a três meses de idade, oriundos de colônias do biotério de Produção e Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Este projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEEAF/FCF) (Protocolo nº 226, ver anexo A).

4.2 Indução da desnutrição

Os animais foram previamente pesados e separados em gaioleiros metabólicos (ZUCAS *et al.*, 1969), sendo mantidos sob temperatura ambiente de 22 a 25 °C, ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luzes acesas as 7h da manhã e desligadas às 19h), umidade de 55 ± 10%. Durante o período de duas semanas os animais receberam ração comercial Nuvilab CR-1 ® e água *ad libitum*. Os animais foram pesados a cada 48 horas. Após este período de adaptação os animais foram separados aleatoriamente em dois grupos: **nutrido ou controle (C)** alimentados com ração controle; e **desnutrido (D)**, que passaram a receber ração hipoprotéica (Du *et al.*, 2000; BORELLI *et al.*, 2007). Após cinco semanas, os animais de ambos os grupos foram sacrificados para obtenção do material biológico.

4.3 Rações

Os animais receberam ração controle contendo 12% de proteína e ração hipoprotéica contendo 2% de proteína (Tabela 1). As rações foram preparadas em nosso laboratório na forma de granulado e conservadas a 4°C até o momento do uso.

Ambas as rações são isocalóricas e diferem apenas no conteúdo protéico. A fonte de proteína utilizada foi a caseína (LABYNTH®). Entretanto, aproximadamente 80% do fosfato advém da caseína, desta forma a adição de menor quantidade de caseína na ração hipoprotéica diminuiria a quantidade disponível do mesmo. Portanto, foram realizadas correções na composição da mistura salínica para corrigir a diferença na concentração de fosfato (tabela 2).

A concentração protéica da caseína e das rações foram determinadas pelo método micro-Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) e realizadas no laboratório de Bioquímica da Nutrição (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), pela Sra. Ivanir Pires e sob a responsabilidade do Prof Dr. Júlio Tirapegui.

Tabela 1: Composição das Rações utilizadas

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

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

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

* Tabela 2

** Tabela 3

Tabela 2: Composição da mistura salínica

Composição da mistura salínica	Ração controle (g/Kg de Mix)	Ração hipoprotéica (g/Kg de Mix)
Carbonato de cálcio anidro	357,00	357,00
Fosfato de potássio monobásico	236,16	353,21
Cloreto de sódio	74,00	74,00
Citrato de potássio	39,00	Xx
Sulfato de potássio	46,60	46,60
Óxido de magnésio	24,00	24,00
Citrato férrico	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65
Carbonato de manganês	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30
Iodato de potássio	0,01	0,01
Selenato de sódio anidro	0,01025	0,01025
Paramobilidato de amônio 4 H ₂ O	0,00795	0,00795
Meta-silicato de sódio 9 H ₂ O	1,45	1,45
Sulfato de potássio e crômio	0,275	0,275
Cloreto de lítio	0,0174	0,0174
Ácido bórico	0,0815	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066	0,0066
Sacarose	212,646	134,596

(REEVES, 1993)

Tabela 3: Composição da mistura vitamínica

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

(REEVES, 1993)

4.4 Avaliação do estado nutricional dos animais

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

4.5 Obtenção das amostras biológicas

As amostras biológicas, sangue total, células da medula óssea e o esterno, foram obtidas após os camundongos serem previamente anestesiados com xilazina (16 mg/kg de peso corporal) e cetamina (120 mg/kg de peso corporal).

4.6 Hemograma e contagem de reticulócitos

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

4.7 Determinação de proteínas totais e albumina plasmática

As amostras de sangue foram obtidas de acordo com o item 4.6. Após a coleta, as amostras foram imediatamente centrifugadas (2000xg durante 20 minutos, a 4°C). O sobrenadante foi congelado em *freezer* a -40°C, onde permaneceu até a realização da

análise. A concentração de proteínas totais plasmática foi determinada pelo método de Biureto (GORNAL et al., 1949) e a dosagem de albumina plasmática foi avaliada pelo método de Verde de Bromo Cresol (DOUMAS, 1971), sendo utilizado "kits" comerciais da Labtest®. As amostras foram processadas em duplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader - Bio-Tek Instrumentals, Inc), em 540nm.

4.8 Determinação de sódio e potássio

A determinação da concentração de sódio e potássio foi realizada para avaliar se os animais de ambos os grupos apresentaram um desequilíbrio eletrolítico.

As amostras de sangue foram obtidas de acordo com o item 4.6, mas sem o uso de anticoagulante. Após a coleta as amostras foram mantidas em repouso por 2 horas para a retração do coágulo, em seguida foram centrifugadas (2000xg durante 20 minutos, a 4°C). O sobrenadante foi congelado em freezer a -40°C, onde permaneceu até a realização da análise. A análise das amostras foi realizada no analisador bioquímico da Labtest®, modelo Labmax 240, pela metodologia de eletrodo íon seletivo.

A determinação de sódio e potássio foi realizada no Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária -USP.

4.9 Obtenção de células da medula óssea e mielograma

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

4.10 Estabelecimento do estroma medular: Culturas de longa duração

O estabelecimento do estroma medular foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Spooncer et al. (1993). As células da medula óssea foram obtidas por lavagem da cavidade medular com meio Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA) suplementado com 10% soro eqüino, hidrocortisona ($1 \mu\text{mol/L}$) (Sigma® Chemical Company, USA), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma® Chemical Company, USA) e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Sigma® Chemical Company, USA). A viabilidade celular foi feita com azul de Tripan 1% em hemocítômetro de Neubauer. As células foram plaqueadas (3×10^6 células/poço) em placas aderentes (TPP®) de 24 poços e em Cultureslide (BD) de 4 poços, com meio Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA) suplementado com 25% soro eqüino, hidrocortisona ($1 \mu\text{mol/L}$) (Sigma® Chemical Company, USA), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma® Chemical Company, USA) e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Sigma® Chemical Company, USA) e mantidas em estufa com atmosfera úmida, a 33°C e com 5% de CO_2 . O meio de cultura foi parcialmente (50% do volume) trocado a cada cinco dias. O crescimento celular e o estabelecimento dos componentes do estroma foram avaliados no 3º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dias, após o plaqueamento, utilizando-se o microscópio invertido Nikon, com ocular de 10x e objetiva de 10X (Dexter *et al.*, 1977; Toksoz *et al.*, 1980). Para a análise do estabelecimento do estroma foi utilizado um sistema de "escore" (DOMENECH *et al.*, 1994), onde foi considerada a quantidade de células vivas e mortas, o aparecimento de células com morfologia fibroblastoides, adipócitos-like e a confluência da cultura (ver tabela 4).

Tabela 4 Análise do estabelecimento do estroma

Análise do Crescimento do Estroma	
Escore 0:	Nenhuma célula visualizada
Escore 1:	Poucas células visualizadas
Escore 2:	Freqüentes células visualizadas
Escore 3:	Numerosas células visualizadas
Escore 4:	Abundantes células visualizadas

4.11 Extração de proteínas totais da cultura de estroma medular

Após o estabelecimento do estroma medular como descrito no item 4.10, foi realizada a extração de proteínas totais das células presentes na cultura em placas de 24 poços no 28º e 35º dia de cultivo. Após a retirada do sobrenadante, cada poço foi lavado uma vez com 1,0 mL de PBS estéril (pH 7,4). Após a lavagem, foram adicionados em cada poço 150 μ L de tampão RIPA® (PIERCE) contendo inibidores de proteases e de fosfatases (50mM de NaF, 1mM de PMSF, 10 μ g/mL de Leupeptina, e Aprotinina). A placa foi mantida em banho de gelo, sob agitação moderada, durante 1 hora, depois com o auxílio de uma espátula ("scraper") obteve-se o lisado celular. Este lisado foi centrifugado a 14000xg durante 15 minutos a 4°C, para sedimentação do *debris* celular. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado e alíquotado e congelado em *freezer* a -40°C até a realização das análises.

4.12. Determinação de proteínas totais extraídas da cultura de estroma medular

As proteínas totais do estroma obtidas conforme descrito no item 4.11, foram determinadas pelo "Kit" comercial BCA da Pierce. Todas as amostras foram processadas em duplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instrumentals, Inc), em 540nm.

