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

Remodelamento da matriz extracelular da medula óssea em desnutrição protéica: possível relação da via de AKT com a expressão de fibronectina e metaloproteinases de matriz

Graziela Batista da Silva

São Paulo
2016

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

Remodelamento da matriz extracelular da medula óssea em desnutrição protéica: possível relação da via de AKT com a expressão de fibronectina e metaloproteinases de matriz

Graziela Batista da Silva

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP

Tese para obtenção do Titulo de DOUTOR

Orientadora: Profª. Dra. Primavera Borelli

São Paulo
2016

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

Silva, Graziela Batista da
S586r Remodelamento da matriz extracelular da medula óssea em desnutrição protéica: possível relação da via de AKT com a expressão de fibronectina e metaloproteinases de matriz / Graziela Batista Silva. -- São Paulo, 2016.
142p.

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

1. Hematologia 2. Desnutrição proteica : Medicina I. T. II. Borelli, Primavera, orientador.

616.15 CDD

Graziela Batista da Silva

Remodelamento da matriz extracelular da medula óssea em desnutrição protéica: possível relação da via de AKT com a expressão de fibronectina e metaloproteinases de matriz

Comissão Julgadora
Da
Tese para obtenção do Titulo de DOUTOR

Profª. Dra. Primavera Borelli
orientadora/presindente

Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero
1º examinador

Prof. Dr. Ruy Gastaldoni Jaeger
2º examinador

Prof. Dr. Fábio César Prosdócimi
3º examinador

Profª Dra. Carla Cristina Lopes de Azevedo
4º examinador

São Paulo, 26 de abril de 2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Valdir e Lúcia, pelo amor incondicional e por todo o apoio durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Prof.ª Dra. Primavera Borelli, por ter orientado este trabalho com dedicação e profissionalismo e por todos os ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, professor e pesquisador do laboratório de hematologia experimental da FCF- USP.

Ao Edson Naoto Makiyama, técnico do laboratório de hematologia experimental da FCF- USP.

À Profª Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler e ao Renato Ramos Massaro, por colaborar no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio Allegrini Júnior, por colaborar no desenvolvimento da técnica histológica.

À Dalila Cunha de Oliveira, pela amizade, apoio durante os momentos difíceis, por compartilhar a moradia comigo durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

À Jackeline Soares de Oliveira Beltran, pela amizade, auxilio durante os experimentos e pelos momentos de descontração.

À Maristela Tsujita, pela amizade, auxilio durante os experimentos e pelo incentivo.

À Mariana Ferreira Cristina, pela amizade, apoio nos momentos difíceis e pelos momentos de descontração.

Ao Ed Wilson Cavalcante, Samira Alves Abou Arabi, Araceli Aparecida Hastreiter, Jéssica Luana, pela amizade e auxilio durante os experimentos.

Aos companheiros de pós-graduação do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, Andressa Antunes, Amanda Nogueira, Carolina Dias, Talita Sartori.

Ao Cauê Moara, pelo companheirismo, compreensão e apoio nos momentos difíceis.

Ao Bruno Batista e Douglas Batista, por sempre estarem do meu lado.

À Ana Carolina, Pamela Felix, Gabriela Hizume, Taimara Passero, pela amizade, pelos momentos de descontração e por compartilhar a moradia comigo durante o período de desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários da Superintendência Assistência Social – (SAS) da Universidade de São Paulo.

Aos funcionários da secretária do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas e aos funcionários da secretária do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo o apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão da bolsa de doutorado no país.

Meu estimado Fox

... Hoje estou muito deprimido com todos os meus experimentos – tudo tem saído errado:– as pombas de leque arracaram as penas das Pombas-Papo-de-Vento em sua viagem para casa – os peixes do Jardim Zoológico, depois de comerem as sementes, cuspiram-nas todas de novo – as sementes afundam na água salgada – a natureza é toda perversa e não funciona como eu gostaria e, neste exato momento, eu gostaria de poder trabalhar nas velhas Cracas e em nenhuma coisa nova. –

Trecho da carta enviada por C.Darwin

“não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino”

Paulo Freire

RESUMO

Silva, G. B. **Remodelamento da matriz extracelular da medula óssea em desnutrição proteica: possível relação da via de AKT com a expressão de fibronectina e metaloproteinases de matriz.** 2016. 142f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A desnutrição proteica (DP) pode ocasionar alterações na matriz extracelular (MEC) de diferentes órgãos e tecidos, inclusive o hematopoético, com comprometimento funcional. Estudos do nosso laboratório demonstraram, em modelo murino de DP, aumento da expressão proteica de fibronectina (FN) no estroma medular ósseo *in vivo*, principalmente na região subendosteal (local de fixação da célula tronco progenitora hemopoética). Já *in vitro*, no estroma medular ósseo, observou-se tanto o aumento quanto a diminuição de FN e a presença de suas isoformas. Essas alterações de FN parecem estar envolvidas com a hipoplasia da medula óssea (MO) em camundongos desnutridos. As modificações quantitativas de FN podem ser devidas: *(i)* à ação das metaloproteinases de matriz (MMP) responsáveis pela degradação das proteínas da MEC; *(ii)* aos inibidores de metaloproteinases (TIMP) que regulam a degradação da MEC; *(iii)* às alterações transcricionais, reguladas pela via de AKT/mTOR, que controla os *splicing* alternativos na FN, resultando em isoformas dessa proteína; *(iv)* a processos pós-transcricionais modulados por LC3, que aumenta a tradução do RNAm de FN. Assim, o objetivo deste estudo foi elucidar os mecanismos que alteram o *turnover* de FN no estroma medular ósseo em modelo murino de DP. Utilizamos camundongos, C57BL/6J machos, adultos, separados em dois grupos: controle e desnutrido, alimentados, *ad libitum*, com ração contendo 12% e 2% de proteína, respectivamente. Após cinco semanas de indução à desnutrição os camundongos foram eutanasiados, e coletado o material biológico. Avaliamos: o estado nutricional, o hematológico, a histologia da MO femoral bem como a determinação imunohistoquímica da FN, MMP-2 e MMP-9, determinação da expressão de FN e suas isoformas em células totais da MO, o estabelecimento do estroma medular ósseo *in vitro,* por 28 e 35 dias de cultivo. A partir das culturas foram avaliadas a expressão de RNAm de FN e suas isoformas, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, AKT, mTOR e LC3α e β, quantificação de MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2,TNFα, TGFβ e IL-1β e determinação de LC3β e proteínas da via de AKT/mTOR. Não observamos alterações na expressão do RNAm de FN e suas isoformas *ex vivo* e *in vitro,* mas um aumento da deposição de FN na MO.Também não observamos modificações na imunolocalização de MMP-2 e MMP-9 na MO e na atividade dessas proteínas no sobrenadante de culturas de células estromais *in vitro*, mas houve aumento da expressão do RNAm de MMP-9 em 28 dias de cultivo. Não detectamos alterações na expressão de RNAm e na concentração de TIMP-1 e TIMP-2 no sobrenadante das culturas. Houve redução significativa de TNFα e TGFβ no sobrenadante das culturas de 28 dias. Observamos aumento da expressão do RNAm de mTOR em culturas de 28 dias e LC3α e LC3β em 35 dias de células estromais. Encontramos menor fosforilação de PI3K, AKT, PTEN, mTOR e mTOR total e aumento de LC3β em culturas de 28 dias, mas redução de LC3β em 35 dias. Em função dos dados inferimos que a DP conduz a alterações da FN que não estão relacionadas à ação de MMPs e TIMPs e sim a modificações de LC3β e da via de

AKT/mTOR.

Palavras-chave: Matriz extracelular, metaloproteinases de matriz, AKT/mTOR, LC3β, hemopoese e desnutrição proteica.

ABSTRACT

Silva, G. B. **Extracellular matriz remodeling of the bone marrow in protein malnutrition: possible relationship of AKT pathway with expression of fibronectin and matriz metalloproteínases.** 2016. .142f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Protein malnutrition (PM) can lead changes in extracellular matrix (ECM) from several organs and tissues, including hematopoietic, with functional impairments. Research from our laboratory demonstrated, in a murine model of protein malnutrition, increase in proteic expression of fibronectin (FN) *in vivo* bone marrow stroma, principally in subendosteal region (attachment site of hematopoietic stem/progenitor cell – HSPC). It was observed as both an increase and a decrease in the presence of FN and its isoforms *in vitro* bone marrow stroma. These FN changes seem to be related to bone marrow (BM) hypoplasia in malnourished mice. Quantitative FN changes may be due to: *(i)* action of matrix metalloproteinases (MMP) responsible for ECM proteins degradation; *(ii)* tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) that regulate ECM degradation; *(iii)* transicional changes regulated by AKT/mTOR pathway, which controls alternative splicing in FN, resulting in isoforms from this protein; *(iv)* post-transcriptional processes modulated by LC3 that increases FN mRNA translation. Therefore, the aim of this study was to elucidade the mechanisms that changes the FN turnover in bone marrow stroma in a murine model of PM. C57BL/6J, adult and male mice were used and divided into two groups: control and malnourished, fed *ad libitum* with ration containing 12% and 2% of protein, respectively. After five weeks of induction malnutrition, mice were euthanized and the biological material was collected. We evaluated: nutritional and hematologic status, the femoral BM histology, immunohistochemistry determination of FN, MMP-2 and MMP-9, the FN and its isoforms expression determination in total BM cells, establishment of *in vitro* bone marrow stroma for 28 and 35 days of culture. From the cultures were evaluated FN mRNA expressions and its isoforms, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2, AKT, mTOR, LC3α and β, quantification of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2,TNFα, TGFβ and IL-1β and determination of LC3β and AKT/mTOR proteins. No changes were observed, *ex vivo* and *in vitro*, in the expression of FN mRNA and its isoforms, but there was a FN deposition increase in BM. We did not observe modifications in MMP-2 e MMP-9 immunolocalization in BM and in these proteins activity in the supernatant of *in vitro* stromal cell culture, but there was an increase in MMP-9 mRNA expression after 28 days of culture. We did not detect changes in mRNA and in TIMP-1 and TIMP-2 expressions in the supernatant of cultures. There was significant reduction of TNFα and TGFβ in the cultures supernatant of 28 days. We observed an increase of mTOR RNAm in 28 days cultures and also LC3α and LC3β in stromal cells with 35 days. We found lower phosphorylation of PI3K, AKT, PTEN, mTOR e total mTOR and an LC3β increase in 28 days cultures, yet an LC3β reduction in 35 days. According to the data we conclude that PM leads to FN changes that are not related to MMPs and TIMPs actions, but the LC3β and AKT/mTOR pathway modifications.

Keywords: Extracellular matrix, matrix metalloproteinases, AKT/mTOR, LC3β, hemopoiesis and malnutrition.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da ração de crescimento (AIN93G modificada).....41

Tabela 2 - Composição das rações controle e hipoprotéica (AIN93M modificada).....42

Tabela 3 - Composição da mistura vitamínica.....42

Tabela 4 - Composição da mistura salínica 43

Tabela 5 - Concentração proteica das rações utilizadas no experimento.....43

Tabela 6 - Concentração plasmática de proteínas totais e albumina.....61

Tabela 7 – Valores do eritrograma e índices hematimétricos do sangue periférico de camudongos do grupo controle e desnutrido.....62

Tabela 8 - Número absoluto de leucócitos e das diferentes populações leucocitárias presente no sangue periférico de camudongos dos grupos controle e desnutrido.....63

Tabela 9 – Resultados da contagem diferencial das células da medula óssea.....64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação estrutural das MMPs.....31

Quadro 2 - Proteínas analisadas e anticorpos utilizados no *western blotting*.....49

Quadro 3 - Genes endógenos para camundongo.....57

Quadro 4 - Genes de interesse e gene endógeno.....58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microambiente ou nicho da célula tronco na medula óssea.....26

Figura 2 - Estrutura das MMPs e organização dos seus domínios.....30

Figura 3 - Via esquemática de sinalização de AKT/mTOR e sua relação com a expressão de FN e suas isoformas e MMPs.....36

Figura 4 - Figura esquemática referente ao delineamento experimental de indução a desnutrição durante o crescimento e desnutrição dos camundongos.....44

Figura 5 - Fotomicrografia da medula óssea do grupo controle **(A)** e do grupo desnutrido **(B)**. Coloração de HE.....65

Figura 6 - Imagem do gel da reação controle da zimografia.....77

Figura 7 - Ensaio de zimografia com sobrenadante carenciado em soro do estroma medular ósseo *in vitro* **(A)** grupo controle e desnutrido do 28º dia e **(B)** grupo controle e desnutrido do 35º dia de cultivo.....78

Figura 8 - Fotomicrografia de corte histológico da medula óssea femoral para imunomarcação de FN por imunohistoquímica. **(A)** grupo controle **(B e B1)** grupo desnutrido **(C)** controle negativo da reação.....83

Figura 9 - Fotomicrografia da medula óssea, imunomarcação de MMP-9 por imunohistoquímica. **(A)** grupo controle **(B e B1)** grupo desnutrido **(C)** controle negativo da reação.....84

Figura 10 - Fotomicrografia de corte histológico da medula óssea femoral para imunomarcação de MMP-2 por imunohistoquímica. **(A)** grupo controle **(B e B1)** grupo desnutrido **(C)** controle negativo da reação.....85

Figura 11 - Via esquemática proposta das alterações da via de sinalização de AKT e expressão de MMP e isoformas de FN em células do estroma medular ósseo em **28 dias de cultivo**.....99

Figura 12 - Via esquemática proposta das alterações da via de sinalização de AKT/mTOR e expressão de MMP e isoformas de FN em células do estroma medular ósseo em **35 dias de cultivo**.....102

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - (A) Variação do peso corporal, expressa em grama, durante o período de indução a desnutrição proteica. **(B)** Porcentagem da variação do peso corporal durante o experimento.....60

Gráfico 2 - (A) Consumo de ração e **(B)** consumo de proteína durante o experimento.....61

Gráfico 3 – Número de células nucleadas totais da medula óssea dos camundongos do grupo controle e do grupo desnutrido.....63

Gráfico 4 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de PI3K p85 total **(A e A1)**, PI3K p85 tirosina **(B e B1)**, PI3K p55 tirosina **(C e C1)**.....68

Gráfico 5 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. AKT total **(A e A1)**, AKT serina **(B e B1)**, AKT treonina **(C e C1)**.....69

Gráfico 6 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de Pten serina **(A e A1)**, PDK total **(B e B1)**, PDK serina **(C e C1)**.....70

Gráfico 7 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de mTOR total **(A e A1),** mTOR serina 2481 **(B e B1)** e mTOR serina 2448 **(C e C1)**...72

Gráfico 8 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de Rictor **(A e A1)** e GβL **(B e B1)**.....73

Gráfico 9 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de Raptor Total **(A e A1)**, Raptor serina **(B e B1)**.....74

Gráfico 10 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de PRAS40 Total **(A e A1)**, PRAS40 treonina **(B e B1)**.....75

Gráfico 11 - Determinação de LC3β, no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo.....76

Gráfico 12 - Análise do ensaio de zimografia.realizado no sobrenadante carenciado em soro do estroma medular ósseo *in vitro*. nos 28º e 35º dia de cultivo. Atividade enzimática da **(A)** Pró-MMP-9, **(A1)** MMP-9 ativa **(B)** Pró-MMP-2 e **(C)** MMP-2 intermediária.....79

Gráfico 13 - Quantificação da atividade de MMPs no sobrenadante do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. **(A)** atividade de MMP-9 ativa. **(B)** atividade de MMP-2 ativa.....80

Gráfico 14 - Quantificação de TIMPs no sobrenadante do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Quantificação **(A)** TIMP-1, **(B)** TIMP-1.....81

Gráfico 15 – Valores da concentração de citocinas no sobrenadante da cultura de células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo.....86

Gráfico 16 - Análise da expressão de RNAm da FN total e suas isoformas (EDA, EDB e IIICS) em células totais da medula óssea *ex vivo*.....87