4.13 Determinação de fibronectina por "Western Blotting"

Após a obtenção das proteínas da cultura de estroma medular de acordo com o item 4.11, as amostras foram diluídas em Tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 1M pH 6,8, contendo 0,01% de azul de bromofenol, 10% de SDS, 50% de glicerol e 10% de mercaptoetanol) na proporção de 1 parte de tampão para 4 partes de amostras,

deixando-se em ebulição durante 5 minutos para a desnaturação. As amostras foram armazenadas em *freezer* -40°C até o momento da análise.

Após a quantificação das proteínas totais foi realizada eletroforese em gel de poliacrilamida docecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), utilizando gel de empilhamento a 4% e a 7% para o gel de separação de acordo com o sistema de LAEMMLI (LAEMMLI, 1970). Foi aplicado no gel 12µg de proteínas das amostras da cultura de estroma medular, bem como o padrão de peso molecular. A eletroforese foi executada em tampão de corrida pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 0,1% de SDS e água bidestilada), primeiramente com 50V para a passagem das amostras do gel de empilhamento para o gel de separação e em seguida 150V até que as amostras percorressem todo o gel de separação. Imediatamente após a eletroforese foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF (Millipore®). A transferência foi realizada em sistema semi-seco (Amersham®, GE) com tampão de transferência pH 8,3 (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 20% de metanol e 0,02% de SDS) a 70mA por 60 minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos e depois lavada com tampão TBS 0,01% de Tween 20 (TBS-Tween). A seguir a membrana foi tratada com tampão de bloqueio, solução de leite a 5% (TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 5%), por 90 minutos em temperatura ambiente e sob constante agitação. Após este período a membrana foi lavada 3 vezes, por 10 minutos cada lavagem, com tampão TBS-Tween, sob agitação em temperatura ambiente e posteriormente incubada com o anticorpo primário de anti-fibronectina (BD Biosciences Pharmingen, na diluição 1:2000) e ou fibronectina-EDA (clone-IST-9, diluição 1:400, Abcam) nas devidas diluições em solução de leite a 3% (TBS-Tween e leite em pó desnatado Molico® a 3%). A incubação foi mantida *overnight*, a 4°C e depois a membrana foi novamente lavada da mesma forma descrita anteriormente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti-mouse IgG conjugado com peroxidase, BD Biosciences Pharmigen, na diluição de 1:2000) por 1 hora, em temperatura ambiente e sob agitação. Novamente a membrana foi submetida ao processo de lavagem e prosseguiu-se com a detecção por quimioluminescência utilizando o "kit" de revelação ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham®

GE) no equipamento ImageQuant 400 (GE, Healthcare). A aquisição da imagem e análise foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL. Para a quantificação da fibronectina total e região EDA foi utilizada a marcação de β -actina, para normalização.

4.14 Avaliação de fibronectina por imunocitoquímica

A reação de imunocitoquímica foi realizada nas culturas de longa duração em Cultureslide (BD), após o estabelecimento do estroma medular como descrito no item 4.10

As células das culturas de estroma medular foram fixados com etanol 96% por 4 minutos, em seguida foram progressivamente hidratados, e com álcool 95% por 5 minutos e com álcool 70% por mais 5 minutos. Após a hidratação, as células da cultura foram lavadas duas vezes com PBS (0,02M e pH 7, 2) por 5 minutos e incubados com solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3% por 45 minutos em câmara escura, para bloquear a peroxidase endógena. Nas etapas seguintes foram usados reagentes do "kit" de imunodeteção da Vector®. As células da cultura foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos e incubados com solução de bloqueio na diluição de 1:35 para bloquear as ligações inespecíficas, por 1 hora em câmara escura e úmida. Foi retirado o excesso da solução de bloqueio e as células foram incubadas com anticorpo primário anti-Fibronectina (BD-Biosciences Pharmigen) na diluição 1:100 em diluente para anticorpo fornecido no "kit", e incubado over night em câmara escura e a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos e incubados com o anticorpo secundário bioinilado anti-mouse na diluição de 1:100, por 1 hora em câmara úmida e a temperatura ambiente. As células foram novamente lavadas e incubadas com streptavidina-peroxidase por 30 minutos em câmara úmida e a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, foi realizada a revelação com DAB (diaminobenzidina) por 10 minutos, em seguida as células foram coradas com Hematoxilina de Harrys.

4.15 Análise da fibronectina e suas isoformas por RT-PCR

4.15.1 Extração de RNA

Após o estabelecimento do estroma medular como descrito no item 4.10, foi realizada a extração do RNA total da cultura em placas de 24 poços no 28° e 35° dias de cultivo, por meio do "Kit", RNAspin Mini RNA isolation®, da GE Healthcare. A concentração do RNA total purificado foi determinada no espectrofotômetro Nanodrop 1000®, Thermoscientific, em 260/280 nm.

A integridade das amostras foi verificada no gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris base, ácido bórico e EDTA 0,25M pH 8,0) e brometo de etídeo. Foi utilizado 250ng de amostra por poço no gel. A eletroforese foi executada a 100V em pH 8,0, tampão TBE por 15 minutos, no sistema de eletroforese da Bio-Rad®.

4.15.2 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA foram utilizados os seguintes reagentes: 10µL de RNA total na concentração de 100ng/mL, 1 µL de Oligo (dT)₂₀ (50µM), 1 µL de dNTP mix (10mM) e 2 µL de água destilada livre de DNase e RNase. Em seguida a amostra de RNA total e os demais reagentes foram homogeneizados e mantidos a uma temperatura de 65°C por 5 minutos e 1 minuto no gelo. Posteriormente foi adicionado 4 µL de tampão (250 mM de Tris-HCL pH 8,3 , 375mM de KCL e 15mM de MgCl₂), 1 µL de DTT 0,1M e 1 µL da enzima SuperScript III Reverse Transcriptase (200U/ µL) e as amostras permaneceram a temperatura de 50°C por 50 minutos e depois a temperatura de 70°C por 15 minutos. Foram utilizados reagentes da Invitrogen® para a síntese de cDNA e o termociclador da MJ Reserch PTC 200.

4.15.3 Reação de RT- PCR

Foi avaliado o RNA mensageiro da fibronectina total e a presença das suas isoformas EDA, EDB e IIICS no estroma medular de 28° e 35° dia de cultivo. Para cada 2 μ L de amostra do cDNA foram acrescentados 5 μ L de tampão (200mM de Tris-HCL pH 8,4 e 500mM de KCL), 1,5 μ L de Cloreto de magnésio (50mM), 1 μ L de dNTP mix (10mM), 1 μ L de cada seqüência de "primers" (10 μ M) (produzidos pela Invitrogen®, ver tabela 5), 0,4 μ L de Taq DNA polymerase (5U/ μ L) e água destilada livre de DNase e RNase para completar o volume para 50 μ L por amostra. As amostras foram acondicionadas em microtubos e submetidas a uma temperatura inicial de 94°C por 1 minuto e uma seqüência de 35 ciclos que compreende a desnaturação; a temperatura de 94°C por 30 segundos, anelamento; a uma temperatura de 65°C; para fibronectina, 46°C; para EDA e IIICS e 61°C; para EDB, por 30 segundos e extensão a temperatura de 72°C por 1 minuto e um ciclo a temperatura de 68° C por 5 minutos. Por fim as amostras foram mantidas a -4°C até a preparação do gel. A reação de PCR-RT foi realizada no termociclador da MJ Reserch PTC 200.

Tabela 5: Seqüências dos primers para fibronectina, EDA, EDB e IIICS.

Primer	Sense	Anti-sense	Tamanho do amplicon
¹ Fibronectina	AGAGCAAGCCTGAGCCTGAAG	TCGCCAATCTTGTAGGACTGACC	193 pb
² EDA	CAAACCTGCAGTGACC	CATGAGTCCTGACAC	474pb
² EDB	CATGCTGATCAGAGTTCCTG	GGTGAGTAGCGCACCAAGAG	509pb
² IIICS	GCTACATTATCAAGTATGAG	AATGATGTACTCAGAACTCT	608 pb

¹ JUNG et al, 2009; ² TAN et al, 2004

A analisa da amplificação das amostras foi realizada empregando-se gel de agarose 3% em tampão TBE e brometo de etídeo. Foi aplicado no gel padrão de peso molecular e as amostras diluídas em um corante (DNA loading Dye, Fermentas) na proporção de 1 parte de corante para 3 partes de amostra por poço no gel. A eletroforese foi executada a 100V em tampão TBE pH 8,0, por 1 hora, no sistema de eletroforese da Bio-Rad®.

4.16 Análise de proteínas totais da cultura de estroma medular em gel SDS-PAGE bidimensional (2D)

Após o estabelecimento do estroma medular como descrito no item 4.10, foi realizada a extração de proteínas totais da cultura em placas de 24 poços do 28º e 35º dia de cultivo, para a análise em gel SDS-PAGE bidimensional (2D). Depois de retirado o sobrenadante, cada poço da placa de cultura foi lavado uma vez com tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,8, em seguida foi adicionado 500 µL de tampão de lise (8M de URÉIA, 4% de CHAPS, 40mM de Tris-HCl, 40mM de DTT, 2% de IPG phor 3 a 10 e água bidestilada) e com o auxílio de uma espátula ("scraper") obteve-se o lisado celular. Este lisado foi centrifugado por 40 minutos a 11000rpm 4°C, para sedimentação do *debris* celular e o sobrenadante obtido foi concentrado. Para isto foi realizado um "pool" das amostras obtidas de 5 animais do grupo desnutrido e um "pool" das amostras obtidas de 3 animais do grupo controle, utilizando-se os concentradores (vivaspin 2, GE) de 3 KDa. Após a concentração foi realizado a dosagem de proteínas utilizando o "Kit" comercial BCA da Pierce. Todas as amostras foram processadas em duplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader - Bio-Tek Instrumentals, Inc), em 540nm.

Para a iso-focalização foram utilizadas fitas de gel de poliacrilamida de 18 cm com pH 3 a 10. Estas fitas foram rehidratadas por 18 horas em temperatura ambiente com tampão de rehidratação (7M de uréia, 2M de thiourea, 2% de chaps, 0,5% de tampão IPG e 1M de DTT (Dithiothreitol)) juntamente com 100 µg de amostra, tendo um volume final de 350 µL. A iso-focalização foi realizada no sistema de isofocalização Etan IPGphor (GE-Healthcare®) por 24 horas a 57000 V/h. Em seguida as fitas foram equilibradas por 15 minutos em tampão contendo: 6M de URÉIA, 2% de SDS, 50mM de Tris-HCl pH 8,8, 30% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol e 150 mg de DTT) e por mais 15 minutos em tampão contendo: 6M de URÉIA, 2% de SDS, 50mM de Tris-HCl pH 8,8, 30% de glicerol, 0,01% de azul de bromofenol e 375 mg de iodocetamida. Por fim as fitas foram lavadas com tampão de corrida e colocadas sobre o gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 40%, juntamente com o padrão de peso molecular,

para a eletroforese na segunda dimensão, no sistema Ettan™ Dalt six (GE-Healthcare®), o qual foi submetido a uma corrente elétrica de 600V 30mA por 30 minutos e em seguida 600V 80mA por aproximadamente 5 horas.

4.16.1 Coloração dos géis da eletroforese de 2D por nitrato de prata

Após a eletroforese os géis foram fixados em solução com 50% de metanol, 12% de ácido acético glacial, 0,05% de formaldeído a 37% e água bidestilada, por um minuto em forno de microondas, em seguida ficaram em agitação a temperatura ambiente por cinco minutos. Após a fixação os géis foram lavados em solução de Etanol a 30% por um minuto em forno de microondas e mantidos sob agitação a temperatura ambiente, por cinco minutos. Em seguida, os géis foram sensibilizados por um minuto em forno de microondas com uma solução de tiosulfato 0,02%, depois mantido em agitação a temperatura ambiente por dois minutos. Assim que os géis foram sensibilizados os mesmos foram lavados duas vezes com água destilada em forno de microondas por um minuto e em seguida mantido a temperatura ambiente sob agitação por dois minutos. Os géis foram incubados em solução de nitrato de prata a 0,2% em forno de microondas por um minuto e depois mantido sob agitação a temperatura ambiente por cinco minutos. Em seguida os géis foram lavados uma vez com água destilada em temperatura ambiente por um minuto e foram colocados em uma solução reveladora contendo 6mL de solução tiosulfato de sódio a 0,02%, 3% de carbonato de sódio, 0,05% de formaldeído a 37% e água bidestilada. Por fim a reação foi interrompida com uma solução de bloqueio (50% de metanol, 12% de ácido acético e água bidestilada). Os géis foram imediatamente mantidos em uma bolsa plástica vedada contendo água destilada. As imagens dos géis foram obtidas através do ImageScanner III (GE-Healthcare®) e analisadas no programa ImageMater™ 2D Platinum.

4.17 Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos ao teste de distribuição Gaussiana seguido do teste "t" sendo considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. O programa utilizado foi GraphPad Prism 4®.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação da concentração protéica das rações

A concentração de proteína nas rações controle e hipoprotéica, utilizadas neste projeto, foram determinadas pelo método de micro-Kjedahl. A ração controle apresentou maior quantidade de proteína em relação à ração hipoprotéica, como era esperado, $13,23\% \pm 0,24$ (n=13), $2,75\% \pm 0,11^{***}$ (n=16)¹, respectivamente.

5.2 Avaliação do estado nutricional

Em relação ao consumo de ração foi observado que não houve diferença de consumo entre os grupos (figura 3A). No entanto, o consumo de proteína do grupo desnutrido foi significativamente menor em relação ao grupo controle, uma vez que a ração hipoprotéica, oferecida ao grupo desnutrido, possui apenas 2% de proteína (figura 3B). Contudo o consumo de água do grupo desnutrido foi significativamente maior em relação ao grupo controle (figura 3C).

Verificou-se que os animais do grupo desnutrido apresentaram perda significativa do peso corporal em relação ao grupo controle, $-23,14 \pm 1,649$ (média $\pm$ desvio padrão), enquanto os animais do grupo controle tiveram um ganho de peso de $13,07 \pm 1,500$ (média $\pm$ desvio padrão), durante o mesmo período (figuras 4A e 4B).

Tanto os valores de proteínas totais e a albumina plasmática dos animais do grupo desnutrido foram significativamente menores em relação aos animais do grupo controle (tabela 6).

1

Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. O n indica a quantidade de lotes de ração utilizada nos experimentos. Foram utilizados aproximadamente 90 kg de ração.

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

Figura 3: Consumo de ração, proteína e água avaliados durante o período de 5 semanas do período experimental. **(A):** Consumo de ração dos animais do grupo controle (n=13) e do grupo desnutrido (n=19). **(B):** Consumo de proteína dos animais do grupo controle (n=13) e do grupo desnutrido (n=19). **(C):** Consumo de água do grupo controle (n= 7) e do grupo desnutrido (n=10). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

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

A **B****% da Variação da massa Corporal Final**

Figura 4 (A): A variação da massa corporal realizada durante o período de 5 semanas de indução a desnutrição. **(B):** Porcentagem da variação da massa corporal realizada durante o período de 5 semanas de indução a desnutrição a cada 48 horas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Grupo controle (n=13) e grupo desnutrido (n=19). O n indica o número de animais utilizados no experimento.

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

Tabela 6: Concentração plasmática das proteínas totais (g/dL) e albumina (g/dL),

Parâmetros	Controle (n=15)	Desnutrido (n=24)
Proteína Plasmática (g/dL)	4,15±0,21	3,50±0,14 *
Albumina plasmática (g/dL)	2,04±0,23	1,34±0,11 **

Valores das concentrações plasmática das proteínas totais (g/dL) e albumina (g/dL), dos animais do grupo controle (n=15) e dos animais do grupo desnutrido (n=24). Os resultados estão expressos por média ± desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

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

**p<0,01 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

5.3 Determinação de sódio e potássio

Não foi observada diferença significativa na concentração de sódio e potássio entre os animais do grupo controle e do grupo desnutrido (tabela 7).

Tabela 7: Concentração de sódio (mmol/L) e potássio (mmol/L).

Parâmetros	Controle (n=7)	Desnutrido (n=11)
Sódio (mmol/L)	136,70±2,72	141,0 ± 2,17
Potássio (mmol/L)	4,33±0,12	4,32 ± 0,21

5.4 Avaliação hematológica

5.4.1 Eritrograma

Os animais do grupo desnutrido apresentaram redução significativa do número de hemácias, porcentagem de reticulócitos, concentração de hemoglobina e valor do hematócrito quando comparados aos animais do grupo controle, caracterizando assim, um quadro de anemia. Quanto aos índices hematimétricos não houve diferença entre os grupos controle e desnutrido com exceção apenas do VCM (volume corpuscular médio) (Tabela 8).