Gráfico 17 - Análise da expressão de RNAm da FN total e suas isoformas (EDA, EDB e IIICS) no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm.....88

Gráfico 18 – Análise da expressão de RNAm das MMPs no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm **(A)** MMP-2, **(B)** MMP-9.....89

Gráfico 19 - Análise da expressão de RNAm das TIMPs no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm **(A)** TIMP-1, **(B)** TIMP-2.....90

Gráfico 20 - Análise da expressão de RNAm do AKT no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm **(A)** AKT1 **(B)** AKT2.....91

Gráfico 21 - Análise da expressão de RNAm do mTOR no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm.....92

Gráfico 22 - Análise da expressão de RNAm do LC3α e LC3β nas células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo.....93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-FC	5-Fluorouracil
AEBSF	4-(2-*Aminoethyl) Benzenesulfonyl Fluoride Hydrochloride*
AKT	*Serine-Threonine Kinase*
AP-1	*Activator Protein* – 1
APMA	*p-Aminophenylmercuric Acetate*
Atg	*Autophagy –Related Protein*
BFU-E	Unidades de Formação Expansiva Eritróide
cDNA	DNA complementar
CFU-GM	Unidades Formadoras de Colônias Granulo-Monocítica
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CTPH	Célula Tronco Progenitora Hemopoética
CXCR4	*Chemokine Receptor Type* 4
DAB	3,3' *Diaminobenzidine*
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
EDA	*Extra Domains A*
EDB	*Extra Domains B*
EDTA	Ácido Etileno Diaminotetracitico
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ERK	*Extracellular Signal Regulated Kinase*
FAK	*Focal Adhesion Kinase*
FAO	*Food and Agriculture Organization*
FN	Fibronectina
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GβL	G Poteína Beta Subunidade-*Like*
HCM	Concentração Corpuscular Média
HE	Hematoxilina e Eosina
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	*Insulina-Like Growth Factor* 1
IIICS	*III Connecting Segment*
IL-1β	Interleucina 1- Beta

ILK	*Integrin – Linked Kinase*
LC3	*Light Chain* 3
LN	Laminina
MAP	*Mitogen-Activated Protein*
MEC	Matriz Extracelular
MEK	*Mitogen-Activated Protein Kinase Erk Kinase*
mLP3	*Microtubule – Associated Protein*
mLST8	*mTOR Associated Protein, LST8 Homolog*
MMP	Metaloproteinases de Matriz
MT-MMP	Metaloproteinases de Matriz de Membrana
mTOR	Alvo de Rapamicina em Mamíferos
mTORC1	mTOR Complexo 1
mTORC2	mTOR Complexo 2
N.D	Não Determinado
NF-κβ	Fator Nuclear Kappa Beta
Pb	Pares de bases
PBF	Programa Bolsa Famíla
PBS	Tampão Fosfato Salina
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
PDK	Proteína Quinase – 1 Dependente de Fosfoinositídeo
PH	*Pleckstrin Homology*
PI3K	Fosfotidilinositol 3 – Quinase
PIP2	Fosfotidilinositol 4,5 – Bifosfato
PIP3	Fosfotidilinositol- 3 4,5 – Trifosfato
PKB	Proteína Quinase B
PRAS40	*Proline-Rich Akt Substrate of* 40kDa
Proteínas SR	Proteínas Ricas em Serina e Arginina
PVDF	*Polyvinylidene Fluoride*
Região ARE	*Au-Rich Element*
Rheb	*Ras Homolog Enriched in Brain*
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RNase	Ribonuclease
SCF	*Stem Cell Factor*

SDF-1	Fator Derivado de Células Estromais
TBS	Tampão Salina Tris
TGFβ	Fator de Crescimento Transformante Beta
TIMP	Inibores Teciduais de Metaloproteinases de Matriz
TNFα	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TSC1/TSC2	*Tuberous Sclerosis* 1/ 2
VCAM	Proteína Celular de Adesão Vascular
VCM	Volume Corpuscular Médio
VLA-4	*Very late antigen* ou $\alpha_4\beta_1$
VLA-5	*Very late antigen* ou $\alpha_5\beta_1$

SUMÁRIO

1. **INTRODUÇÃO** 22
1.1 Desnutrição 22
1.2 Nicho/Microambiente da célula tronco hemopoética 25
1.3 Matriz extracelular e desnutrição 28
1.4 Remodelamento da matriz extracelular e metaloproteinases de matriz 29
1.5 Metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e seus inibidores na hemopoese 33
1.6 Via de sinalização de AKT/mTOR 34
1.7 Regulação da fibronectina e metaloproteinases de matriz por meio da via de sinalização de AKT/mTOR 37
1.8 Regulação da fibronectina por meio do LC3 38
2. **HIPÓTESE E OBJETIVO** 39
3. **MATERIAIS E MÉTODOS** 40
3.1 Camundongos 40
3.2 Rações 40
3.3 Indução da desnutrição 44
3.4 Avaliação do estado nutricional dos camundongos 45
3.5 Obtenção das amostras biológicas 45
3.6 Hemograma e contagem de reticulócitos 45
3.7 Determinação de proteínas totais e albumina plasmática 46
3.8 Obtenção de células da medula óssea para realização do mielograma 46
3.9 Estabelecimento do estroma medular ósseo: Culturas de longa duração 46
3.10 Extração de proteínas totais do estroma medular ósseo *in vitro* 47
3.11 Determinação de proteínas totais extraídas do estroma medular ósseo *in vitro* 48
3.12 Determinações de proteínas na via de sinalização do AKT, mTOR e a proteína LC3β por *Western blotting* 48
3.13 Carenciamento das culturas de longa duração 50
3.14 Zimografia 50
3.15 Ensaio de atividade de MMP-2 e MMP-9 *in vitro* 52
3.16 Quantificação de TIMP-1 e TIMP-2 *in vitro* 52
3.17 Avaliação das citocinas sintetizadas no estroma medular ósseo *in vitro* 53
3.18 Análises histopatológica da medula óssea 53

3.19 Coloração de hematoxilina e eosina 54
3.20 Análise de fibronectina, MMP-2 e MMP-9 por imunohistoquímica 54
3.21 Análise da expressão dos genes da FN e suas isoformas, de MMPs, TIMPs, AKT, mTOR e LC3β 55
3.21.1 Extração de RNA *ex vivo*.....55
3.21.2 Extração de RNA *in vitro* 56
3.21.3 Síntese do DNA complementar (cDNA) 56
3.21.4 Controle endógeno.....57
3.21.5 Determinação da expressão dos genes de interesse.....57
4 Análise estatística 59
5 **RESULTADOS**.....60
5.1 Avaliação do estado nutricional.....60
5.2 Avaliação hematológica.....61
5.2.1 Eritrograma.....61
5.2.2 Leucograma 62
5.2.3 Número de células totais da medula óssea e mielograma 63
5.3 Análises histopatológica da medula óssea.....64
5.4 Determinações das proteínas na via de sinalização do AKT e mTOR por *western bloting* em células estromais da medula óssea *in vitro* 66
5.4.1 PI3K total e PI3K fosforilado.....66
5.4.2 AKT total e fosforilado 66
5.4.3 Pten fosforilado 67
5.4.4 PDK total e fosforilado.....67
5.4.5 mTOR total e fosforilado.....71
5.4.6 Rictor, GβL, Raptor total e fosforilado, PRAS40 total e fosforilado 71
5.4.7 LC3β.....76
5.5 Zimografia do sobrenadante de culturas de células estromais da medula óssea *in vitro* 77
5.6 Ensaio de atividade MMP-2 e MMP-9 em sobrenadante de culturas de células da medula óssea *in vitro* 80
5.7 Quantificação de TIMP-1 e TIMP-2 em sobrenadante de culturas de células da medula óssea *in vitro* 81
5.8 Análise de FN, MMP-9 e MMP-2 por imunohistoquímica na medula óssea femoral 82
5.9 Avaliação das citocinas sintetizadas por células estromais do estroma mdeular *in vitro* 86

5.10 Análise da expressão de RNAm dos genes da FN e suas isoformas, MMPs, TIMPs, AKT, mTOR e LC3β 87
5.10.1 Expressão do RNAm de FN e suas isoformas em células totais da medula óssea *ex vivo* 87
5.10.2 Expressão do RNAm de FN e suas isoformas em células do estroma medular ósseo *in vitro* 88
5.10.3 Expressão do RNAm de MMP-2 e MMP-9 em células do estroma medular ósseo *in vitro* 89
5.10.4 Expressão do RNAm de TIMP-1 e TIMP-2 em células do estroma medular ósseo *in vitro* 90
5.10.5 Expressão do RNAm de AKT1, AKT2 em células do estroma medular ósseo *in vitro* 91
5.10.6 Expressão do RNAm de mTOR em células do estroma medular ósseo *in vitro* 92
5.10.7 Expressão do RNAm de LC3α e LC3β em células do estroma medular ósseo *in vitro* 93
6. **DISCUSSÃO** 96
7. **CONCLUSÃO** 108
REFERÊNCIAS 109
ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 127
INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS 128
FICHA DO ALUNO 129
CURRÍCULO LATTES 130

1. INTRODUÇÃO

1.1 Desnutrição

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2013), a desnutrição é uma desordem nutricional resultante do consumo e, ou absorção deficiente de macronutrientes e micronutrientes. Ressalte-se que o consumo desequilibrado em excesso desses nutrientes também pode conduzir à desnutrição. Sendo assim, existem duas formas de desnutrição: subnutrição e sobrepeso/obesidade (SAWAYA et al., 2011; WHO, 2013).

A desnutrição também é causada por doenças não nutricionais como, infecção gastrointestinal severa, infecções crônicas, parasitas intestinais e neoplasias malignas. A desnutrição conduz ao comprometimento do sistema imunológico que, por sua vez, aumenta a suscetibilidade a infecções, existindo, assim, um ciclo vicioso entre a desnutrição e a infecção (CHANDRA, 1997, 2003; RODRIGUEZ et al., 2011).

Condições socioeconômicas inadequadas e insegurança alimentar estão relacionadas com a desnutrição (WHO, 2013), que atinge principalmente mulheres e gestantes, crianças menores de cinco anos, idosos e indivíduos hospitalizados 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 desnutrição é responsável por 55% das mortes de crianças no mundo inteiro. Está associada a várias outras doenças e ainda é considerada a principal causa de mortalidade em crianças menores de cinco anos (SAWAYA, 2006; WHO, 2013). A prevalência de desnutrição em indivíduos hospitalizados varia de 20% a 50% dependendo do estado clínico do paciente (NORMAN et al*.,* 2008). BAUER et al*.* (2002), relataram 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 aumento de risco nutricional em 41,6% dos pacientes avaliados.

Segundo a FAO (2013), o número de indivíduos desnutridos no mundo vem diminuindo nos últimos 20 anos. Entre os anos de 2011 e 2013 o número de

pessoas acometidas pela desnutrição era de 842,3 milhões, correspondendo a 12% da população mundial (FAO 2013). Mas a estimativa para os anos de 2014 a 2016 é de 795 milhões, correspondendo a 10,9% da população mundial. Desse total 14,7 milhões estão em regiões desenvolvidas e 779,9 milhões em regiões em desenvolvimento, dentre essa última, 232,5 milhões encontram-se na África, seguida pela Ásia com 511,7 milhões, América Latina e Caribe com 34,3 milhões e, por fim, a Oceania com 1,4 milhão (FAO, 2015).

O Brasil, entre os anos de 2011 e 2013, possuía cerca de 13,6 milhões de pessoas acometidas pela desnutrição, correspondendo 6,9% da população brasileira (FAO, 2013). Porém, a estimativa para os anos de 2014 a 2016 é menos de 5% da população (FAO, 2015). A quantidade de pessoas acometidas pela desnutrição no Brasil vem diminuindo progressivamente nos últimos anos, tanto da população infantil, quanto na adulta. No entanto, ainda existem regiões onde crianças apresentaram *deficit* de estatura, sendo essa uma das características da desnutrição (BATISTA; RISSIN, 2003). Dados do IBGE publicados em 2010 relatam que a desnutrição infantil diminuiu no Brasil, caindo de 13,5% em 1996 para 6,8% nos anos de 2006 a 2007. Essa queda está associada ao aumento da escolaridade materna, ao crescimento do poder aquisitivo das famílias, à expansão da assistência à saúde, melhorias nas condições de saneamento e aos programas de transferência de renda (MONTEIRO et al., 2009).

Cabral et al. (2013), relataram que famílias beneficiadas com o programa de transferência de renda, Programa Bolsa Família (PBF), de uma população de Maceió, apesar de utilizarem a maior parte do benefício na aquisição de alimentos, 8,6% das crianças e 20% dos adolescentes apresentaram desnutrição enquanto que mais da metade da população adulta apresentou sobrepeso/obesidade. Isso ocorreu devido à menor ingestão de proteínas, maior ingestão de carboidratos e ingestão inadequada de micronutrientes. Além disso, o sobrepeso/obesidade está relacionado a baixa atividade física e alterações fisiológicas. Estudo realizado com mulheres adultas da zona rural dos municípios de Portel e Melgaço no estado do Pará, demonstrou associação na modificação no padrão da dieta dessas mulheres com o benefício do PBF. Foi observado diminuição do consumo de energia, carboidrato e gordura, mas o consumo de proteína não diferiu entre os períodos analisados. Essas alterações são devidas à troca da fonte dos macronutrientes, que anteriormente era apenas de produtos produzidos na agricultura e atualmente advêm de produtos do

comércio local (PIPERATA et al., 2011). Na análise dos inquéritos nutricionais brasileiros de períodos distintos que compreendem os anos 1974 a 2009, Conde e Monteiro (2014), relataram diminuição na prevalência da desnutrição em crianças e adultos, mas um aumento do sobrepeso na população, destacando intensa transição nutricional no Brasil. O conceito de transição nutricional é mencionado para citar as modificações no padrão alimentar, podendo ocorrer a coexistência da desnutrição e obesidade (SAWAYA et al., 2003, 2011).

Clinicamente, as consequências da desnutrição dependem da idade do indivíduo, da intensidade, da duração e da causa da deficiência e, na dependência desses fatores, observam-se perda de peso, *deficit* do crescimento, diminuição da imunidade, danos na mucosa gastrointestinal, perda de apetite, má absorção dos alimentos, alterações psicomotoras, alterações do sistema endócrino afetando principalmente hormônios da tireoide, insulina e o hormônio do crescimento e alterações hematológicas (CHANDRA, 1997 e 2003; SAWAYA, 2006; GROVER et al*.,* 2009; SAUNDERS et al., 2010). Essas alterações, de maneira geral, levam a problemas de saúde, que contribuem para a deterioração do estado nutricional.

Existem diferentes formas de subnutrição: o *Kwashiorkor*, o *Marasmus* e a baixa estatura, que diferem na etiologia e nas manifestações clínicas. Em 1935, Cicely D. Willians introduziu o termo *Kwashiorkor* no meio cientifico. O nome *Kwashiorkor* indica a doença que afeta o filho mais velho, decorrente do nascimento do segundo filho, ou seja, o filho mais velho passa a ter uma dieta rica em carboidratos e com menor quantidade de proteínas. O *Kwashiorkor* é causado por uma dieta deficiente de proteínas, vitaminas e minerais. Caracteriza-se pelo retardo do crescimento, perda de peso e a presença de edema. Já o *Marasmus* é a forma mais frequente no Brasil, causado por uma dieta deficiente em energia, onde há perda do peso corporal consequente da depleção do tecido muscular esquelético e da gordura, com objetivo de proteger os órgãos vitais. Ambas as formas são frequentes em crianças (SAWAYA, 1996; MONTE, 2000; KRAWINKEL, 2003). No Brasil, na década de 60 os casos de *Kwashiorkor* eram comuns, havendo diminuição do número de casos na década de 70. Dados de 2009 relatados por Bittencourt e colaboradores, indicam a prevalência de internações de crianças menores de cinco anos no Sistema Único de Saúde, em decorrência de *Kwashiorkor* e *Marasmus*. A baixa estatura é o tipo de subnutrição predominante no mundo. Vários fatores estão envolvidos na sua etiologia, tais como: nutrição materna insuficiente, desnutrição

intrauterina, falta de aleitamento materno até seis meses, consumo e/ou absorção inadequados de macronutrientes e micronutrientes (SAWAYA et al., 2006, 2011).