5.4.2 Leucograma

Os animais do grupo desnutrido apresentaram leucopenia significativa quando comparado com os animais do grupo controle. Verificou-se neutrofilia e linfocitopenia significativa nos animais do grupo desnutrido em relação ao grupo controle, porém o número absoluto de eosinófilos permaneceu inalterado tanto nos animais do grupo controle quanto nos animais do grupo desnutrido. Monócitos e basófilos foram raramente encontrados nos animais de ambos os grupos (tabela 9).

Tabela 8: Parâmetros do eritrograma e índices hematimétricos

Parâmetros	Controle (n=10)	Desnutrido (n=13)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,26±0,20	7,80±0,34**
Hemoglobina (g/dL)	12,76±0,23	10,98±0,31***
Hematócrito (%)	42,80±1,35	37,88±1,20**
Reticulócitos (%)	7,31±0,57	4,75±0,52**
VCM (fL)	43,60±0,27	42,15±0,27**
HCM (pg)	14,03±0,18	13,65±0,09
CHCM (%)	31,30±0,47	31,63±0,12

Valores referentes aos parâmetros do eritrograma e índices hematimétricos dos animais do grupo controle e dos animais do grupo desnutrido. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média), CHCM (concentração da hemoglobina corpuscular média).

**p < 0,01 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

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

Tabela 9: Resultados do número total de leucócitos e das diferentes populações leucocitárias (neutrófilos segmentados, linfócitos, eosinófilos).

Parâmetros	Controle (n=7)	Desnutrido (n=8)
Leucócitos (/mm ³)	3,22±0,35	1,80±0,43*
Neutrófilos Segmentados (/mm ³)	254,7±39,30	141,8±25,29*
Linfócitos (/mm ³)	2471±332,8	1129±180,1 **
Eosinófilos (/mm ³)	22,57±8,81	16,38±6,38

Parâmetros leucocitários: Valores totais de leucócitos e valores absolutos de neutrófilos segmentados, linfócitos, eosinófilos, expressos em células/mm³, dos animais dos grupos controle e animais do grupo desnutrido. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

**p<0,01 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

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

5.5 Células totais da medula óssea e mielograma

Verificou-se redução significativa da celularidade da medula óssea dos animais do grupo desnutrido em relação aos animais grupo controle (figura 5), indicando um quadro de hipoplasia medular. Em relação à análise diferencial das células da medula óssea os animais desnutridos apresentaram uma menor quantidade de células imaturas/jovens e neutrófilos segmentado quando comparado aos animais controle, no entanto os animais desnutridos não apresentaram diferença significativa em relação aos outros tipos celulares (tabela 10).

Figura 5: Celularidade da medula óssea em $\times 10^6$ células/mL dos animais do grupo controle (n=11) e dos animais do grupo desnutrido (n=13). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. O N indica o número de animais utilizados no experimento.

** $p < 0,01$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle.

Tabela 10: Valores referentes a diferenciação dos tipos celulares presentes na medula óssea

Tipo celular	Controle (n=6) (10 ⁶ /mm ³)	Desnutrido (n=7) (10 ⁶ /mm ³)
Blastos	0,24±0,10	0,14±0,08
Formas imaturas/jovens	3,61±0,60	1,54±0,34*
Formas em anel	5,99±0,78	3,62±0,84
Neutrófilos segmentados	14,15±2,56	6,80±1,56*
Eosinófilos	0,21±0,098	0,18±0,09
Linfócitos	7,02±1,83	3,33±0,77
Mono-macrófagos	0,020±0,14	0,17±0,08
Plasmócitos	0,10±0,06	0,07±0,04
Proeritroblastos	0,07±0,04	0,25±0,09
Eritroblastos Basófilos	1,69±0,54	1,27±0,36
Eritroblastos Policromáticos	5,69±0,9	3,33±1,05
Relações		
Relação Granulo/Eritróide	3,44±0,80	2,74±0,42
Relação Granulo/Linfóide	4,66±0,91	3,71±0,72
Relação Linfo/Eritróide	0,82±0,14	0,83±0,13

Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento.

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

5.6 Avaliação do estabelecimento do estroma medular: culturas de longa duração

O estabelecimento do estroma medular foi semi-quantificado utilizando-se um sistema de escore conforme o item 4.9 (ver tabela 4). No 3º dia de cultivo foram visualizadas abundantes células hematopoiéticas mortas, presença de poucas células fibroblastoides. No 7º dia cultivo havia um menor número de células hematopoiéticas mortas, sendo visualizadas freqüentes células fibroblastoides. No 14º dia de cultivo foram visualizadas numerosas células fibroblastoides, sendo possível verificar-se o aparecimento de áreas de confluência e ainda, foram visualizados também poucos adipocitos like. Importante ressaltar que estas células não são visualizadas no 3º e 7º dia. No 21º dia de cultivo foram visualizadas abundantes células fibroblastoides, aumento da freqüência de adipocitos like e aumento das áreas de confluência. No 28º e 35º dias de cultivo foram visualizados abundantes células fibroblastoides e adipocitos like e aumento das áreas de confluência. As células hematopoiéticas foram morrendo o longo do tempo, mas permaneceram, em pequeno número, até o 28º e 35º dia. Foi observado que o conteúdo lipídico dos adipocitos like aumentava ao longo do tempo, de tal maneira que iniciavam como pequenas gotículas e estas aumentavam o seu tamanho e coalesceram; constituindo uma única gotícula que preenchia todo o citoplasma das células. Nesta fase estas células não permaneciam mais aderidas à placa (figuras 6 e 7).

Não houve diferença quantitativa dos adipocitos like. No entanto foi observada uma menor quantidade, significativa, das células fibroblastoides no 7º e 14º dias de cultivo, do grupo desnutrido em relação ao grupo controle, mas esta diferença não ocorreu nos demais dias de cultivo (figuras 8A e 8B). Foi observada uma menor confluência do estroma medular das culturas de longa duração do 28º e 35º dia de cultivo do grupo desnutrido em relação o grupo controle (figura 8C).

Figura 6: Fotomicrografia do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração. Objetiva de 10x. (A1 e B1) 3º dia de cultivo do grupo controle e grupo desnutrido respectivamente. (A2 e B2) 7º dia de cultivo do grupo controle e grupo desnutrido respectivamente. (A3 e B3) 14º dia de cultivo do grupo controle e grupo desnutrido respectivamente. Setas vermelhas indicam os adipócitos like, setas pretas indicam as células fibroblastoides.

Figura 7: Fotomicrografia do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração. Objetiva de 10x. (A4 e B4) 21º dia de cultivo do grupo controle e grupo desnutrido respectivamente. (A5 e B5) 28º dia de cultivo do grupo controle e grupo desnutrido respectivamente. (A6 e B6) 35º dia de cultivo do grupo controle e grupo desnutrido respectivamente. Setas vermelhas indicam os adipócitos like, setas pretas indicam as células fibroblastoides.

Figura 8: Análise do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração pelo sistema de escore. **(A):** Escore das células fobroblastoides. **(B):** Escore dos adipócitos like. **(C):** Confluência das células durante o estabelecimento do estroma medular. Grupo controle (n=12) e grupo desnutrido (n=12). Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. O N indica o número de animais utilizados no experimento.

**p<0,01 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle

5.7 Determinação de fibronectina presente na cultura de longa duração de células da medula óssea por "Western blotting"

As amostras do extrato celular obtido de acordo com os itens 4.10 foram utilizadas para a determinação da fibronectina total e da região EDA.

O extrato celular das culturas de longa duração de 28º dia dos animais do grupo desnutrido apresentou aumento significativo na quantidade de fibronectina total em relação aos animais do grupo controle do mesmo período. No entanto no 35º dia os animais do grupo desnutrido apresentaram uma menor quantidade de fibronectina total em relação aos animais do grupo controle do mesmo período. Também foi observada diferença significativa no 28º e 35º dias entre os animais do grupo desnutrido, ou seja, os animais do grupo desnutrido do 35º dia apresentaram menor quantidade de fibronectina total em relação aos animais do grupo desnutrido do 28º dia (figura 9A1 e 9A2).

Em relação à região EDA os animais do grupo desnutrido tanto do 28º dia quanto no 35º dia apresentaram menor quantidade da região EDA quando comparados aos animais do grupo controle do 28º e 35º dias (figura 9B1 e 9B2).

5.8 Avaliação da fibronectina presente na cultura de longa duração de células da medula óssea por imunocitoquímica

As culturas de longa duração dos animais desnutridos do 28º dia apresentaram maior quantidade de fibronectina total quando comparados com os animais do grupo controle (figuras 10A, 10B, 10C e 10D).

Figura 9: Determinação da fibronectina total e região EDA em culturas de longa duração das células da medula óssea de 28 e 35 dias. **(A1 e A2):** Quantificação da fibronectina total do grupo controle de 28 dias (n=7) e 35 dias (n=7), o grupo desnutrido de 28 dias (n=9) e 35 dias (n=8). **(B1 e B2):** Quantificação da região EDA do grupo controle de 28 e 35 dias (n=4) e o grupo desnutrido de 28 e 35 dias (n=4). Os resultados estão expressos por média $\pm$ desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. C= grupo Controle, D=grupo Desnutrido

* $p < 0,05$ quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle

** $p < 0,01$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle

Figura 10: Marcação de fibronectina total por imunocitoquímica das culturas de longa duração das células da medula óssea de 28 dias. Objetiva de 20X. **(A):** Cultura de células oriundas de animais controle, controle negativo da reação. **(B):** Cultura de células oriundas de animais controle, reação positiva. **(C):** Cultura de células oriundas de animais desnutridos, controle negativo da reação. **(D):** Cultura células oriundas de animais desnutridos, reação positiva.

5.9 Pesquisa da fibronectina e suas isoformas

Através da análise do RT-PCR foi observado que tanto os animais do grupo controle quanto os animais do grupo desnutrido apresentaram RNAm para a fibronectina (figura 11A). Em relação a região EDA foi observado que ambos os grupos apresentaram RNAm para a expressão de fibronectina com a presença ou a ausência da região EDA, no entanto os animais do grupo desnutrido apresentaram uma banda de amplificação com uma menor intensidade na região EDA (+) quando comparados aos animais do grupo controle (figura 11B). Assim como a região EDA, também foi observado que tanto os animais do grupo controle quanto do grupo desnutrido apresentaram RNAm para a expressão de fibronectina com a presença ou a ausência da região EDB (figura 11D). Também foi observada a presença das três variantes da região IIIICS em ambos os grupos, porém a banda de amplificação referente a variante 0 tem uma menor intensidade nos dois grupos quando comparada as outras duas bandas da região IIIICS (figura 11C).

Figura 11: Pesquisa de isoformas da fibronectina pelo RT-PCR das culturas de longa duração do 28º dia. **(A):** RNAm da fibronectina total. **(B)** RNAm da região EDA, onde EDA (+) refere-se a presença da região e EDA (-) a ausência da região. **(C)** Variantes da região IIIICS, onde (120) refere-se a presença completa da região, (95) a inclusão parcial da região e (0) a exclusão total da região. **(D)** RNAm da região EDB, onde EDB (+) refere-se a presença da região e EDB (-) a ausência da região. (C) animais controle, (D) animais desnutridos. O número de animais utilizados para este experimento foi de n=3 para o grupo controle e n=4 para o grupo desnutrido.

5.10 Análise eletroforética bidimensional das proteínas obtidas do estroma medular das culturas de longa duração

Para análise das proteínas presentes no estroma medular foi realizado a eletroforese bidimensional de acordo com o item 4.14 e 4.15, do 28º e 35º dia após plaqueamento de células obtidas da medula óssea do grupo controle e o grupo desnutrido. A quantidade de proteína utilizada foi padronizada para 100µg para todos os grupos e dias analisados. Não foi possível fazer uma análise estatística dos "spots" detectado pelo programa ImageMater™ 2D Platinum, para análise comparativa do perfil protéico do grupo controle em relação ao grupo desnutrido, uma vez que para tal procedimento, necessita-se de, pelo menos, analisar-se três géis de cada grupo e dias analisados.

Até o momento foi possível a realização da análise dos eletroforetogramas bidimensional (2D) do estroma medular das culturas de longa duração do 28º e 35º dia do grupo controle e do grupo desnutrido. Seleccionamos regiões onde havia diferenças de intensidade dos "spots", comparando os grupos, representados por gráficos em terceira dimensão. Estão representados nas figuras 12A e 13A o eletroforetograma bidimensional do estroma medular da cultura de longa duração do 28º e 35º dia respectivamente do grupo controle e do grupo desnutrido. Nas figuras 12B e 13B estão representados em terceira dimensão regiões que apresentam alterações de intensidade dos "spots", comparando o grupo controle com o grupo desnutrido.

Como um resultado preliminar, foi observado na eletroforese em duas dimensões um perfil protéico diferente do grupo controle em relação ao grupo desnutrido, tanto no 28º e 35º dia.

Figura 12: (A): Eletroforetograma bidimensional (2D) de 100 μ g de proteína presente no estroma medular de culturas de longa duração do 28^o dia, do grupo controle e o grupo desnutrido. **(B)** estão representados em terceira dimensão (3D) regiões que apresentam diferença na intensidade dos spots do grupo controle e grupo desnutrido.

Figura 13: (A): Eletroforetograma bidimensional (2D) de 100µg de proteína presente no estroma medular de culturas de longa duração do 35º dia, do grupo controle e o grupo desnutrido. (B): estão representados em terceira dimensão (3D) regiões que apresentam diferença na intensidade dos spots do grupo controle e grupo desnutrido.

6.0 DISCUSSÃO

Os animais do grupo desnutrido responderam à desnutrição no período de 5 semanas. Embora os animais do grupo desnutrido tenham consumido quantidades equivalentes de ração, a quantidade de proteína consumida foi significativamente menor uma vez que a ração oferecida aos animais do grupo desnutrido continha apenas 2% de proteína. Porém dados da literatura são conflitantes em relação ao consumo de ração em dietas hipoprotéicas, sendo verificado tanto aumento (COLOMBO *et al*, 1992; DESCHEPPER e DEGROOTE, 1995; WHITE *et al*, 1998) quanto diminuição do consumo (BECK *et al*, 1989; MERCER *et al*, 1994). Segundo os autores Huang e Fraker (2003), camundongos adultos jovens são capazes de se adaptar à desnutrição crônica causada por restrição protéica moderada. Isso aconteceria devido a um mecanismo no qual há um aumento da absorção de aminoácidos provenientes da dieta e aumento da reabsorção de aminoácidos endógenos provenientes do maior catabolismo protéico em decorrência da diminuição de proteína na ração. Os animais desnutridos apresentaram maior consumo de água em relação aos animais controle este fato poderia ser devido a decorrência da depleção das reservas de glicogênio, visto que cada molécula desse carboidrato é armazenada juntamente com 4 moléculas de água (ZIEGLER; FILER, 1996) e não devido a um desequilíbrio eletrolítico, pois os animais do grupo desnutrido não apresentaram alterações nas concentrações de sódio e potássio.

O quadro de desnutrição dos animais do grupo desnutrido foi confirmado pela redução da massa corpórea, de proteínas e albumina plasmáticas. Dados da literatura relatam que em humanos e animais desnutridos há uma redução da massa corpórea e diminuição de albumina plasmática que pode ser um indicador bioquímico de desnutrição (WEIDEL *et al*, 1993; FONTOURA *et al*, 2006; SUGIYAMA *et al*, 2011)

Conforme já observado em trabalhos anteriores do grupo, a desnutrição ocasionou quadro de hipoplasia medular (BORELLI *et al*, 1995, 1998, 2001, BARON, 1997) com a diminuição significativa das células imaturas, uma diminuição embora não significativa da linhagem granulocítica, linfócitos, também foi observado neste trabalho um aumento dos proeritroblastos com diminuição dos eritroblastos basófilos e

policromáticos embora não significativo, no entanto foi possível observar no sangue periférico alterações nos parâmetros do eritrograma e leucograma refletindo assim em anemia e leucopenia. Tendo em vista que o tecido hematopoiético apresenta uma alta taxa de renovação celular, a ausência ou diminuição de proteínas poderia levar a um comprometimento do tecido hematopoiético (BARON, 1997; BORELLI *et al.*, 1995, 2007), uma vez que este nutriente é essencial para os processos fisiológicos das células. Nossa hipótese é de que a desnutrição protéica ocasione alterações na MEC da medula óssea, alterando as relações célula-célula e célula-MEC e com isso, modifique a proliferação, diferenciação e maturação das células hematopoiéticas e estromais.

As culturas de células estromais oriundas de animais desnutridos apresentaram menor confluência no estabelecimento do estroma medular nas culturas de longa duração tanto no 28º dia quanto no 35º de cultura. Resultados anteriores demonstram que o estroma medular estabelecido por meio das culturas de longa duração dos animais desnutridos não é capaz de manter a hematopoese quando comparados aos animais do grupo controle (XAVIER, *et al.*, 2007). Podemos observar então que as alterações encontradas *in vitro* reproduzem as encontradas *in vivo* e as possíveis alterações das células estromais, devido à desnutrição protéica, poderiam ainda permanecer mesmo *in vitro*.