1.2 Nicho/Microambiente da célula tronco hemopoética

A hemopoese envolve os processos de produção, diferenciação, maturação e senescência das células sanguíneas, ocorrendo nos seres humanos após o nascimento, na cavidade dos ossos onde está localizada a medula óssea, também denominado tecido mieloide (Borelli, 2014). Durante a infância praticamente todos os ossos possuem medula óssea com atividade hemopoética e a partir dos 4 anos há uma mudança na localização desse tecido hemopoético de modo que, a partir dos 18 anos, a atividade hemopoética está restrita aos ossos planos esponjosos (esterno, crista ilíaca e costelas) (LORENZI, 2006; KOURY; LICHTAMAN, 2010). Em ratos e camundongos durante toda a vida, a medula óssea com atividade hemopoética está localizada na cavidade de praticamente todos os ossos longos, sendo que o baço também permanece como órgão linfo-hemopoético (BIANCO, 2011).

As células sanguíneas originam-se a partir de um mesmo precursor denominado célula-tronco progenitora hemopoética (CTPH). A CTPH possui a capacidade de auto-renovação e diferenciação, mas para isto é necessária uma estrutura que propicie um ambiente estrutural e bioquímico denominado microambiente ou de “nicho da célula tronco”, conceito este descrito pela primeira vez por Schofield (1978). Existem dois nichos distintos onde a CTPH está localizada: o nicho endosteal ou nicho osteoblástico e o nicho vascular (YIN; LI, 2006; WILSON; TRUMPP, 2006; KOURY; LICHTAMAN, 2010). A interação nicho-CTH influencia na auto-renovação, quiescência ou mobilização da CTPH (OH; KWON, 2010). No nicho endosteal a CTPH está em íntimo contato com os osteoblastos que secretam fatores capazes de regular a quiescência e a manutenção (auto-renovação) da CTPH (OH; KWON, 2010). O nicho vascular promove a proliferação e a diferenciação das CTPHs por ser um microambiente distinto da região subentosteal, inclusive em nutrientes, alta concentração de oxigênio e fatores de crescimento (YIN; LI, 2006; WILSON; TRUMPP, 2006; KOURY; LICHTAMAN, 2010) **(Figura 1)**. A

hemopoese ocorre nos espaços extravasculares entre os vasos sinusoidais da medula óssea.

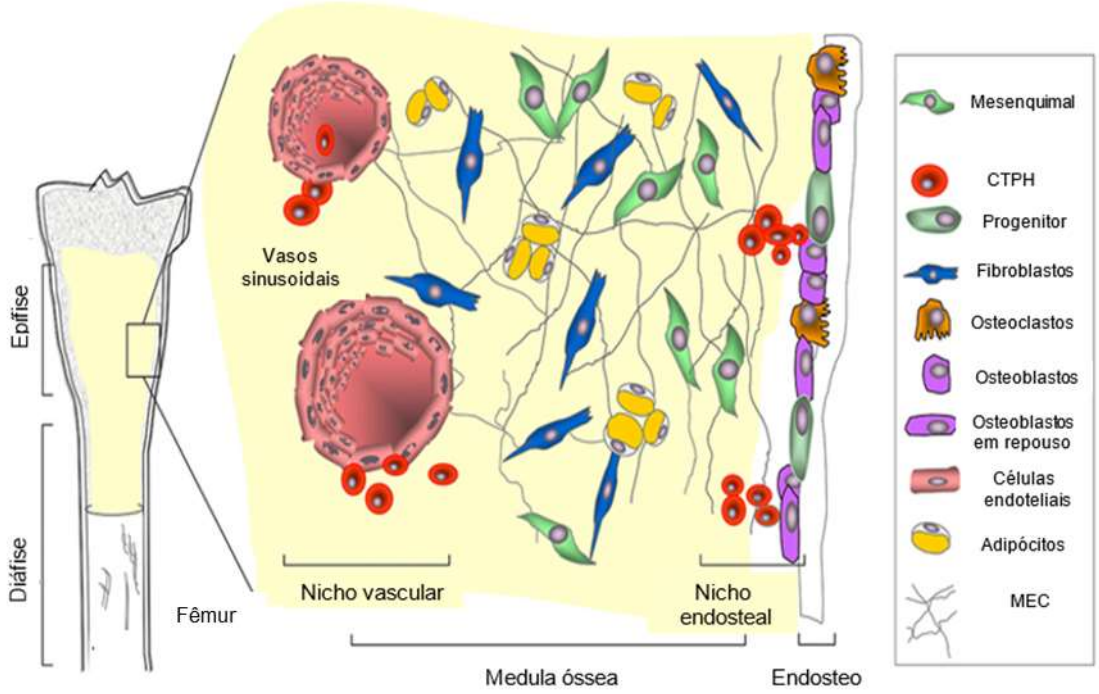


Figura 1- Microambiente ou nicho da célula tronco na medula óssea. Fonte: Adaptado de GRASSEL; AHMED, 2007.

O estroma medular ósseo do tecido mieloide, além das células hemopoéticas em diferentes estados de diferenciação e maturação, é constituído por vasos sinusoidais, células estromais, citocinas e matriz extracelular (MEC) (WILSON; TRUMPP, 2006; KOURY; LICHTAMAN, 2010; BIANCO, 2011). O termo células estromais é utilizado para definir uma população de células que se originam da célula tronco mesenquimal. Dentre as células estromais, também denominadas células não hemopoéticas, podemos citar os fibroblastos, os adipócitos e os osteoblastos, além dos macrófagos e células endoteliais (KLEIN, 1995; OWEN, 1998). As células estromais são capazes de sustentar a hemopoese por meio da produção de citocinas, de fatores de crescimento e pela produção da MEC.

A MEC é constituída por moléculas distintas, dentre essas podemos citar as macromoléculas tais como, glicosaminoglicanos e proteoglicanos, colágeno e proteínas não colagênicas tais como, fibronectina (FN), laminina (LN), trombospondina, tenascina (EAVES et al., 1991; MAYANI et al., 1992; ABBOUD; LICHTMAN, 2001; ROZARIO; DESIMONE, 2010) que estão presentes na medula óssea (KLEIN, 1995). A MEC é essencial para fornecer um suporte estrutural, além

de contribuir para regulação de diversas funções celulares como proliferação, migração e adesão, influenciando também na expressão gênica durante a homeostasia e o desenvolvimento (BOWERS et al., 2010; ROSARIO; DESIMONE, 2010).

Um dos pré-requisitos para a hemopoese é a fixação da CTPH em microambientes particulares, possibilitando interações célula-célula e célula - MEC (TAVASSOLI; MINGUELL, 1991). As CTPH estão em contato íntimo com a FN, sendo que integrinas expressas por essas células, VLA-4 (*very late antigen* ou $\alpha_4\beta_1$) e VLA-5 (*very late antigen* ou $\alpha_5\beta_1$), são reconhecidas como mediadoras da interação entre essa população celular e a FN tanto em camundongos quanto em humanos (WILLIANS, et al*.,* 1991; LOO, 1998). Essa interação FN e integrina promove a progressão no ciclo celular das CTPH (GIET et al., 2001). Também o cultivo da CTPH de camundongos sobre uma matriz de FN juntamente com LN, conduz ao aumento da proliferação dessas células (SAGAR et al., 2006). Celebi et al. (2011), observaram que ao cultivar células progenitoras mieloides e megacariocíticas na presença da MEC, constituida de colágeno I, colágeno IV, LN e FN, havia um aumento na proliferação dessas células, sendo a proliferação mais eficiente quando havia associação dessas moléculas da MEC, ao invés da aplicação individual.

O estabelecimento do estroma medular ósseo por meio das culturas de longa duração foi descrito originalmente por Dexter et al. (1977), e se assemelha ao microambiente hemopoético *in vivo,* capaz de sustentar a hemopoese *in vitro.* Isso decorre do contato célula-célula, entre as células hemopoéticas e as células estromais permitindo, assim, a comunicação intracelular. A interação célula-MEC constitui-se em importante meio de regulação das diferentes funções celulares já mencionadas e a secreção de citocinas e fatores de crescimento essenciais para a manutenção da hemopoese (SPOONCER et al.,1993). Em culturas de longa duração, moléculas da MEC tais como colágeno, FN e LN, são secretadas e depósitas no meio extracelular, que coincide com as regiões de atividade hemopoética (KOURY; LICHTAMAN, 2010).

1.3 Matriz extracelular e desnutrição

Dados da literatura relatam que crianças desnutridas apresentaram alterações no microambiente do timo e dentre essas o aumento da FN e outras proteínas da MEC (LYRA et al., 1993; SAVINO et al., 2007). REIF et al., (1993) encontraram, em indivíduos desnutridos, diminuição de componentes da MEC do fígado, porém, a relação proteína/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 essas alterações ainda não foram elucidados, mas, considerando que as moléculas da MEC estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação, diferenciação e migração das células hemopoéticas exercendo, desta forma, controle sobre a hemopoese medular, essas 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 têm encontrado, em desnutrição proteica, hipoplasia de medula óssea de camundongos (BORELLI et al*.,* 1995, 2001, 2007) com evidências histológicas de alteração da matriz extracelular. VITURI et al. (2000, 2005), encontraram alterações na proporção de proteínas, especialmente de FN, trombospondina e LN, na MEC de camundongos desnutridos, situação que poderia contribuir para a hipoplasia observada. Xavier et al. (2007), demonstraram a partir da caracterização imunohistoquímica e ultra-estrutural da medula óssea, o aumento na deposição de FN na medula óssea esternal de camundongos desnutridos, especialmente em sítios endosteais/paratrabeculares (regiões de fixação de células tronco hemopoéticas) e aumento na deposição de LN, particularmente em regiões perisinusais. Mais recentemente, dados ainda não publicados de nosso grupo, foi encontrado em cultura de células da medula óssea oriundas de camundongos desnutridos maior quantidade de FN no estroma medular ósseo após 28 dias de cultivo, situação essa modificada no estroma medular ósseo após 35 dias de cultivo, que apresenta menor quantidade de FN. Porém, ainda não esclarecemos se essas alterações quantitativas da FN são devidas a uma maior ou menor produção ou alteração na degradação. Tais alterações podem modificar a co-localização de uma

série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de crescimento e diferenciação de células hemopoéticas (BORELLI et al., 1995, 2001, 2007; 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, 2007; BARON, 1997) são um reflexo do comprometimento dos órgãos linfo-hemopoéticos em condições de desnutrição e estão associadas à modificação da resposta imune que se traduz por maior suscetibilidade a infecção (GROSS; NEWBERNE, 1980; TOMKINS, 1986; VICTORIA; HERNANDEZ, 1990; CHANDRA, 1997).

1.4 Remodelamento da matriz extracelular e metaloproteinases de matriz

A MEC dos tecidos é degradada e sintetizada por um processo denominado remodelamento, processo fisiológico, que ocorre durante o desenvolvimento, na manutenção do tecido normal, na reparação tecidual e em alguns processos patológicos como arteriosclerose. Ao longo da 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).

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases pertencentes a superfamília do zinco/metzincina. As MMPs são proteases zinco e cálcio dependentes, associadas à degradação e ao *turnover* das proteínas que compõem a MEC, tendo assim importante papel no remodelamento (PEREIRA et al., 2006; RODRÍQUEZ et al., 2010).

Foram identificados 25 genes para MMPs em vertebrados, sendo 24 genes de MMPs detectados em humanos, com duplicação do gene MMP23; MMP23A e MMP23B, além da presença do gene MMP26. Mas em camundongos foram identificados 23 genes de MMPs, com duplicação do gene MMP1, MMP1a e MMP1b e ausência do gene MMP26 (FANJUL-FERNANDEZ et al., 2010).

As MMPs são classificadas de acordo com características bioquímicas, como a capacidade de hidrolisar um componente da MEC e a presença de zinco como um íon intrínseco à molécula. As MMPs podem ser classificadas em colagenases, gelatinases, estromelisinas, matrilisinas e MMP de membrana (MT-MMP) e ainda podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura **(Quadro 1)** (FOLGUERAS et al., 2004; NAGASE et al., 2006; PEREIRA et al., 2006; AMĂLINEI et al., 2007 ; FANJUL-FERNANDEZ et al., 2010; BONNANS et al., 2014).

A estrutura das MMPs possui um domínio catalítico conservado, seguido de um pró-peptídeo necessário para a manutenção da forma latente da enzima, juntamente com um peptídeo sinal que direciona a sua secreção na célula, além de uma região C-terminal denominada domínio hemopexina que contribui para a especificidade do substrato e para interação com os inibidores endógenos. Especialmente as MMP-7 e MMP-26 não possuem o domínio hemopexina, já as MMP-2 e MMP-9 incorporam três segmentos da região tipo II da FN. Em relação às MT-MMPs (MMPs de membrana apresentam a inserção do sítio de clivagem de furina entre o domínio catalítico e o pró-peptídeo **(Quadro 1 e Figura 2)** (FOLGUERAS et al., 2004; NAGASE et al., 2006; McCAW et al., 2007).

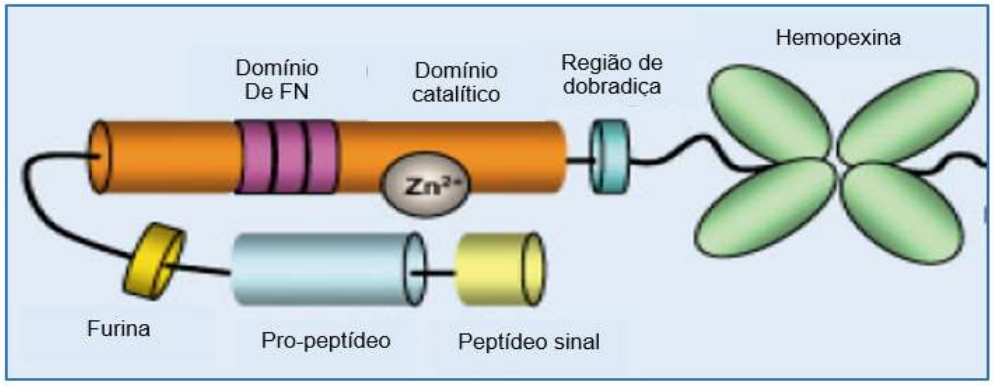
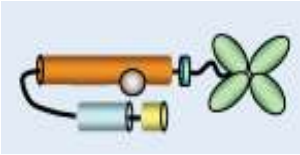
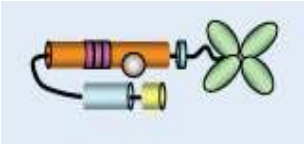
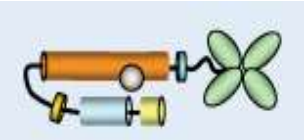
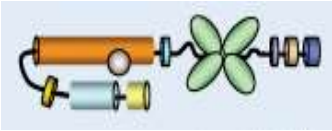
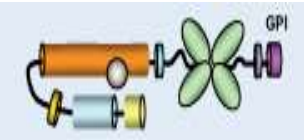
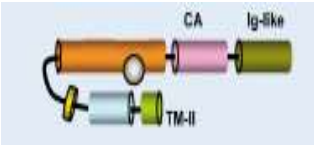


Figura 2 - Estrutura das MMPs e organização dos seus domínios. Fonte: Adaptado de Folgueras et al.,2004.

Quadro 1- Classificação estrutural, tipos e substratos das MMPs

Estrutura	Tipos	Substratos (MEC)
Arquetípicas 	Colagenases MMP-1,(MMP-1a e MMP1b), MMP-8 e MMP-13	Colágeno I, II, III, V e XI, FN, entactina, proteoglicanos, tenascina e osteonectina.
	Estromelisinas MMP-3 e MMP-10	Colágeno IV, V, IX e X, proteolicanos, FN, LN, entactina, osteonectina e fibrilina-1.
	MMP-12, MMP-19, MMP-20 e MMP-27	Colágeno IV, FN, LN, agrecan e tenascina.
Gelatinases 	Gelatinases MMP-2 e MMP-9	Colágeno I, IV, V, VII, X, IX, elastina FN, agrecan, sidecan IV, vitronectina e LN.
Matrilisinas	Matrilisinas MMP-7 e MMP-26	Colágeno IV, LN e entactina.
Furina- Ativavel 	MMP-11 (estromelisina) MMP-21 MMP-28	Colágeno, LN e FN.
  	MMP de membrana tipo I MT1-MMP (MMP-14), MT2-MMP (MMP-15), MT3-MMP (MMP-16) e MT5-MMP (MMP-24)	Colágeno I, II, III, FN, LN, vitronectina, proteoglicanos, fibrilina-1 e tenascina.
	MMP ancorada ao GPI MT4-MMP (MMP-17) e MT6-MMP (MMP-25)	Colágeno IV, FN, vimentina e proteoglicanos.
	MMP de membrana tipo II MMP-23A e MMP23B	N.D

Fonte: FOLGUERAS et al., 2004; NAGASE et al., 2006; PEREIRA et al., 2006; AMĂLINEI et al., 2007 ; FANJUL-FERNANDEZ et al., 2010; BONNANS et al., 2014.

GPI: Glicosilfofatidilinositol; N.D: Não Determinado

Algumas MMPs não são expressas constitutivamente, sua expressão é induzida por citocinas, fatores de crescimento ou alterações na interação célula-MEC e célula-célula (AMELINEI et al., 2007), que modulam a expressão gênica das MMPs. O TNF-α (fator de necrose tumoral alfa), TGF-β (fator de crescimento transformante beta) e IL-1 β (interleucina-1 beta) participam da indução da expressão gênica das MMPs em diferentes tecidos (BJORKLUND, KOIVUNEN, 2005).

As MMPs são sintetizadas na forma inativa denominada pró-enzimas. Isso ocorre devido à interação do zinco, que está no domínio catalítico, com o grupo Tiol da cisteina localizado na região do pró-peptídeo, denominada *cysteine switch.* Essa interção permite ao pró-peptídeo impedir que o domínio catalítico tenha contato com o substrato. A ruptura dessa interação zinco-tiol conduz à ativação da MMP no meio extracelular, ativação esta que pode ocorrer de diferentes formas. Na ativação alostérica ocorre a ruptura da interação zinco-tiol, sem a clivagem do pro-peptídeo, ocorrendo apenas modificação conformacional da MMPs, devido à ação de integrinas e proteoglicanos. Na ativação proteolítica, por ação de outras MMPs e proteínas serinas, ocorre a clivagem do pró-peptídeo da estrutura da MMPs. As MMPs que possuem o sítio de clivagem de furina são ativadas no meio intracelular antes de serem secretadas por ação da proteína furina que está presente no complexo de Golgi (VISSE, NAGASE, 2003, 2006; McCAW et al., 2007; RA, PARKS, 2007).

A atividade das MMPs é regulada por inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMPs) endógenos. Os TIMPs são constituídos por quatro membros: TIMPs 1, 2, 3 e 4 (STEVENSON, 2008). Os TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-4 estão presentes na forma solúvel, enquanto que o TIMP-3 está associada a moléculas da MEC, como heparan sulfato e outros proteoglicanos. A inibição das MMPs por ação dos TIMPs ocorre de forma reversível pela ligação ao domínio catalítico das MMPs. O TIMP-1 inibe várias MMPs, mas não é capaz de inibir MMPs de membrana tipo I e MMP-19, no entanto, é capaz de inibir as MMPs ancoradas ao GPI, que também são inibidas por outros TIMPs. Além disso, o TIMP-1 e TIMP-3 inibem a forma ativa e pró-enzima da MMP-9, enquanto que o TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 inibem a forma pró-enzima da MMP2 (NAGASE et al., 2006; ARPINO et al., 2015; ITOH, 2015).

1.5 Metaloproteinases de matriz (MMP-2 e MMP-9) e seus inibidores na hemopoese

A MMP-2 é expressa por vários tipos celulares, dentre eles os fibroblastos, células endoteliais, osteoblastos, monócitos, megacariócitos e eritroblastos. Já a MMP-9 é expressa por macrófagos alveolares, leucócitos polimorfonucleares, osteoclastos e megacariócitos (OGAWA et al., 2000; AMELINEI et al., 2007). Em relação aos seus inibidores, TIMP-1 e TIMP-2, foram detectados em megacariócitos, plaquetas, fibroblastos e macrófagos (MURATE et al., 1997). As MMP-2 e MMP-9, bem como seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2, participam da homeostasia tecidual e de processos tumorais, sendo encontrados em diversos tecidos, incluindo medula óssea (JANOWSKA-WIECZOREK et al., 1999; MARQUES-CURTIS et al., 2001).

As CTPH expressam o receptor *c-Kit*, que se associa ao *c-Kit ligand* (*Stem Cell Factor*- SCF). A molécula *c-Kit ligand* participa na manutenção do *pool* de CTPH no nicho endosteal (YIN; LI, 2006). A MMP-9 cliva o *c-Kit ligand* e a MMP-2 degrada a MEC que circunda a CTPH, resultando na migração dessa célula do nicho endosteal para o nicho vascular permitindo, assim, a diferenciação da CTPH em células hemopoéticas maduras. Essas MMPs também são capazes de romper as ligações de SDF-1/CXCR4, VCAM-1/VLA-4, que também são importantes para a retenção das CTPH na medula óssea (HEISSIG et al., 2002; SHIRVAIKAR et al., 2012).

Haviernik et al. (2008), relataram que camundongos TIMP-1 $^{-/-}$ e TIMP-2 $^{-/-}$ não apresentam alterações quantitativas em CTPH. Isso pode ter ocorrido devido à ação de outros de proteases sobre as MMP-2 e MMP-9, que participam na regulação da hemopoese.

Segundo MARQUES-CURTIS et al. (2001), a MMP-2 e MMP-9, bem como os seus inibidores, TIMP-1 e TIMP-2 estão presentes no microambiente hemopoético na medula óssea. Ainda segundo MARQUES-CURTIS et al., (2001), a concentração de MMP-9 diminui ao passo que a concentração de MMP-2 aumenta durante o estabelecimento do estroma medular ósseo *in vitro*. Além disso, a secreção de TIMPs aumenta durante o estabelecimento do estroma medular ósseo, inibindo assim a atividade das MMPs e, desta forma, preservando a integridade da MEC e participando da manutenção da hemopoese *in vitro*.

Camundongos MMP-9 $^{-/-}$ apresentaram uma hemopoese ineficaz e aumento da mortalidade após o tratamento com o mielossupresor 5-Fluorouracil (5-FC). A

medula óssea escassa de *clusters* de células hemopoéticas tanto no nicho endosteal, como no nicho vascular. No entanto, camundongos MMP-9 $^{+/+}$ apresentaram aumento da celularidade na medula óssea e aumento de *clusters* de células hemopoéticas tanto no nicho endosteal, como no nicho vascular, mesmo após do tratamento com 5-FC. Desta forma, a MMP-9 parece favorecer a diferenciação e a proliferação do *pool* de CTHP na medula óssea (HEISSIG et al., 2005)

Além disso, MMP-9 está presente, na forma inativa, nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos. No decorrer da inflamação ou infecção, os neutrófilos secretam MMP-9 para facilitar a migração para o tecido por meio da degradação da MEC. Segundo Kozaci et al. (2005), observaram que camundongos com restrição total ou parcial de proteína, oferecida na ração, apresentaram maior quantidade de MMP-9 por neutrófilos, em duas semanas de desnutrição, associado à maior quantidade de neutrófilos presentes no sangue periférico no mesmo período. No entanto, nas semanas seguintes de indução à desnutrição, esses camundongos apresentaram menor quantidade de MMP-9, que também se correlacionou com a menor quantidade de neutrófilos presentes no sangue periférico. Ainda segundo Kozaci et al. (2005), essas alterações quantitativas encontradas na MMP-9, podem estar associadas ao processo de adaptação do organismo para não perder proteínas em situação de desnutrição proteica.

Sendo assim, o equilíbrio entre as MMPs e TIMPs é essencial para a manutenção da estrutura e função do tecido mieloide. Alterações na expressão ou atividade das MMPs pode destruir o microambiente hemopoético resultando em alterações no tecido mieloide (YU; HAN, 2006).

1.6 Via de sinalização de AKT/mTOR

A proteína AKT (*Serine-Threonine Kinase*), conhecida também com PKB (Proteína Quinase B), possui três diferentes isoformas, AKT1, AKT2 e AKT3 e são expressas em humanos e em camundongos, a partir de três genes distintos (NERI et al., 2002; BONONI et al., 2011). O AKT participa de diversas funções celulares, como

crescimento, proliferação, migração, apoptose, angiogênese e metabolismo de glicose (MANNING; CANTLEY; 2007). Porém as diferentes isoformas de AKT podem estar envolvidas em funções distintas. As funções do AKT1 estão envolvidas com a sobrevivência celular, AKT2 conduz à manutenção da homeostase da glicose e o AKT3 participa no desenvolvimento neuronal (GONZALEZ, McGRAW., 2009).

Estruturalmente o AKT possui três regiões: um domínio denominado PH (*Pleckstrin Homology*), localizado na região N-terminal, o domínio catalítico da quinase, onde está presente o sítio treonina (T308) e o domínio C-terminal regulador que contém um segundo sítio de fosforilação, sítio serina (S473) (NICHOLSON; ANDRESON, 2002; SONG et al., 2005).

A via de sinalização de AKT pode ser iniciada por fatores de crescimento, citocinas (MANNING; CANTLEY; 2007) e por proteínas da MEC como a FN **(Figura 3)** (RITZENTHALER et al., 2008; JIN et al., 2011). Todos esses elementos conduzem à ativação de PI3K (Fosfotidilinositol 3-Kinase), um dímero formado por uma subunidade catalítica (p110α, p110β e p110γ) e uma subunidade reguladora (p85α, p85β e p55γ). PI3K fosforilado converte PIP2 (Fosfotidilinositol 4,5-Bifosfato) em PIP3 (Fosfatidilinositol-3, 4,5-Trifosfato) (BONONI et al., 2011; WILLEMS et al., 2012). Essa ação do PI3K fosforilado é controlada por PTEN, que desfosforila PIP3, agindo assim como um regulador negativo da ativação da via de sinalização (NICHOLSON, ANDERSON, 2001 BONONI et al., 2011). O PIP3 associa-se a PDK-1 (Proteína Quinase-1 Dependente de Fosfoinositídeo) que, por sua vez, fosforila AKT no sítio treonina (T308) (MANNING; CANTLEY; 2007) (**Figura 3**).

O AKT é fosforilado em vários sítios, mas a sua atividade depende da fosforilação do sítio treonina (T308) e do sítio serina (S473). O mTORC2 (mTOR Complexo 2), fosforila AKT no sítio serina (S473), mas os meios que conduzem à ativação de mTORC2 ainda não são bem compreendidos. Essa dupla fosforilação do AKT não depende uma da outra, mas é necessária a fosforilação dos dois sítios para que AKT exerça sua ação (FOSTER; FINGAR, 2010; VADLAKONDA et al., 2013).

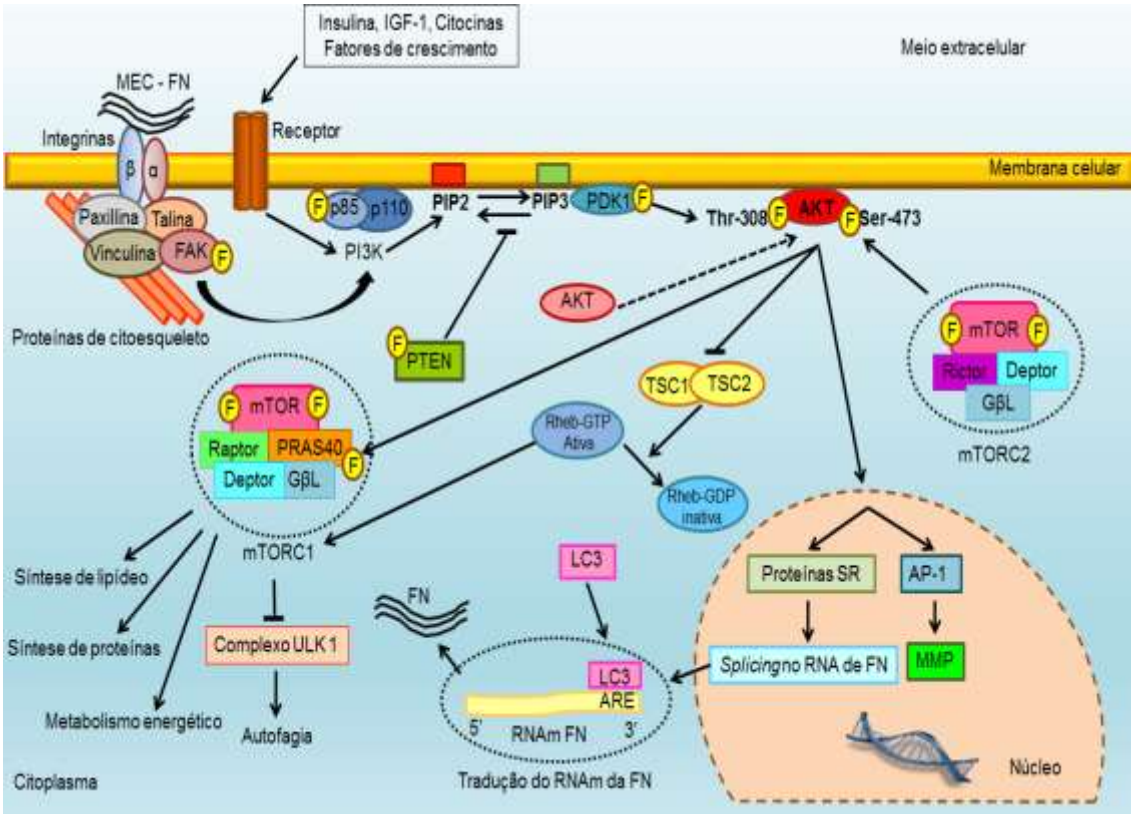


Figura 3 - Via esquemática de sinalização de AKT/mTOR e sua relação com a expressão de FN e suas isoformas e MMPs. Fonte: Adaptado de White et al., 2010.

O mTOR (Alvo de Rapamicina em Mamíferos) é uma proteína quinase que forma dois complexos distintos, denominados mTORC1 (mTOR Complexo 1) e mTORC2 (mTOR Complexo 2). O mTOR C1 é composto por seis proteínas, das quais podemos citar: raptor, GβL ou mLST8, Deptor e PRAS40. mTORC2 é composto por sete proteínas: rictor, GβL ou mLST8, deptor e protor 2 dentre outras. Esses dois complexos são ativados de formas distintas e regulam processos biológicos diferentes (ZONCU et al., 2010; LAPLANTE, SABATINI, 2012) (**Figura 3**).

O mTOR C1 é ativado por AKT, por meio do complexo TSC1/TSC2 (*Tuberous Sclerosis* 1/ 2) que é um regulador negativo do mTOR. AKT fosforilado inativa TSC1/TCS2, permitindo assim a ativação de uma GTPase, Rheb (*Ras Homoloque Enriched in Brain*), que se associa ao domínio quinase do mTOR, ativando-o (WULLSCHEGER et al., 2006; ZHOU et al., 2016) (**Figura 3**). O PRAS40 também é um regulador negativo de mTORC1. Quando fosforilado se associa-se ao raptor, que esta no complexo do mTORC1, participando assim da ativação dessa proteína (SANCAK et al., 2007). O mTORC1 ativado participa na regulação de alguns

processos celulares, tais como: síntese proteica, síntese de lipídeo, metabolismo energético e autofagia (LAPLANTE, SABATINI., 2012).