O modelo ora proposto também reproduziu, *in vitro*, os dados obtidos *in vivo* (VITURI, *et al.*, 2000;), demonstrando que a MEC da medula óssea de animais desnutridos apresenta maior quantidade de fibronectina nas culturas de longa duração do 28º dia. Dados da literatura relatam que crianças desnutridas apresentaram alterações no microambiente do timo e dentre estas o aumento da fibronectina e outras proteínas da MEC (LYRA *et al.*, 1993; SAVINO *et al.*, 2007). Porém no 35º dia de cultura foi observada uma diminuição significativa da fibronectina total dos animais desnutridos. Esta diminuição poderia ser devido a menor produção da fibronectina e ou a degradação por metalaproteínas e outras proteases ou ainda a fibronectina pode ser endocitada e degradada, isto ocorre quando há uma diminuição da polimerização da fibronectina devido a uma redução da expressão ou atividade das integrinas, podendo estas também ser endocitadas, ou quando há diminuição da produção de fibronectina ou aumento da

proteólise (SOTTILE & CHANDLER, 2005; SHI & SOTTILE, 2008). Todos estes processos citados ocorrem no remodelamento da MEC que consiste nos processos de síntese, deposição e degradação. O remodelamento ocorre durante o desenvolvimento, reparação tecidual e em alguns processos patológicos tais como arteriosclerose. Durante a reparação tecidual a deposição da MEC promove a integridade do tecido e sua funcionalidade, sendo que uma deposição inapropriada ou excessiva leva a um comprometimento da função do órgão (SOTTILE & CHANDLER, 2005).

Apesar do aumento da produção de fibronectina no 28º e no 35º dia das culturas de longa duração observou-se diminuição de moléculas de fibronectina com a região EDA nos animais desnutridos quando comparados aos animais controles, o qual pode ser resultante de splicing alternativo na molécula da fibronectina. O splicing alterantivo pode ocorrer durante o desenvolvimento e pode re-estabelecer durante a vida adulta em casos de reparação tecidual, fibrose e angiogenese (WHITE *et al*, 2008).

Por meio da análise do RT-PCR foi observado que as células estromais das culturas de longa duração, possuem RNAm para fibronectina com a ausência e a presença das regiões EDA e EDB e a presença das três variantes da região IIICS, ou seja, o estroma medular possui mais de uma isoforma de fibronectina. De fato, a expressão das isoformas de fibronectina pode variar de acordo com o órgão e/ou tecido e também em relação à idade do indivíduo (CHAUHAN *et al*, 2003), sendo que cada isoforma apresenta uma função diferente. No entanto não foi possível quantificar o RNAm estas regiões de splicing alternativo, pois a metodologia desenvolvida para a pesquisa das isoformas de fibronectina apenas permitiu a análise qualitativa. Em estudos futuros será realizado Real time PCR para quantificar as isoformas identificadas, contribuindo assim para a melhor compreensão das funções de cada isoforma presente no estroma medular. Também não foi possível fazer uma análise do RNAm de fibronectina da cultura de 35º dias devido ao pequeno número de amostras.

Desta forma as diferentes isoformas de fibronectina presente no estroma medular dos animais desnutridos podem apresentar menor interação com as integrinas, pois aos animais do grupo desnutrido apresentaram uma menor quantidade da região EDA. Considerando que a mesma liga-se a integrina VLA4 - o qual não foi observado alterações

quantitativas nos animais desnutridos (NAKAJIMA, 2010)- e que esta interação é importante para algumas funções celulares como proliferação, migração e apoptose (WHITE *et al*, 2008; CHAUHAN *et al*, 2005), essa alteração poderia comprometer a hematopoese em condições de desnutrição proteica. Dados na literatura demonstram que a fibronectina com a presença da região EDA pode modular a progressão do ciclo celular (MANABE *et al*, 1999), o que poderia explicar o aumento da quiescência das células tronco/progenitoras hematopoéticas que conduz a uma hipoplasia medular nos animais desnutridos.

Em trabalhos anteriores do grupo demonstram maior expressão de VLA-5 nas células tronco/progenitoras hematopoéticas de animais desnutridos (NAKAJIMA, 2010), esta integrina interage com a fibronectina por meio do sítio RDG e esta interação ligante/integrina é fundamental para a polimerização da fibronectina e conseqüentemente a interação com as outras proteínas da MEC (MAO & SCHWARZBAUER, 2005; SINGH *et al*, 2010), conduzindo assim a vários processos celulares. Nossa hipótese é que a interação ligante/integrina pode estar alterada e o aumento da expressão da integrina VLA-5 talvez pudesse ser uma forma de adaptação de o sistema reverter a quiescência celular que está aumentada nos animais desnutridos. Isso porque quando as células tronco/progenitoras hematopoéticas dos animais desnutrido foram plaqueadas em uma matriz integra de fibronectina, estas células responderam de forma adequada, uma vez que estas proliferam de forma similar às células dos animais controles.

Na análise bidimensional das culturas de longa duração do 28º dia e 35º dia, foi possível observar diferença do perfil protéico entre os grupos e entre os dias analisados. No 28º dia de culturas os animais do grupo desnutrido não sintetizaram algumas proteínas da MEC e aparentemente diminuíram a síntese de outras proteínas que os animais do grupo controle sintetizaram. Assim como no 28º dia, foi observado no 35º dia de cultura que os animais do grupo desnutrido não sintetizaram algumas proteínas e diminuíram a síntese de outras proteínas que os animais do grupo controle sintetizaram, mas os animais desnutridos também sintetizam proteínas que os animais do grupo controle não sintetizam. Esta diferença pode ser devido a uma alteração de

síntese e ou degradação das proteínas de matriz extracelular. Dados de trabalhos anteriores do nosso grupo revelam que os animais desnutridos apresentam aumento não só de fibronectina na matriz extracelular medular, como também aumento de laminina e trombospondina (VITURI, *et al.*, 2000, 2005; XAVIER, *et al.*, 2007). Em experimentos futuros serão realizados o seqüenciamento das proteínas presentes no gel bidimensional das culturas de longa duração, para identificação das proteínas da matriz extracelular e também a investigação da presença de metalaproteinases que estão envolvidas com o remodelamento da matriz, bem como os inibidores de metalaproteinases.

7.0 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstram que a ração hipoprotéica oferecida aos animais foi eficiente na indução do quadro de desnutrição, causando alterações na celularidade e na MEC da medula óssea.

As células estromais das culturas de longa duração possuem diferentes isorformas de fibronectina, e estas refletem em alterações na interação célula/MEC, conseqüentemente levando a alterações observadas no ciclo celular das células tronco/progenitoras hematopoéticas nos animais desnutrido. Contudo esta alteração da interação célula/MEC pode estar envolvida também com a regulação do remodelamento da MEC, ou seja, secreção, deposição e degradação. Talvez isto poderia explicar a diminuição da região EDA na molécula de fibronectina, as alterações quantitativas da fibronectina nos animais desnutridos e a diferença do perfil proteômico entre os grupos e dias analisados.

Investigações futuras na quantificação das regiões de *splicing* alternativo da fibronectina, o sequenciamento das proteínas da MEC e a identificação da possível presença de metalaproteínases no estroma medular irá auxiliar na elucidação da participação da fibronectina e outras proteínas da matriz, bem como o remodelamento na manutenção do microambiente hematopoético.