1.7 Regulação da fibronectina e metaloproteinases de matriz por meio da via de sinalização de AKT/mTOR

AKT fosforilado ativa as proteínas SR, proteínas com domínio rico em serina e arginina, que participam no controle de *splicing* alternativo (BLAUSTEIN *et al.,* 2005; LONG; CACERES, 2009). As proteínas SR, tais como SF2/ASF, SRp40 e SWAP estão envolvidas com o controle do *splicing* alternativo das regiões EDA, EDB e IIICS da molécula de FN, levando assim, à expressão de diferentes isoformas de FN (**Figura 3**) (WHITE et al., 2008).

Em nosso trabalho de mestrado (dados ainda não publicados) também foi observado *in vitro* que o estroma medular ósseo dos camundongos desnutridos apresentavam isoformas de FN diferentes do estroma dos camundongos do grupo controle (SILVA, 2011). Segundo WHITE el tal. (2008) e WHITE et al. (2010), a via de sinalização do AKT pode estar envolvida no processo de *splicing* alternativo da FN. Adicionalmente, dados preliminares de nosso laboratório indicam alterações nas concentrações de AKT total e fosforilado em células totais da medula óssea (BELTRAN, 2011).

Por outro lado, a via de sinalização de AKT está envolvida com a indução da expressão de MMP-2 e MMP-9 (JIN, E et al., 2007; JIN, Y et al., 2011). Segundo JIN, Y et al. (2011), a FN induz a expressão de MMP-9 por meio da ativação de AP-1 ativado pela via de sinalização de AKT por VLA-5, principal integrina de interação com a FN e que está presente na CTPH, e que também estaria envolvida na expressão de MMP-9 **(Figura 3)**. Dessa forma, a via de sinalização do AKT é um elemento comum entre a FN e MMP.

1.8 Regulação da fibronectina por meio do LC3

O LC3 (*Light Chain* 3) também conhecido como MLP3 (*Microtubule-Associated Protein*) foi descrito como proteína associada aos microtúbulos em células neurais de bovino (MANN, HAMARBACK., 1994). Foram identificados três genes de LC3 em humanos, LC3α, LC3β e LC3γ, mas apenas dois genes foram identificados em camundongos, o LC3α e LC3β (He et al., 2003). Pró-LC3 é clivado na região c-terminal pelo Atg4, que é uma cisteína-protease, dando origem assim a forma citosolica do LC3, denominado LC3-I. O LC3-I pode ser conjugado com um glicofosfolipídio, fosfatidiletanolamina, pelas proteínas Atg7 e Agt3, formando assim a forma lipidada do LC3, denominada LC3-II (TANIDA et al., 2004; ZHOU et al., 2016).

O RNAm das isoformas de LC3 é expresso em diferentes tecidos, mas com distinto padrão de expressão. O LC3α e LC3β é expresso no coração, cérebro, músculo esquelético e testículo, mas o LC3β não é expresso no timo e o LC3α não é expresso em leucócitos do sangue periférico (He et al., 2003). As três isoformas de LC3 estão localizadas em diferentes regiões da célula, podendo também estar colocalizadas, sugerindo que essas isoformas possuem funções biológicas distintas (KOUKOURAKIS et al., 2014). O LC3 é utilizado como um marcador da autofagia, sendo esse processo a manutenção do equilíbrio entre a demanda de nutrientes e o requerimento energético durante a homeostase normal da célula (NEIL et al., 2014; ZHOU et al., 2016).

Zhou et al. (1997), observaram que LC3 e o RNAm de FN estão colocalizados na região perinuclear e que células musculares lisas do ducto arterioso que apresentam alta expressão de LC3 têm aumento da síntese de FN. Isso sugere que o LC3 liga-se à região ARE (*AU-rich element*) localizada na região 3’ do RNAm, por ter uma sequência similar às proteínas ligadoras de RNAm, assim favorecendo a tradução do RNAm da FN **(Figura 3).** A colocalização de LC3 com o RNAm de FN é necessaria para o controle da tradução do RNAm (ZHOU, RABINOVITCH, 1998). Cann et al. (2008), observaram que fibroblastos embrionários LC3β $^{-/-}$ apresentaram menor expressão proteica de FN, devido a menor tradução do RNAm de FN. Quando estas células são transfectadas com plasmídeo de LC3, a síntese de FN aumenta.

2. HIPÓTESE E OBJETIVO

Em virtude das alterações já encontradas na MEC do estroma medular ósseo e a possível relação das alterações de FN com o comprometimento da hemopoese, observado em camundongos desnutridos, nossa hipótese é que as alterações quantitativas e qualitativas da FN no estroma medular ósseo, podem ser devido a modificações em sua síntese por meio da via de sinalização AKT/mTOR, LC3 e ou por ação de MMPs e TIMPs. Sendo assim, o objetivo deste estudo é elucidar os mecanismos que conduzem as alterações de FN no estroma medular ósseo em modelo murino de desnutrição proteica. Para atingir este objetivo, foi proposto o seguinte delineamento experimental:

- Indução da desnutrição pela utilização de dieta hipoprotéica e avaliação do estado nutricional dos camundongos por meio do consumo de rações normoprotéica e hipoprotéica, avaliação do peso corpóreo, dosagem de proteínas totais e albumina plasmática;
- Avaliação do perfil hematológico dos camundongos por meio da determinação do hemograma, mielograma e análise histopatológica da medula óssea corada por H.E;
- Determinação de FN, MMP-2 e MMP-9 em corte histológico de medula óssea por imunohistoquímica;
- Análise da expressão gênica de FN e suas isoformas *ex vivo* e *in vitro*;
- Estabelecer, *in vitro,* o estroma medular ósseo utilizando o sistema de culturas de longa-duração tipo Dexter a partir das células totais da medula óssea. Após o estabelecimento do estroma medular ósseo, serão avaliadas:
    - proteínas da via de sinalização de AKT/mTOR e LC3β por *Western Bloting,*
    - atividade enzimática de MMP-2 e MMP-9 por ensaio de atividade enzimática e zimografia,
    - concentrações de TIMP-1 e TIMP-2 por ELISA,
    - citocinas TGF-β, TNF-α e IL-1 (que controlam a expressão de MMP-2 e MMP-9) por ELISA,
    - expressão gênica de FN e suas isoformas, MMP-2, MMP-9 , TIMP-1, TIMP-2, AKT, mTOR, LC3α e LC3β.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Camundongos

Foram utilizados 200 camundongos da linhagem **C57Bl/6J**, machos, com 60 dias de idade, oriundos de colônias do biotério de Produção e Experimentação Camundongo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Este projeto foi submetido à Comissão de Ética em Experimentação Camundongo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEEA/FCF), e aprovado conforme o protocolo (Protocolo CEUA/FCF/348). (Anexo A).

3.2 Rações

As rações utilizadas para a realização deste projeto foram preparadas de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para camundongos recém-desmamados (AIN93G modificada) e adultos (AIN93M modificada) (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997).

Foram preparados três tipos de rações; **ração de crescimento,** contendo 17% de proteína, segundo a AIN93G modificada (**Tabela 1**), **ração controle ou normoprotéica** contendo 12% de proteína e **ração hipoprotéica** contendo 2% de proteína, segundo a AIN93M modificada (**Tabela 2**) (BORELLI et al., 2007). As rações foram preparadas em nosso laboratório na forma de granulado e conservadas a 4°C até o momento do uso.

As rações de crescimento, controle e hipoprotéica são isocalóricas e diferem apenas no conteúdo proteico. A fonte de proteína utilizada foi a caseína (LABYNTH). Entretanto, como aproximadamente 80% do fosfato advêm da caseína, e com menor quantidade da caseína na ração hipoprotéica a quantidade de fosfato disponível é menor, sendo, portanto, necessário corrigir-se a concentração de fosfato na mistura salínica da ração hipoprotéica. Esta correção ocorreu por meio do aumento do fosfato de potássio monobásico, no entanto, para não aumentar as concentrações

de potássio foi retirado o citrato de potássio da mistura salínica, da ração hipoprotéica (**Tabela 4**). No caso da ração de crescimento também foi realizada a correção do fosfato em função da maior concentração de caseína, sendo assim diminui-se as concentrações de fosfato de potássio monobásico e manteve-se a concentração de citrato de potássio (**Tabela 4**). A mistura vitamínica não diferiu entre as rações (**Tabela 3**). A concentração proteica da caseína e das rações foram determinadas pelo método micro-Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) (T**abela 5**) e foram 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 da ração de crescimento (AIN93G modificada)

Constituintes	**Ração de crescimento**
Proteínas (%)	17
Mistura salínica (g)**	175
Mistura vitamínica (g)*	50
Fibra alimentar (celulose) (g)	250
Óleo de milho (g)	350
Sacarose (g)	500
L-cistina (g)	15
Bitartarato de Colina (g)	12
Tert-butilhidroquinona (mg)	0,07
Amido de milho q.s.p. (g)	5000

***Tabela 3**, ****Tabela 4**

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

Tabela 2 - Composição das rações controle e hipoprotéica (AIN93M modificada)

Constituintes	Ração controle	Ração hipoprotéica
Proteínas (%)	12	2
Mistura salínica (g)**	175	175
Mistura vitamínica (g)*	50	50
Fibra (celulose) (g)	250	250
Óleo de milho (g)	400	400
Sacarose (g)	500	500
Metionina (g)	7,5	7,5
Colina (g)	12,5	12,5
Tert-butilhidroquinona (mg)	0,04	0,04
Amido de milho q.s.p. (g)	5000	5000

***Tabela 3**, ****Tabela 4**
Dietas isocalóricas de 3601,0 kcal/kg de ração. g = grama

Tabela 3 - Composição da mistura vitamínica

Constituintes	Quantidade (g/Kg de mistura vitamínica)
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-Hl	0,70
Tiamina-Hl	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

Mistura vitamínica utilizada nas rações de crescimento, controle e hipoprotéica. (REEVES,1993)

Tabela 4 - Composição da mistura salínica

Constituintes	Ração de crescimento (g/Kg)*	Ração controle (g/Kg)*	Ração hipoprotéica (g/Kg)*
Carbonato de cálcio anidro	357,00	357,00	357,00
Fosfato de potássio monobásico	196,58	258,75	263,45
Cloreto de sódio	74,00	74,00	74,00
Citrato de potássio	70,29	12,87	0,00
Sulfato de potássio	46,00	46,60	46,60
Óxido de magnésio	24,00	24,00	24,00
Citrato férrico	6,06	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65	1,65
Carbonato de manganês	0,63	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30	0,30
Iodato de potássio	0,01	0,01	0,01
Selenato de sódio anidro	0,01025	0, 01025	0, 01025
Paramobilidato de amônio 4 H_2O	0,00795	0, 00795	0, 00795
Meta-silicato de sódio 9 H_2O	1,45	1,45	1,45
Sulfato de potássio e crômio	0,275	0, 275	0, 275
Cloreto de lítio	0,0174	0, 0174	0, 0174
Ácido bórico	0,0815	0, 0815	0, 0815
Fluoreto de sódio	0,0635	0, 0635	0, 0635
Carbonato de níquel	0,0318	0, 0318	0, 0318
Vanadato de amônio	0,0066	0, 0066	0, 0066
Sacarose	221,54	216,186	225,36

(REEVES,1993). *(g/Kg de mistura salínica)

Tabela 5 - Concentração proteica das rações utilizadas no experimento

	Rações		
Parâmetro	Crescimento N=10	Controle N=15	Hipoprotéica N=12
Proteína Total(%)	18,10 (17,23-18,97)	12,82 (12,50-13,13)	2,77 (2,66-2,87)

Determinação da concentração proteica das rações realizadas pelo método de Micro-Kjeldahl. Os valores estão apresentados por média e (intervalo de confiança de 95%). N indica o número de rações utilizadas.

3.3 Indução da desnutrição

Os camundongos recém-desmamados, com 21 dias de idade, foram mantidos em gaiola com maravalha e receberam ração de crescimento segundo a AIN93G modificada e água *ad libitum*, por 30 dias, sendo mantidos sob temperatura ambiente de 22 a 25 °C, ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luzes acesas as 6:00 da manhã e desligadas às 18:00), umidade de 55 ± 10%. Durante este período os camundongos foram pesados a cada 48 horas.

Ao completar 60 dias de idade (idade adulta) os camundongos foram previamente pesados, separados e colocados individualmente em gaiolas (Tecniplast). Sendo mantidos sob temperatura ambiente de 22 a 25 °C, ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luzes acesas as 6:00 da manhã e desligadas às 18:00), umidade de 55 ± 10%. Durante o período de duas semanas os camundongos receberam uma ração segundo a AIN93M modificada e água *ad libitum*. Os camundongos foram pesados a cada 48 horas. Após este período de adaptação os camundongos foram separados aleatoriamente em dois grupos: **nutrido ou controle (C)** alimentados com ração controle; e **desnutrido (D),** que passaram a receber ração hipoprotéica segundo a AIN93M modificada (Du et al., 2000; BORELLI et al., 2007), permanecendo individualmente em gaiolas. Após cinco semanas, os camundongos de ambos os grupos foram eutanasiados para obtenção do material biológico (**Figura 4**).

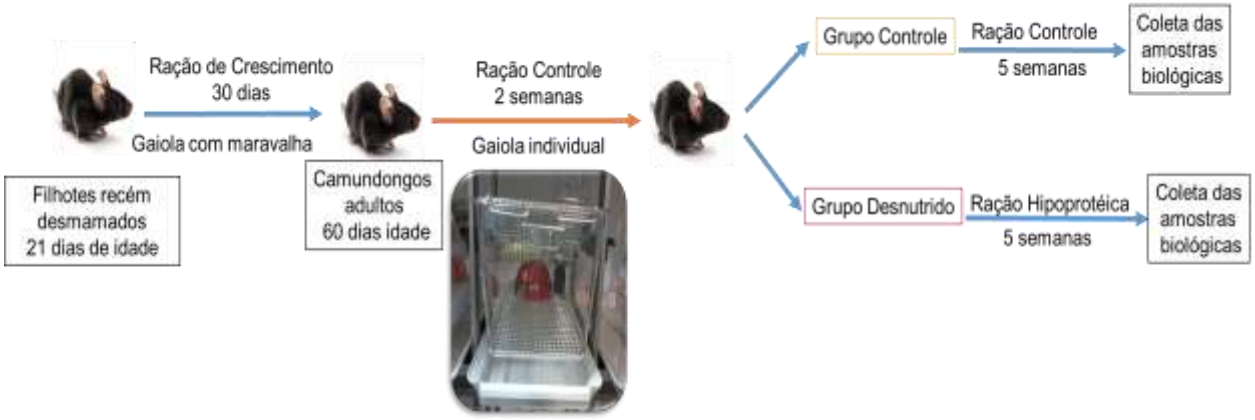


Figura 4 - Figura esquemática referente ao delineamento experimental de indução a desnutrição durante o crescimento e desnutrição dos camundongos.

3.4 Avaliação do estado nutricional dos camundongos

A avaliação do estado nutricional dos camundongos foi baseada na determinação do peso corporal, consumo de ração a cada 48 horas e na análise da concentração de proteínas totais e albumina plasmáticas.

3.5 Obtenção das amostras biológicas

As amostras biológicas de sangue total, foram obtidas após os camundongos serem previamente anestesiados com xilazina (16 mg/kg de peso corporal) e cetamina (120 mg/kg de peso corporal). Após a coleta os camundongos foram eutanasiados por super dosagem de anestésico para coleta dos fêmures e tíbias para obtenção de células da medula óssea.