8.0 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ABBOUD, C. N.; LICHTMAN, M. A. Structure of the marrow and the hematopoietic microenvironment. In: **Williams Hematology**. McGraw Hill. 6th ed., p.29-43, 2001.
- AKNER, G.; CEDERHOLM, T. Treatment of protein-energy malnutrition in chronic nonmalignant disorders. **Am. J. Clin. Nutr.** v.74, p.6-24, 2001.
- AUGUSTO, ALP. Avaliação nutricional. In: AUGUSTO, ALP. *et al.* **Terapia nutricional**. São Paulo: Editora Atheneu, 1995. p. 28-37.
- AXELLSON, I.; PITA, J. C.; HOWELL, D.S.; LORENTZON, R.; BERNANI, I.; BOQUIST, L. Kinetics of proteoglycans and cells in growth plate of normal, diabetic, and malnourished rats. **Pediatr. Res.**, Baltimore, v.27, p.41-44, 1990.
- BARON, RB. Desnutrição protéico-calórica. In BENNETT, JC; PLUM, F. Cecil **tratado de medicina interna**. v.1, 20^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan., p. 1273-1277, 1997
- BAUER, J.; CAPRA, S.; FERGUSON, M. Use of the scored patient-generated subjective global assessment (PG-SGA) as nutrition assessment toll in patients with cancer. **European J. Clin. Nutr.** V.56, p. 779-785, 2002.
- BECKER PS; NILSSON SK; LI Z; BERRIOS V; DOONER MS; COOPER CL; HSIEH CC; QUESEMBERRY PJ. Adhesion receptor by hematopoietic cell lines and murine progenitors: modulation by cytokines and cell cycle status. **Experimentaol Hematology**, v. 27, p. 533-541, 1999.
- BERKOWITZ, F. E. Infections in children with severe protein-eenergy malnutrition. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v.11, p.750-9, 1992.
- BORELLI, P; MARIANO, M; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and cell mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutrition research**, 15(10): 1477-85, 1995.
- BORELLI, P.; NARDINELLI, L. Protein calorie-malnutrition a decreased in the macrophage's respiratory burst capacity. **Rev Bras. Cienc. Farm.**; São Paulo, v.37, p.51-60, 2001
- BORELLI, P.; BLATT, S. L.; ROGERO, M. M. FOCK, R. A. Haematological alterations in protein malnutrition. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** [online]. 2004, vol. 26, no. 12008-11-05], pp. 49-56.
- BORELLI, P.; FOCK, R. A.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; BEUTLER, B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G. Effect of protein deprivation on erythropoiesis. **British J. Nutr.**, 2007.
- BORELLI, P.; BARROS, F.E.V.; NAKAJIMA, K.; BLATT, S.L.; PEREIRA, J.; TSUJITA, M. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Braz J Med Biol Res**, Ribeirão Preto, v. 42, n. 6, June 2009.
- BORGES, L. R.; PAIVA, S. I.; SILVEIRA, D. H.; ASSUNÇÃO, M. C. F.; GONZALEZ, M. C. Can nutritional status influence the quality of life of câncer patients? **Rev. Nutr.** V. 23, p.745-753, 2010.
- BRACH, M. A.; HERRMANN, F. Hematopoietic growth factors: interactions and regulation of production. **Acta Haematol.** v.86, p.128-37, 1991.
- BRENMOEHL, J.; LANG, M.; HAUSMANN, M.; LEEB, S. N.; FALK, W.; SCHÖLMERICH, J.; GÖKE, M.; ROGLER, G. Evidence for a differential expression of fibronectin splice forms ED-A and ED-B in Crohn's disease (CD) mucosa. **Int. J. Colorectal. Dis.** v. 22, p. 611-623, 2007.

BRENMOEHL, J.; FALK, W.; GÖKE, M.; SCHÖLMERICH, J.; ROGLER, G. Inflammation modulates fibronectin isoform expression in colonic lamina propria fibroblasts (CLPF). **Int. J. Colorectal. Dis.** V. 23, p. 947-955, 2008.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. **Am J Patol** 1949; 19.

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

CHANDRA, R. K. Lymphocytes subpopulations in human malnutrition citotoxic and supressor cells. **Pediatrics**, v.50, p. 423-427, 1977.

CHANDRA, R. K. Nutritional regulation of immunity: an introduction. In: **Nutrit and Immun.** Alan R Liss, Inc. p. 1-8, 1988 CHANDRA, R. K. Immunocompetence in undernutrition and overnutrition. **Nutr Rev New York**; 39(6): 225, 1991

CHAUHAN, A. K., IACONCIG, A., BARALLE, F. E., MURO, A. F. Alternative splicing of fibronectin: a mouse model demonstrates the identity of in vitro and in vivo systems and the processing autonomy of regulated exons in adult mice. **Gene.** v. 324, p.55-63, 2003.

CHAUHAN, A. K.; MORETTI, F. A.; IACONCIG, A.; BARALLE, F. E.; MURO, A. F. Impaired motor coordination in mice lacking the EDA exon of the fibronectin gene. **Behavioural Brain Reseach** v. 161, p. 31-38, 2005.

COLOMBO, JP; CERVANTES, H; KOKOROVIC, M; PFISER, U; PERRIATZ, R. Effects of dietary protein on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rats. **Ann. Nutr. & Metabol.** v. 36, p. 23-33, 1992.

COTRAN, R. S; KUMAR, V; ROBBINS, SL. Environmental and nutrition disease. In: **Pathologic basis of the disease**, 5ed, WB Saunders, p. 403-57, 2000.

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

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

DESCHÉPPER, K & DEGROOTE, G. Effects of dietary protein, essential and non-essential amino acids on the performance and carcass composition of male broiler chickens. **British. Poult. Sci.** v. 36, p. 229-245, 1995.

DEXTER, T.M.; ALLEN, T.D.; LAJTHA, L.G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. **J. Physiol.**; 91:335-344, 1977

DOUMAS BT, WATSON WA, BIGGS HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clin Chem Acta.** V. 31(1), p. 87-96, 1971.

DOMENECH, J.; GIHANA, E.; DAYAN, A.; TRUGLIO, D.; LINASSIER, C.; DESBOIS, I.; LAMAGNERÉ, J. P.; COLOMBAT, P.; BINET, C. Haemopoiesis of transplanted patients with autologous marrows assessed by long-term marrow culture. **Br. J. Haematology**, v. 88, p. 488-496, 2004.

DU, F; HIGGINBOTHAN, A; WHITE, BD. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. **J. Nutr.** v, 130, p. 514-52, 2000.

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

EZOE, S.; MATSUMURA, I.; SATOH, Y.; TANAKA, H.; KANAKURA, Y. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. **Cell Cycle** 3:3, p 314-318, 2004.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2004.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION: More people than ever are victims of hunger, 2009.

¹FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION: Global hunger declining, but still unacceptably high, 2010.

²FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The state of food insecurity in the world: Addressing food insecurity in protracted crises, 2010.

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

FONTOURA, C. S. M.; CRUZ, D. O.; LONDERO, L. G.; VIEIRA, R. M. Avaliação nutricional de paciente critio. *Resv. Br. Terapia Intensiva*. v. 18,p.298-306, 2006.

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

GIET O; HUYGEN S; BEGUIN Y; GOTHOT A. Cell cycle activation of hematopoietic progenitors cells increases very late antigen-5 - mediated adhesion to fibronectin. *Experimentol Hematology*. v 29, p. 515-524, 2001.

GIET O; BOCKSTAELE DRV; STEPHANO ID; HUYGEN S; GREIMERS R; BEGUIN Y; GOTHOT A. Incresed binding and defective migration across fibronectin of cycling hematopoietic progenitors cells. *Blood*. v. 99, p. 2023-2031, 2002.

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

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

GROVER, Z.; Ee, L. C. Protein energy malnutrition. *Pediatr Clin N Am*. V.56, p.1055-1068, 2009.

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

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

HUANG LZ; FRAKER PJ. Chonical consumption of a moderately low protein diet does not alter hematopoietic processes in young adult mices. *J. Nutr*. v.133, p. 1403-1408, 2003

IBGE. PESQUISA DE ORÇAMENTO FAMILIAR 2008-2009. Antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil: Desnutrição cai e peso das crianças brasileiras ultrapassa padrão internacional, 2010. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_impressao.php?id_noticia=1699

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

JUNG, D. H; KIM, Y. S; KIM, J. S. KIOM-79 S100b-induced TGF- β 1 and fibronectin expression in mouse mesangial celss. *J. Ethnopharmacology*, v .125, p.374-379, 2009.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage ϕ 4. *Nature*, v. 277, p. 680-685, 1970.

LEE, GR; HERBERT, V. Nutritional factors in the production and function of erythrocytes. In: LEE, GR et al. **Wintrobe's clinical hematology**, v. 1, 10ª ed, Williams & Wilkins, 1999. p. 228-266.

LEISS, M; BECKMANN, K; GIRÓS, A; COSTELL, M; FASSLER, R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Cur. Opin. Cell Biol*. V20, p 502-507, 2008.

LYRA, J. S., MADI, K., MAEDA, C. T., SAVINO, W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J. Pathol*. V. 171, p. 231-236, 1993.

LOO, V. A. N.; DER, J. C; XIAO X; MACMILLIN, D; HASHINO, K; KATO, I; WILLIAMS D. A. VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. **J Clin Invest** 102: 1051, 1998.

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

KLEIN, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. **Experientia. Basel**, v.51, p.914-926, 1995.

MANBE, R.; NAKO, O.; SEKIGUCHI, K. Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction. **J. Biol. Chem.** v. 274, p. 5919-5924, 1999.

MAO, Y; SCHWARZBAUER, JE. Fibronectin fibrillogenesis, a cell-mediated matrix assembly process. **Matrix Biology**. V24: 389-399. 2005

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

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

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

MERCER LP; KELLEY, DS; HUMPHRIES LL; DUNN, JD. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. **J. Nutr.**, v. 124, p. 1029-1036, 1994.

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

NAKAJIMA, K. Avaliação do ciclo celular de células tronco/Progenitoras hemopoéticas da medula óssea de camundongos submetidos á desnutrição protéica. São Paulo, 2010, 170 p. 616.15 CDD (N163a)

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

NORMAN, K.; PICHARD, C.; LOCHS, H.; PIRLICH, M.; Prognostic impact of disease-related malnutrition. **Clinical Nutrition**. V. 27, p. 5-15, 2008.

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

OLSON, R. F. Introductory remarks: nutrient, hormone, enzyme interactions. **Am J Clin Nutr.** Jun;28 (6). P. 626-37, 1975

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

PANKOV, R., YAMANDA, K. M. Fibronectin at a glance. **J. Cell. Sci.** v. 115, p. 3861-3863, 2002.

PROSPER F; STRONCEK D; MCCARTHY JB; VERFAILLIE CM Mobilization and homing of peripheral blood progenitors is related to reversible downregulation of α 41 integrin expression and function. **J Clin Invest**, v. 101: 2456. , 1998.

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

- REYNOLDS, J.V.; REDMOND HP; UENO N; STEIGMAN C; ZIEGLER MM; DALY JM; JONHSTON RB Jr. Impairment of macrophage activation and granuloma formation by protein deprivation in mice. **Cell Immunol.** Feb;139(2). p. 493-504, 1992
- RIOS, M.; WILLIAMS, D. A. Systematic analysis of the ability of stromal cell lines derived from different murine adult tissues to support maintenance of hematopoietic stem cells in vitro. **J. Cell Physiol.** v.145, p.434-43, 1990.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudos de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**, v. 20, p.315-28, 1947.
- RUOSLAHTI, E. Fibronectin and its receptors. **Ann. Rev. Biochem**, v. 57, p. 375 - 413, 1988.
- SAITO, S.; YAMAJI, N.; YASUNAGA, K.; SAITO, T.; MATSUMATO, S.; KATOH, M.; KABAYASHI, S.; MASUHO, Y. The fibronectin extra domain A activates matrix metalloproteinase gene expression by an interleukin-1-dependent mechanism. **The Am. Society for Biochemistry and Molecular Biology.** V.274, p. 30759-30763, 1999
- SAVINO, W.; DARDENNE, M.; VELLOSO, L. A.; BARBOSA, S. D. S. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **BR. J Nutr.** v. 98, p.11- 16, 2007.
- SAWAYA, A. L. Malnutrition: longterm consequences and nutritional recovery effects. **Estudos Avançados**, v. 20, n. 58, p. 147-156, 2006
- SCRIMSHAW, N. S. Nature of protein requirements. **J. Am. Assoc.** v.54, p.94-102, 1969.
- SCHWARZBAUER, J. E; SECHLER, J. L. Fribronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. **Curr. Opin. in Cell Biol.** London, v. 11, p. 622-627, 1999.
- SINGH, P.; CARRAHER, C.; SCHWARZBAUER, J. E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v. 26, p 397-419, 2010.
- SHI, F.; SOTTILE, J. Caveolin-1-dependent $\beta 1$ integrin endocytosis is a critical regulator of fibronectin turnover. **J. Cell. Sci.** v. 121, p. 2360-2371, 2008.
- SOTTILE, J.; CHANDLER, J. Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process. **Mol. Biol. Cell.** v. 16, p. 757-768, 2005.
- .SPOONCER, E.; ELIASON, J. and DEXTER, T.M. Longterm mouse bone marrow cultures. In: N.G. Testa and G. Molineux, Editors. Haemopoiesis. **A Practical Approach**, Oxford University Press, Oxford (1993), pp. 55-74.
- SUGIYAMA, A.; FUJITA, Y. KOBAYASHI, T. RYU, M., SUZUKI, Y., MASUDA, A., OCHI, T., TAKEUCHI, T. Effect of Protein Malnutrition on the Skin Epidermis of Hairless Mice. **J. Vet. Med. Sci.** V.73, p. 831-835, 2011.
- TAMKUN, J. W; SCHWARZBAUER, J. E; HYNES, R. O. A single rat fibronectin gene generates three different mRNAs by alternative splicing of a complex exon. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 81, p. 5140-5144, 1984.
- TAN, M.H; SUN, Z; OPITZ, S.L; SCHMIDT, T. E; PETRES, J. H and GEORGE, E. L. Deletion of the alternatively spliced fibronectin EIIA domain in mice reduces atherosclerosis. **Blood**, v. 104, p.11-18, 2004.
- TAVASSOLI, M.; MIGUELL, J. J. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. **Proc Soc Exp Biol Med.** Apr;196(4).p. 367-73, 1991
- TOMKINS, A. M. Protein-energy malnutrition and risk of infection. **Proc. Nutr. Soc**, v.45, p. 289-304, 1986.
- TOKSOZ D.; DEXTER T.M.; LORD B.I.; WRIGHT E.G.; LAJTHA L.G. The regulation in long-term bone marrow cultures. II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferation. **Blood**, 1980 55: 931-936, 1980
- VICTORIA, J. W.; HERNANDEZ, V. Q. Efecto del estado nutricional de los pacientes sometidos a cirugía eletiva. **Ver. Gastroenterol.** V.55, p.207-10, 1990.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; TRAMONTE, V. L. C. G.; BORELLI, P. Thrombospondin in protein malnutrition induced hypoplasia. **Rev. Nutr.** v. 18, p. 727-731, 2005.

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

XAVIER, J.G. FAVERO, M.E. VINOLO, M.A.R. ROGERO, M.M., DAGLI, M.L.Z., ARANA-CHAVEZ, V.E., BOROJEVIC, R.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. **HistolHistopathol.** 2007Jun;22(6):651-60.

ZIEGLER, E. E., FILER, L. J., Jr. Present knowledge in nutrition. 7ed. Washington DC; Ilse Press: 1996.

ZUCAS, S.M., LAJOLO, F.M., BARBÉRIO, J.C. Gaiola metabólica para ratos, testada por meio de zinco radioativo. **Rev Fac. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo. São Paulo**, v. 7, p. 353-359, 1969.

WATERLOW, JC; ALLEYNE, GAO. Protein malnutrition in children: advances in knowledge in the last ten years. **Adv Protein Chem** 1971; 25: 117.

WATERLOW, J.C. Malnutrición proteico-energetica. Washington: **Organización Panamericana de la Salud (Publicação científica n°555)**; 1996. p.501.

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

WEIDEL, S.E.; SMITH, G.; FLECK, A. The effects of experimental malnutrition on albumin metabolism and distribution in rabbits. **Br. J. Nutr.** v. 72, p. 369-384, 1994.

WILLIAMS D. A; RIOS M; STEPHENS C; PATEL V. P. Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell microenvironment interactions. **Nature** 352: 438, 1991.

WHITE, E. S; BARALLE, F. E; MURO, A. F. New insights into form and function of fibronectin splice variants. **J. Pathol**, v.216, p.1-14, 2008.

WHITE, E. S.; SAGANA, R. L.; BOOTH, A. J.; YAN, M.; CORNETT, C. C.; BLOOMHEART, C. A.; TSUI, J. L.; WILKE, C. A.; MOORE, B. B.; RITZENTHALER, J.; ROMAN, J.; MURO, A. F. Control Of Fibroblast Fibronectin Expression And Alternative Splicing Via The Pi3k/Akt/Mtor Pathway. **Exp Cell Res.** October 1; 316(16), P. 2644-2653, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Turning the tide of malnutrition: responding to the challenge of the 21 st century, **World Health Organization, Geneva, 2000.**

YANG, R. S; TANG, C. H; LING, Q. D; LIU, S. H; FU, W. M. Regulation of fibronectin fibrillogenesis by protein kinases in cultured rat osteoblasts. **Mol Pharmacol**, v.61, p. 1163 - 1173, 2002.