3.6 Hemograma e contagem de reticulócitos

As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção do plexo axilar dos camundongos previamente anestesiados, utilizando-se solução de EDTA 10% em PBS 1x pH 7,45, como anticoagulante. Estas amostras foram utilizadas para a contagem global de hemácias, hematócrito, dosagem de hemoglobina e leucócitos em contador automático ABX VET®, HORIBA. Também foram realizadas extensões sanguíneas, posteriormente coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) e analisadas ao microscópio óptico para a contagem diferencial de leucócitos circulantes e análise morfológica. Os reticulócitos foram determinados em extensão sanguínea após coloração das células sanguíneas com a coloração supra vital de Novo Azul de Metileno (BRECHER, 1949) e analisadas sob microscopia de luz convencional, utilizando-se o aumento de 1000X..

3.7 Determinação de proteínas totais e albumina plasmática

As amostras de sangue foram obtidas de acordo com o item 3 5. Após a coleta, as amostras foram imediatamente centrifugadas (2000xg por 20 minutos, a 4ºC). O plasma foi retirado e congelado em *freezer* a -40°C, onde permaneceu até a realização das análises. 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 (VarioskanFlash® - Thermo Scientific) , em 545nm (proteínas totais) e 600nm (albumina).

3.8 Obtenção de células da medula óssea para realização do mielograma

Para a realização do mielograma foram coletadas células da medula óssea obtidas por meio de lavagem da cavidade medular de ambos os fêmures e tíbias dos camundongos com meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove, contendo L-glutamina, HEPES e bicarbonato (Sigma-Aldrich), e suplementado com 10% soro equino (Stemcell Technologies), 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 contendo células, preparadas por citocentrifugação da suspensão celular e, posteriormente, coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). Estas lâminas foram analisadas sob microscópio de luz para a contagem diferencial das diferentes populações celulares presentes na medula óssea, sendo contadas pelo menos 300 células por lâmina/camundongo.

3.9 Estabelecimento do estroma medular ósseo: Culturas de longa duração

O estabelecimento do estroma medular ósseo foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Spooncer et al., (1993). A coleta das células da medula óssea foi realizada em fluxo laminar, em condições assépticas. As células da medula óssea

foram obtidas conforme descrito no item 3.7 com 4mL para cada fêmur e 2 mL para cada tíbia de meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove, contendo L-glutamina, HEPES e bicarbonato (Sigma-Aldrich), e suplementado com 10% soro equino (Stemcell Technologies), hidrocortisona (1 µmol/L), 100 UI/mL de penicilina G sódica e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich). A viabilidade celular foi realizada com azul de Tripan 1% em PBS 1X pH7,4 no hemocitômetro de Neubauer. As células foram plaqueadas (1,91x 10^6 células/mL/poço) em placas aderentes (TPP) de 24 poços, com meio MyeloCult® M5300 (Stemcell Technologies) suplementado com hidrocortisona (1 µmol/L) (Sigma-Aldrich) e mantidas em estufa com atmosfera úmida, a 33ºC e com 5% de CO_2, por 28 e 35 dias.

A concentração de CO_2 no interior da incubadora e a temperatura foram aferidas diariamente.

O meio de cultura foi parcialmente (50% do volume) trocado a cada sete dias. O crescimento celular e o estabelecimento do estroma foram avaliados no 3º, 7º, 14º, 21º, 28º e 35º dias, após o plaqueamento, utilizando-se o microscópio de luz, invertido, Nikon Eclipse TS100, com aumento de 40X (Dexter et al*.,* 1977; Toksoz et al., 1980).

3.10 Extração de proteínas totais do estroma medular ósseo *in vitro*

Após o estabelecimento do estroma medular ósseo como descrito no item 3.8, foi realizada a extração de proteínas totais das células e da MEC na cultura de 28º e 35º dias 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 µL de tampão RIPA® (Thermo Scientific) (25mM Tris-HCL pH7,6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio e 0.1% SDS) para lise celular, contendo ainda *cocktail* de inibidores para proteases (AEBSF, aprotinina, hidrocloreto de bestatina, E-64, EDTA, hemisulfato de leupeptina e PMSF) e fosfatases (50mM de NaF) (Sigma-Aldrich). Em seguida, com o auxílio de uma espátula (*scraper*) foi obtido o lisado celular. Este lisado foi centrifugado a 14000xg por 15 minutos a 4°C, para sedimentação do *debri*s celular. Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, alíquotado e congelado em *freezer* a -40°C até a realização da dosagem de proteína e análises de *western blotting.*

3.11 Determinação de proteínas totais extraídas do estroma medular ósseo *in vitro*

As proteínas totais do extrato celular obtidas conforme descrito no item 3.9, foram determinadas pelo *Kit* comercial BCA (Thermo Scientific). Todas as amostras foram processadas em duplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro (VarioskanFlash® - Thermo Scientific), em 540nm.

3.12 Determinações de proteínas na via de sinalização do AKT, mTOR e a proteína LC3β por *Western blotting*

Após a obtenção das proteínas da cultura de estroma medular ósseo de acordo com o item 3.10, as amostras foram diluídas em Tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 300mM pH 6,8, contendo 0,01% de azul de bromofenol, 10% de SDS, 50% de glicerol e 10% de β-mercaptoetanol) na proporção de 1 parte de tampão para 4 partes da amostra, deixando-se amostra a 70ºC durante 10 minutos para a desnaturação. As amostras foram armazenadas em *freezer* -40°C até o momento da análise.

Foi utilizado gel gradiente 4 – 20% (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels, Bio-Rad Laboratories, Inc) para a determinação de LC3β e para as outras proteínas analisadas foi utilizado gel de 7%. Para as determinações foram utilizados padrão de peso molecular 260 kDa a 10 kDa (Spectra® Multicolor Broad Range- Thermo Scientific), 30 µg/mL de proteína do extrato celular e membrana de PVDF (Polyvinylidene Fluoride). O bloqueio foi realizado em solução de TBS (Tampão Salina Tris) 1X pH 7,4 contendo 0.1% de Tween-20 e 5% de leite desnatado (Molico® - Nestlé) por 1 hora, sob leve agitação, à temperatura ambiente. Os anticorpos primários utilizados bem como as diluições estão listados no **Quadro 2**. Os anticorpos primários foram diluídos em TBS 1X pH 7,4 contendo 0.1% de Tween-20 e 5% de albumina bovina fração V (Inlab). A incubação com anticorpo primário foi mantida *overnight*, a 4ºC. O anticorpo secundário utilizado (Anti-Rabbit IgG, HRP-*linked- Cell* Signaling Technology) foi diluído na proporção 1:1000 em TBS 1X pH 7,4 contendo 0.1% de Tween-20 e 5% de albumina bovina fração V (Inlab) e a incubação ocorreu no período de uma hora, a temperatura ambiente e sob leve

agitação.

Quadro 2 - Proteínas analisadas e anticorpos utilizados no *western blotting.*

Proteína e peso molecular	Anticorpo e diluição
AKT total 60 kDa	#4691 AKT (pan) (C67E7) Rabbit mAb monoclonal 1:1000 *
AKT-fosforilado (serina) 60 kDa	#4060 Phospho-Akt (Ser473) (D9E) XP® Rabbit mAb monoclonal 1:1000 *
AKT-fosforilado (Treonina) 60 kDa	#2965 Phospho-Akt (Thr308) (C31E5) Rabbit mAb monoclonal 1:1000 *
PTEN fosforilado (serina) 60 kDa	#9551 Phospho-PTEN (Ser380) Rabbit policlonal 54KDa 1:1000 *
PDK-1 total 58-68 kDa	#3062 PDK1 Rabbit policlonal 1:1000*
PDK-1 fosforilado (serina) 58-68 kDa	#3438 Phospho-PDK1(Ser241) (C49H2) Rabbit mAb monoclonal 1:1000 *
PI3K p85 total 85 kDa	#4257 PI3 Kinase p85 (19H8) Rabbit mAb monoclonal 1:1000*
PI3K p55/p85 fosforilado (tirosina) 60-85 kDa	#4228 Phospho-PI3 Kinase p85 (Tyr458) / p55 (Tyr199) Rabbit policlonal 1:1000*
mTOR total 284 kDa	#2983 mTOR (7C10) Rabbit mAb monoclonal 1:1000 *
mTOR fosforilado (serina) 284 kDa	#5536 Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2) XP® Rabbit mAb monoclonal 1:1000 *
mTOR fosforilado (serina) 284 kDa	#2974 Phospho-Mtor (Ser2481) Rabbit policlonal 1:1000 *
Raptor total 150 kDa	#2280 Raptor (24C12) Rabbit mAb monoclonal 1:1000*
Raptor fosforilado (serina) 150 kDa	#2083 phospho-Raptor (Ser792) Rabbit policlonal 1:1000*
Rictor 200 kDa	#2114 Rictor (53A2) Rabbit mAb monoclonal 1:1000 *
GβL 37 kDa	#3274 GβL (86B8) Rabbit mAb monoclonal 1:1000 *
PRAS40 total 40 kDa	#2691 PRAS40 (D23C7) XP® Rabbit mAb monoclonal 1:1000*
PRAS40 fosforilado (treonina) 40kDa	#2997 Phospho-PRAS40 (Thr246) (CD77D7) Rabbit mAb monoclonal 1:1000*
LC3β 14-16 kDa	#2775 LC3β Rabbit policlonal
B-actina 43 kDa	#A3854 Anti-β-Actin-Peroxidase clone AC-15 monoclonal 1:40000 **

* Cell Signaling Technology
** Sigma-Aldrich

Foi realizada a detecção por quimioluminescência utilizando o *kit* de revelação ECL (ECL Prime® *Western Blotting Detection Reagents*, Amersham GE) no equipamento ImageQuant 400® (GE, Healthcare). A aquisição da imagem e análise foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL®. Para a quantificação das proteínas de interesse foi utilizada a marcação de β-actina, para normalização.

3.13 Carenciamento das culturas de longa duração

Para a realização das análises de zimografia e ensaios de atividade das MMP-2 e MMP-9 foi realizado o carenciamento das culturas, pois tanto o soro equino como o soro fetal bovino contêm MMPs (HAWKES et al., 2001).

Após o estabelecimento do estroma medular ósseo como descrito no item 3.9, nos 28º e 35º dia de cultivo foi retirado todo o meio de cultura da placa. Após a retirada do meio de cultura, cada poço foi lavado uma vez com 1,0 mL de PBS (Tampão Fosfato Salina) estéril (pH 7,4). Em seguida o estroma foi cultivado com meio de cultura Dulbecco modificado por Iscove, contendo L-glutamina, HEPES e bicarbonato (Sigma-Aldrich) contendo 1% albumina bovina fração V (Inlab), e as culturas mantidas em estufa com atmosfera úmida, a 33ºC e com 5% de CO_2 por 48 horas (período de carenciamento). Depois deste período o sobrenadante de cada poço foi coletado, centrifugado e acrescido um *cocktail* de inibidores de proteases (AEBSF, aprotinina, bestatina, E-64, leupeptina, pestatina A e PMSF) livre de EDTA (Halt™ Proteases Inhibitor Cocktail, EDTA-Free - Thermo Scientific) e fosfatases (50mM de NaF) (Sigma-Aldrich). O sobrenadante foi congelado em *freezer* a -40°C até a realização das análises.

3.14 Zimografia

Para avaliar a atividade das MMP-2 e MMP-9 em suas formas pró-enzima e ativa foi realizado o ensaio qualitativo de zimografia (HAWKES et al., 2001, SNOEK-

VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005, TOTH et al., 2012).

Foi usado como controle positivo o sobrenadante da cultura de células de fibrosarcoma humano HT1080 obtidas na ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) (Oh et al., 2001), por produzirem MMPs. A HT1080 foi cultivada com meio de cultivo com DMEM alta glicose contendo 10 % de soro bovino fetal (Vitrocell) e mantidas em estufa com atmosfera úmida, a 37ºC e com 5% de CO_2. Após a confluência destas células, as mesmas foram carenciadas como descrito no item 3.13.

Após a quantificação das proteínas totais (*Kit* BCA- Thermo Scientific) do sobrenadante das culturas carenciadas como descrito no item 3.13, as amostras foram diluídas em Tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 300mM pH 6,8, contendo 0,01% de azul de bromofenol, 10% de SDS, 50% de glicerol) livre β-mercaptoetanol, na proporção de 1 parte de tampão para 4 partes de amostra, sem aquece-las.

A eletroforese foi realizada em gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) 10%, de 1 mm, contendo 5 mg/mL de gelatina oriunda da pele de suíno (Bio-rad Laboratories). Para a eletroforese foi aplicado 200µg/mL de proteína do sobrenadante, em 50V a 400mA por 30 minutos e 100V a 400mA até as amostras atingirem o fim do gel. Imédiatamente após a eletroforese o gel foi lavado três vezes (15 minutos cada lavagem), em solução 2,5% de Triton X-100 para remover o SDS. A seguir o gel foi incubado com tampão (50mM Tris/HCL, 10mM $CaCl_2$ e 0,1µm $ZnCl_2$) por 18 horas a 37°C. Após este período o gel foi corado com azul de Coomasie brilhante R-250 0,5% (Sigma-Aldrich™) e descorado com 10% de metanol e 10% de ácido acético, para visualização das bandas no gel.

A aquisição da imagem do gel foi realizada utilizando um densitometro (ImageScanner III® - GE Healthcare Life Sciences) e software LabScan. Para análise foi utilizando o software ImageQuant TL™.

Como controle negativo foram utilizados outros dois géis que foram incubados com tampão contendo 50mM Tris/HCL, 10mM $CaCl_2$, 0,1µm $ZnCl_2$ e 10mM EDTA dissódico ou com tampão contendo 50mM Tris/HCL, 10mM $CaCl_2$, 0,1µm $ZnCl_2$ e 5mM de fenantrolina 1-10 (Sigma-Aldrich). Estes controles foram utilizados afim de confirmar que a degradação da gelatina contida no gel da eletroforese foi realizada apenas por MMPs presentes nas amostras, pois o EDTA é quelante de cálcio e a fenantrolina é quelante de zinco e ambos importantes para a ação das MMPs

(HAWKES et al., 2001, SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005, TOTH et al., 2012).

3.15 Ensaio de atividade de MMP-2 e MMP-9 *in vitro*

Para quantificar a atividade da MMP-2 e MMP-9 em concentrações endógenas e total (forma inativa e ativa) foi utilizado o sistema de ensaio de atividade Biotrak® (GE Healthcare Life Sciences). Foram utilizados sobrenadante do estroma medular ósseo *in vitro* obtidos nos 28º e 35º dia de cultivo, como descrito no item 3.13. Como controle positivo foi utilizado o sobrenadante de cultura de células de fibrosarcoma humano HT1080 (Oh et al., 2001), que produzem MMPs.

Para a quantificação da atividade da MMP-2 e MMP-9 total (forma inativa e ativa) foi utilizado uma solução de APMA 0,05mM e 1mM respectivamente. O APMA (*p-Aminophenylmercuric acetate*) ativa as formas inativas da MMP-2 e MMP-9.

Todas as amostras foram processadas em duplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro (BioTek™), em 405nm, no tempo 0 e 1 hora para MMP9 e tempo 0 e 3 horas para MMP2. Previamente já havíamos realizado testes pilotos para determinar o melhor período de incubação e de leitura para cada ensaio.

3.16 Quantificação de TIMP-1 e TIMP-2 *in vitro*

Para quantificação de TIMP-1 e TIMP-2 foram utilizados os sobrenadantes do estroma medular ósseo *in vitro* obtidos nos 28º e 35º dia de cultivo, submetidas ao carenciamento. A quantificação foi realizada por meio do ensaio de ELISA, utilizando um *Ki*t comercial da Abcam. A reação foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, sendo as concentrações obtidas por meio de uma curva padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (BioTek), em 450nm.

3.17 Avaliação das citocinas sintetizadas no estroma medular ósseo *in vitro*

Para quantificação das citocinas, TNF-α, TGF-β e IL-1β, foram utilizados os sobrenadantes das culturas de longa duração nos 28º e 35º dia de cultivo. A quantificação foi realizada por meio do ensaio de ELISA, utilizando *Kit* comercial, Quantikine® ELISA da R&D Systems. A reação foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as amostras foram analisadas em duplicata, sendo as concentrações obtidas por meio de uma curva padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (VarioskanFlash® - Thermo Scientific), em 450mm e 540nm. Em todos os ensaios foram utilizados como controles, proteínas recombinantes (R&D Systems).

Para quantificação de TGF-β, as amostras foram previamente tratadas com as soluções de 1N HCL e 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES, de acordo com as recomendações do fabricante, e o pH das amostras foram mantidos entre 7,2-7,6. As concentrações mensuradas de TGF-β foram corrigidas pelo fator de diluição.

3.18 Análises histopatológica da medula óssea

Após a eutanásia dos camundongos por super dosagem de anestésico, os fêmures foram coletados para análise histopatológica da medula óssea.

Os fêmures foram fixados em solução de paraformaldeído 1,4%, durante 24 horas, com troca após 12 horas. Posteriormente foram lavados em tampão fosfato com sacarose, e mantidos no mesmo tampão durante seis horas. Depois deste período os fêmures foram desidratados gradativamente em solução de etanol 70% a 100%, durante uma hora cada. Em seguida foram mantidos em duas incubações de xilol durante três horas cada e mantidos em solução de resina (Technovit® 9100 Methyl Metacrylate (MMA) com xilol por 12 horas. Seguidamente os fêmures foram incubados em resina com reagente polimerizante durante 24 horas. Após este período os fêmures foram incubados em resina com reagente polimerizante e polimetilmetacrilato (PMMA) durante 24 horas. Todas as etapas anteriores foram realizadas a 4°C. Posteriormente os fêmures foram incluídos em solução de

polimerização e permaneceram a -20°C durante 48 horas.

Para obtenção dos cortes histológicos os fêmures, já incluídos, foram cortados em micrótomo (RM2245 – Leica). Os cortes, de 5µm de espessura foram montados em lâminas de vidro cobertas com poli-lisina.

3.19 Coloração de hematoxilina e eosina

Para a realização da coloração de hematoxilina e eosina, os cortes dos fêmures foram previamente incubados duas vezes com xilol por cinco minutos, 2-metiletoxieacetato (Merck) por cinco minutos e duas vezes com acetona por cinco minutos, para a remoção da resina. Logo após os cortes foram hidratados em solução de álcool 95%, álcool 70% e água bidestilada por dois minutos cada, seguidamente foram corados com Hematoxilina de Mayer (Merck) por cinco minutos e Eosina y- Solução aquosa 0,5% (Merck) por quatro minutos. Depois da coloração os cortes foram desidratados gradativamente em solução de álcool 70% a 100%, e incubados em xilol para a montagem da lâmina em meio de montagem (Entellan). Todas as etapas anteriores foram realizadas à temperatura ambiente.

Foi realizada a análise e as fotomicrografia dos cortes histológicos dos fêmures em de microscópio óptico Nikon Eclipse 80i® e Software NIS-Elements A 3.1.

3.20 Análise de fibronectina, MMP-2 e MMP-9 por imunohistoquímica

Para a análise de FN, MMP-2 e MMP-9 na medula óssea, os cortes dos fêmures foram previamente incubados duas vezes com xilol por cinco minutos, 2-metiletoxieacetato (Merck) por cinco minutos e duas vezes com acetona por cinco minutos, para a remoção da resina. Logo após os cortes foram hidratados em solução de álcool 95%, álcool 70% e água bidestilada por dois minutos cada, em seguida os cortes foram incubados com tampão citrato por 20 minutos a 60°C, para recuperação antigênica e solução de peróxido de hidrogênio 3% para o bloqueio de

peroxidade endógena, por 15 minutos à temperatura ambiente. Os cortes foram incubados em solução *Protein Block* (Spring Bioscience) para o bloqueio de ligações inespecificas por 10 minutos a temperatura ambiente e seguidamente incubados com anticorpo primário (*Anti-Fibronectina Rabbit policlonal*; abcam ab23750, Anti-MMP-2 *mouse monoclonal*; abcam ab86607, Anti-MMP-9 *mouse monoclonal*; abcam ab119906, Abcam) diluídos em solução diluente (Spring Bioscience) na proporção 1:400, 1:2000 e 1:3000 respectivamente em câmara úmida, *overnight* a 4°C. Foi utilizado o sistema de detecção *Simple Stain Mouse MAX PO (R)* (N-Histofine® Nichirei), método UIP (*Universal Immuno-enzyme Polymer*) livre de biotina, para anticorpos produzidos em coelho e *MOUSESTAIN KIT* (N-Histofine® Nichirei), método UIP (*Universal Immuno-enzyme Polymer*) livre de biotina, para antiporcos produzidos em camundogos. A reação foi realizada de acordo com as recomendações do fabricante. Foi utilizado DAB *Substrate System*® (DAB Chromogen / DAB Substrste, Spring Bioscience) sobre os cortes, ao abrigo da luz, por 10 minutos. Após este período os cortes foram lavados com água destilada, três vezes de cinco minutos cada e contracorados com Hematoxilina de Mayers (Merck) por um minuto. Depois os cortes foram desidratados gradativamente em solução de álcool 70% a 100%, e incubados em xilol para a montagem da lâmina em meio de montagem (Entellan).

Foi realizada a análise e as fotomicrografias da imunohistoquímica dos fêmures por meio de microscópio óptico Nikon Eclipse 80i e Software NIS-Elements A 3.1.

3.21 Análise da expressão dos genes da FN e suas isoformas, de MMPs, TIMPs, AKT, mTOR e LC3β

3.21.1 Extração de RNA *ex vivo*

Após a coleta das células totais da medula óssea, como descrito no item 3.8, as mesmas foram centrifugadas a 1200rpm por 10 minutos a 4ºC. Em seguida o sobrenadante foi desprezado e adicionado 1 mL de solução hipotônica (0,2% NaCl) por 30 segundos, para a lise das hemácias, logo após foi adicionado 1mL de solução

hipertônica (1,6% NaCl) por 30 segundos, imédiatamente as células foram centrifugadas. Depois da lise das hemácias, foi realizada a extração do RNA total, por meio do *Kit*, *RNAspin Mini RNA isolation*®, da GE Healthcare Life Sciences, de acordo com as instruções do fabricante.

3.21.2 Extração de RNA *in vitro*

Posteriormente ao estabelecimento do estroma medular ósseo nos 28º e 35º dia de cultivo, foi realizada a extração do RNA total, por meio do *Kit, RNAspin Mini RNA isolation*® (GE Healthcare Life Sciences) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA total purificado foi determinada no espectrofotômetro Nanovue® (GE Healthcare Life Sciences) em 260/280 nm.

3.21.3 Síntese do DNA complementar (cDNA)

Para a síntese de cDNA foram utilizados os seguintes reagentes: 10µL de RNA total na concentração de 400ng/µL, 2,0µL de *RT buffer* 10X, 0,8 µL de *dNTP mix* (100mM), 2,0µL RT *Random Primers* 10X, 1,0µL de *MultiScribe® Reverse Transcriptase*, 1,0µL de inibidor de RNase e 3,2 µL de água destilada livre de DNase e RNase. Em seguida a amostra de RNA total e os demais reagentes foram homogeneizados, centrifugados e mantidos em termociclador para síntese de cDNA. A reação foi feita sob as seguintes condições de ciclagem: incubação dos reagentes por 10 minutos a 25°C, aquecimento a 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C, seguindo as instruções do fabricante. A eficiência da reação de transcrição reversa foi considerada igual para todas as amostras. O cDNA obtido foi armazenado a −40 C até a realização da PCR em tempo real. Foi utilizado o *Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (*Appleid Biosystems) para a síntese de cDNA e o termociclador da MJ Reserch PTC 200.

3.21.4 Controle endógeno

Para a seleção do controle endógeno foi utilizado uma placa contendo 32 genes endógenos para camundongo, TaqMan® Array 96-Well Fats Plate (Appleid Biosystems) (**Quadro 3**). Foi realizado um pool de três amostras de RNA total de estroma medular ósseo *in vitro*, para cada grupo analisado.

Quadro 3 - Genes endógenos para camundongo:

Gene endógeno					
GAPDH	**HMBS**	**UBC**	**CDNKN1A**	**EIF2B1**	**MRPL19**
HPRT1	**IPO8**	**YWHAZ**	**CDKN1B**	**PES1**	**POP4**
GUSB	**PGK1**	**PPIA**	**GADD45A**	**ALBL1**	**RPL37A**
ACTB	**TBP**	**POLR2A**	**PUM1**	**ELF1**	**RPL30**
B2M	**TFRC**	**CASC3**	**PSMC4**	**ATP6**	**RPS17**

3.21.5 Determinação da expressão dos genes de interesse

Foi analisada a expressão dos genes da FN e suas isoformas (EDA, EDB, IIICS), MMP-9, MMP-2, TIMP-1 e TIMP-2, AKT, mTOR, LC3α e LC3β (**Quadro 4**).

A determinação da expressão dos genes de interesse foi feita por PCR em tempo real utilizando o sistema TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems™, Carlsbad, CA, EUA). Os ensaios foram conduzidos no equipamento A&B StepOne Plus Real-Time PCR System® (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Neste sistema, a amplificação é avaliada por monitoramento contínuo da fluorescência de cada amostra, entre 520 e 660 nm, de forma que a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA presente na amostra. Estes dados são traduzidos por um *software* específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significante (HIRAYAMA et al., 2008).

O volume total de reação de 10μl foi composto de 1,0μL de cDNA, 5,0 μl de TaqMan® Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA), 0,5 μl de cada iniciador (*sense e antisense*) – marcado com sonda FAM e referência passiva ROX – e 3,5 μl de água livre de DNase e RNase. As condições de termociclagem utilizadas foram de 40 ciclos de 1 segundo à 95°C e 20 segundos 60°C.

Os valores quantitativos da expressão gênica foram obtidos pelos valores do Ct, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a seguinte fórmula:

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

O ΔCt é obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média dos Cts do controle endógeno, para normalização dos dados. O calibrador é a amostra utilizada como base para resultados comparativos. Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram utilizados controles negativos.

Quadro 4 - Genes de interesse e gene endógeno:

Nome do gene	Simbolo do gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Fibronectina	***FN1***	*Mus musculus*	Mm01256744_m1	58
EDA	***FNDC3A***	*Mus musculus*	Mm01312526_m1	61
EDB	***FNDC3B***	*Mus musculus*	Mm00557412_m1	60
IIICS	***FNDC5***	*Mus musculus*	Mm01181543_m1	65
MMP-2	***MMP2***	*Mus musculus*	Mm00439498_m1	62
MMP-9	***MMP9***	*Mus musculus*	Mm00442991_m1	76
TIMP-1	***TIMP1***	*Mus musculus*	Mm00441818_m1	90
TIMP-2	***TIMP2***	*Mus musculus*	Mm00441825_m1	63
LC3α	***MAP1LC3A***	*Mus musculus*	Mm00458725_g1	74
LC3β	***MAP1LC3B***	*Mus musculus*	Mm00782868_sH	141
Mtor	***MLST8***	*Mus musculus*	Mm01299633_m1	78
AKT 1	***AKT 1***	*Mus musculus*	Mm01331626_m1	69
AKT 2	***AKT 2***	*Mus musculus*	Mm02026778_g1	147
β-actina	***ACTB***	*Mus musculus*	Mm00607939_m1	115

Pb: pares de bases

4 Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos ao teste de distribuição Gaussiana e na dependência dos resultados, foram utilizados testes paramétricos ou não paramétricos, considerando-se significativo quando os resultados apresentaram $p<0,05$. O programa utilizado foi GraphPad Prism 4®.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação do estado nutricional

Foi observado que os camundongos do grupo desnutrido apresentaram diminuição progressiva seguida da manutenção do peso corporal, durante o período de desnutrição proteica, quando comparados aos camundongos do grupo controle que aumentaram o peso corporal durante o mesmo período avaliado (**Gráfico 1A e 1B**).

Em relação ao consumo de ração não foi observado diferença significativa entre os grupos analisados (**Gráfico 2A**). Contudo o grupo desnutrido apresentou menor consumo de proteína em relação ao grupo controle, uma vez que a ração hipoproteica, oferecida ao grupo desnutrido, possui apenas 2% de proteína (**Gráfico 2B**).

O grupo desnutrido apresentou significativa redução nas concentrações plasmática de proteínas totais e albumina em relação ao grupo controle (**Tabela 6**).

A

B

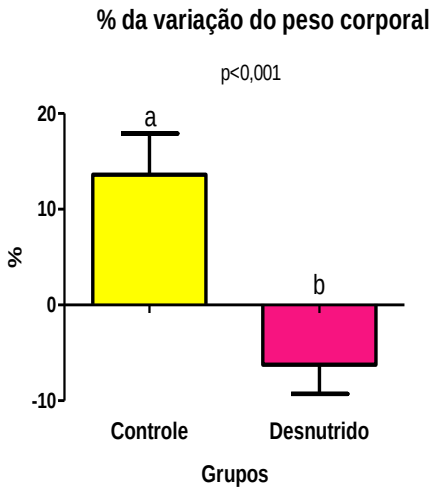


Gráfico 1 - (A) Variação do peso corporal, expressa em grama, durante o período de indução a desnutrição proteica. **(B)** Porcentagem da variação do peso corporal durante o experimento. Os valores estão apresentados por média e (intervalo de confiança de 95%). Foi utilizado o teste-T. Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes. Grupo controle N=14 e grupo desnutrido N=14. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

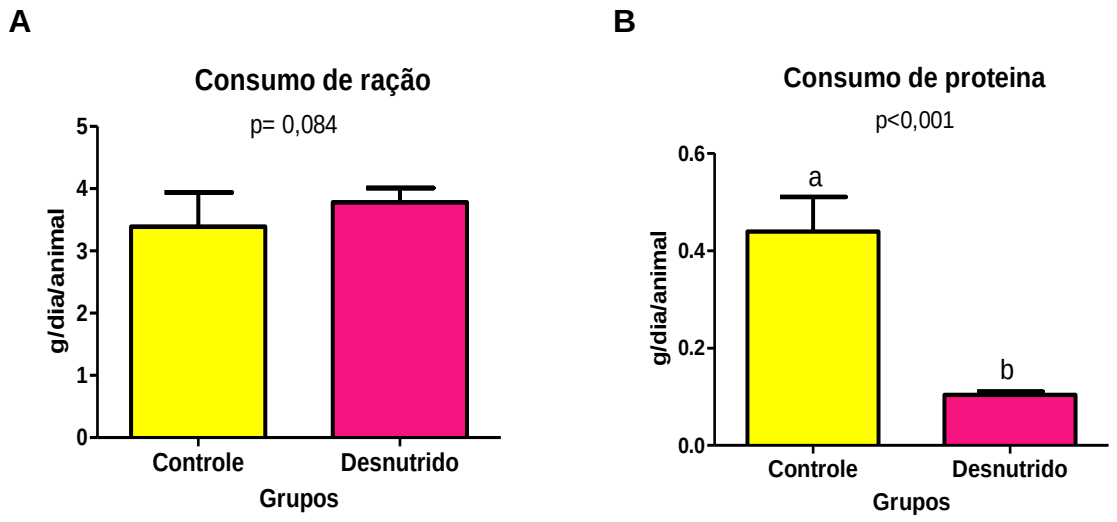


Gráfico 2 - (A) Consumo de ração e **(B)** consumo de proteína durante o experimento. Os valores estão apresentados por média e (intervalo de confiança de 95%) Foi utilizado o teste-T. Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes. Grupo controle N=14 e grupo desnutrido N=14. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

Tabela 6 - Concentração plasmática de proteínas totais e albumina

	Grupos		
Parâmetros	**Controle N=14**	**Desnutrido N=14**	***p valor***
Proteínas totais g/dL	4,65 (5,08-4,21)[a]	3,74 (4,13-3,34)[b]	0,001
Albumina g/dL	1,97 (2,18-1,77)[a]	1,65 (1,82-1,47)[b]	0,007

Os valores estão apresentados por média e (intervalo de confiança de 95%) Foi utilizado o teste-T Valores com letras diferentes sobrescritas são significativamente diferentes. Grupo controle N=14 e grupo desnutrido N=14. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.2 Avaliação hematológica

5.2.1 Eritrograma

O grupo desnutrido apresentou redução significativa do número de hemácias, da concentração de hemoglobina, da porcentagem de hematócrito e do número de reticulócitos em relação ao grupo controle. Quanto aos índices hematimétricos foi observada uma redução significativa dos valores de VCM e HCM no grupo

desnutrido em relação ao grupo controle. Não foi observada diferença nos valores de CHCM entre os grupos analisados (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Valores do eritrograma e índices hematimétricos do sangue periférico de camudongos do grupo controle e desnutrido

	Grupos		
Parâmetros	**Controle N=14**	**Desnutrido N=14**	***p valor***
Hemácias ($x10^6/mm^3$)	9,46 (8,73-9,70)[a]	7,93 (6,97-8,72)[b]	0,003
Hemoglobina (g/dL)	13,90 (12,50-14,43)[a]	11,25 (9,85-12,45)[b]	0,001
Hematócrito (%)	42,35 (38,23-43,23)[a]	34,80 (29,88-38,83)[b]	0,002
VCM (fL)	45,00 (44,75-45,00)[a]	44,00 (43,75-44,00)[b]	<0,001
HCM (pg)	14,80 (14,60-15,00)[a]	14,30 (14,18-14,53)[b]	<0,001
CHCM (%)	32,95 (32,70-33,23)	32,80 (32,30-33,53)	0,314
Reticulócitos (%)	9,35 (8,50-11,20)[a]	7,75 (7,30-8,74)[b]	0,015

Os valores estão apresentados por mediana e (intervalo interquartílico). Foi utilizado o teste Mann-Whitney Valores com letras diferentes sobrescritas são significativamente diferentes entre os grupos. Grupo controle N=14 e grupo desnutrido N=14. A letra N indica o número de camundongos avaliados.
VCM (Volume Corpuscular Médio), HCM (Concentração Corpuscular Média) e CHCM (Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média).

5.2.2 Leucograma

Os camundongos do grupo desnutrido apresentaram leucopenia com redução significativa nos valores absolutos de linfócitos no sangue periférico, (**Tabela 8**). Não foram observados basófilos nas preparações analisadas.

Tabela 8 - Número absoluto de leucócitos e das diferentes populações leucocitárias presente no sangue periférico de camudongos dos grupos controle e desnutrido.

	Grupos		
Parâmetros	**Controle N=14**	**Desnutrido N=14**	***p valor***
Leucócitos ($x10^3/mm^3$)	1,80 (1,55-3,00)[a]	1,20 (1,00-2,20)[b]	0,038
Neutrófilos Segmentados (mm^3)	141,50 (72,75-245,80)	204,00 (111,00-252,80)	0,331
Eosinófilos ($/mm^3$)	30,50 (15,50-40,50)	32,50 (0,00-70,50)	0,399
Linfócitos ($/mm^3$)	1668,00 (1452,00-2560,00)[a]	1229,00 (780,30-2027,00)[b]	0,042
Monócitos($/mm^3$)	0,00 (0,00-72,75)	4,50 (0,00 -90,50)	0,411

Os valores estão apresentados por mediana e (intervalo interquartílico). Foi utilizado o teste Mann-Whitney Valores com letras diferentes sobrescritas são significativamente diferentes entre os grupos. Grupo controle N=14 e grupo desnutrido N=14. A letra N indica o número de camundongos avaliados

5.2.3 Número de células totais da medula óssea e mielograma

Os camundongos do grupo desnutrido apresentaram redução significativa no número de células nucleadas da medula óssea (**Gráfico 3**). Em relação à análise diferencial das células totais da medula óssea os camundongos do grupo desnutrido apresentaram menor quantidade de blastos e formas imaturas de granulócitos e também redução da linhagem eritróide (**Tabela 9**).

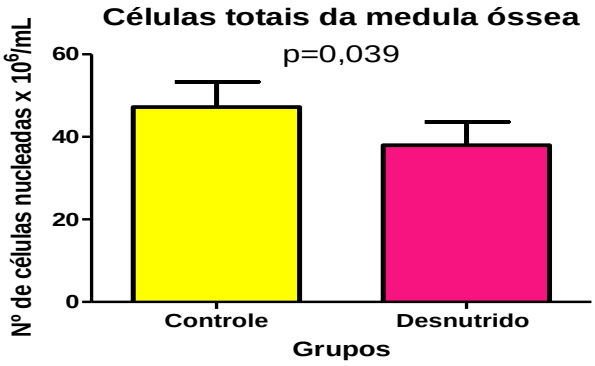


Gráfico 3 – Número de células nucleadas totais da medula óssea dos camundongos do grupo controle (N=11) e do grupo desnutrido (N=11). Os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste-T Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

Tabela 9 – Resultados da contagem diferencial das células da medula óssea

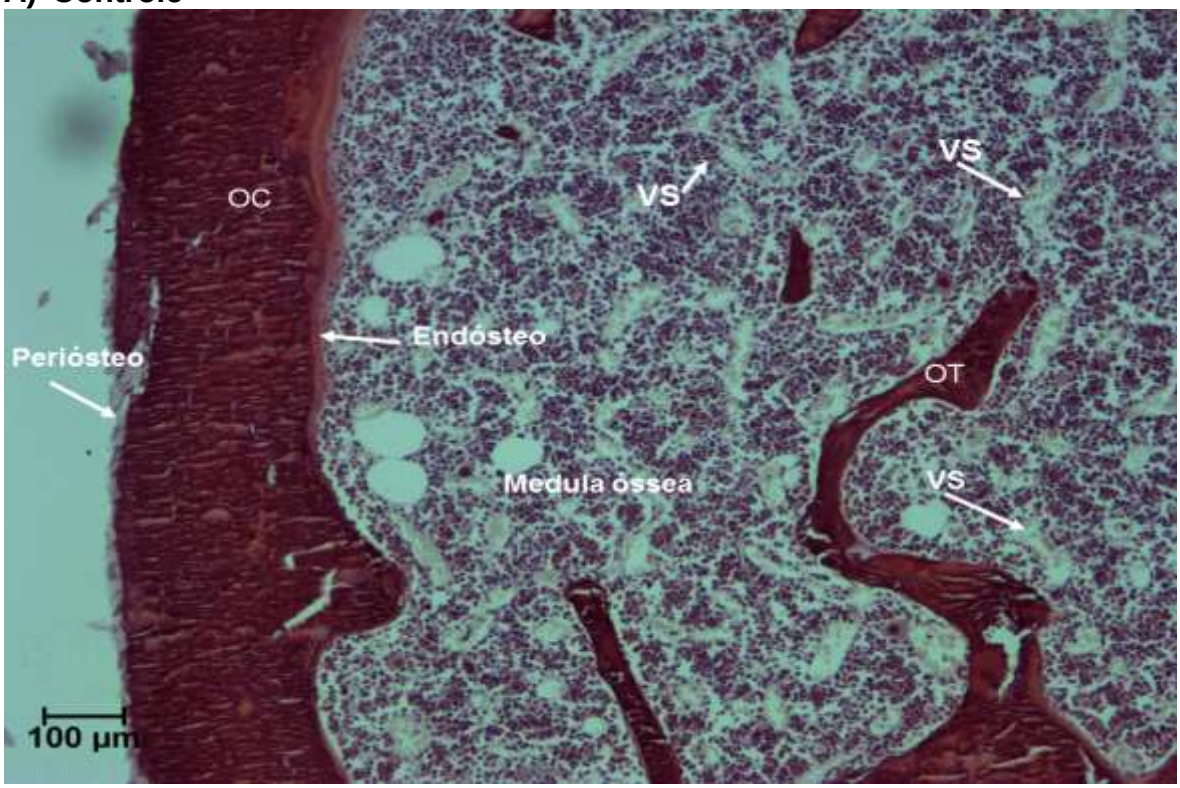
Tipo celular	Grupos		
	Controle N=4 ($x10^6/mm^3$)	**Desnutrido N=4 ($x10^6/mm^3$)**	***P valor***
Blastos	3,95 (3,34-6,05)[a]	0,71 (0,00-2,76)[b]	0,029
Formas imaturas	4,40 (4,012-5,18)[a]	1,06 (0,00-3,31)[b]	0,029
Formas Jovens	11,87 (10,03-13,44)	8,52 (7,82-21,88)	0,350
Formas em Anel	44,37 (43,52-60-20)	53,35 (28,22-57,40)	0,500
Neutrófilos segmentados	52,25 (43,37-63,32)	55,91 (45,52-63,65)	0,428
Eosinófilos	10,65 (5,74-18,15)	14,48 (3,38-18,03)	0,430
Mono-Macrofágo	9,41 (8,36-15,63)	10,49 (4,09-11,15)	0,500
Linfócitos	35,95 (28,48-45,98)	35,14 (30,91-36,80)	0,500
Plasmócitos	0,48 (0,00-075)	0,35 (0,00-1,00)	0,449
Proeritroblastos	10,11 (9,67-15,82)[a]	7,11 (5,32-8,83)[b]	0,050
Eritroblastos Basófilo	16,62 (11,70-18,15)[a]	6,41 (6,39-7,95)[b]	0,050
Eritroblastos Policromático/ Ortocromático	63,76 (45,96-85,99)	44,10 (17,57-49,74)	0,114

Os valores estão apresentados por mediana e (intervalo interquartílico). Foi utilizado o teste Mann-Whitney Valores com letras diferentes sobrescritas são significativamente diferentes. Grupo controle N=4 e grupo desnutrido N=4. A letra N indica o número de camundongos avaliados

5.3 Análises histopatológica da medula óssea

A medula óssea dos grupo analisados apresentou aspecto normal com estruturas preservadas, não tendo sido observadas diferenças significativas entre elas (**Figura 5 A e B**)., embora, acontagem das células totais nucleadas da medula óssea tenha sido significativamente menor nos camudongos do grupo desnutrido conforme já mencionado no iten 5.2.3.

A) Controle



B) Desnutrido

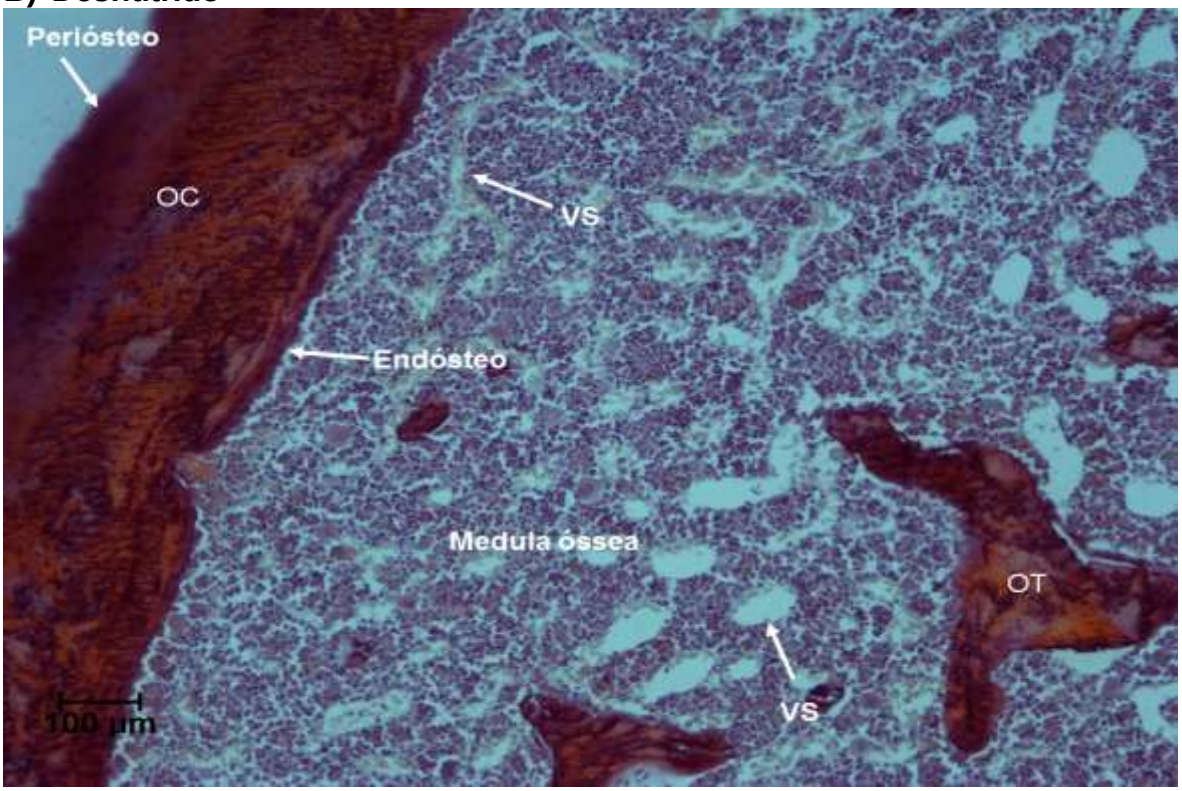


Figura 5 - Fotomicrografia da medula óssea do grupo controle **(A)** e do grupo desnutrido **(B)**. Coloração de HE. Aumento de 100X. OC (Osso Cortical), OT (Osso Trabecular) e VS (Vaso Sinusoidal). Fotomicrografia representativa de um experimento com N=5 para o grupo controle e N=5 para o grupo desnutrido. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.4 Determinações das proteínas na via de sinalização do AKT e mTOR por *western bloting* em células estromais da medula óssea *in vitro*

5.4.1 PI3K total e PI3K fosforilado

O anticorpo utilizado para determinação de PI3K total, detectou níves endógenos da subunidade reguladora p85. Já o anticorpo para determinação de PI3K fosforilado, detectou concentrações endógenas de duas subunidades reguladoras fosforiladas no sítio treonina, p85 e p55. O estroma medular ósseo *in vitro* do grupo desnutrido não apresentou diferença significativa não quantidade de PI3K total e PI3K fosforilado na subunidade p85 entre os grupos e dias analisado (**Gráfico 4 A, A1, 4 B e B1**). Enquanto que a quantidade de PI3K fosforilado na subunidade p55 no estroma medular ósseo *in vitro* do 28º dia de cultivo do grupo desnutrido foi significativamente menor (**Gráfico 4 C e C1**).

5.4.2 AKT total e fosforilado

Não foi observado diferença significativa referente a quantidade de AKT total no estroma medular ósseo *in vitro* do 28º e 35º dia de cultivo do grupo desnutrido quando comparado ao grupo controle do mesmo período. Também não foi observada diferenças entre os grupos controle e desnutrido de 28º com os grupos controle e desnutrido de 35º (**Gráfico 5 A e A1**).

Em relação ao AKT fosforilado no sítio serina e o AKT fosforilado no sítio treonina, o grupo desnutrido do 28º dia de cultivo apresentou menor quantidade quando comparado ao grupo controle do mesmo período. Porém esta diferença não foi observada no 35º dia. Também não foi observada diferenças entre os grupos controle e desnutrido de 28º dia cultivo com os grupos controle e desnutrido de 35º dia cultivo (**Gráfico 5 B, B1 e Gráfico 5 C, C1** respectivamente).

5.4.3 Pten fosforilado

Não foi observado diferença significativa na quantidade de Pten fosforilado no sítio serina, no grupo desnutrido do 28º dia de cultivo em relação ao grupo controle do mesmo período, no entanto foi observado menor quantidade de Pten no grupo desnutrido do 28º dia de cultivo, quando comparado ao grupo controle e desnutrido do 35º dia de cultivo. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e desnutrido do 35º dia cultivo (**Gráfico 6 B e B1**).

5.4.4 PDK total e fosforilado

A quantidade de PDK total não diferiu entre os grupos e dias analisados (gráfico 6 B). O PDK fosforilado no sítio serina não se apresentou diferente no grupo desnutrido do 28º dia de cultivo em relação ao grupo controle do mesmo período. No entanto, foi observada menor quantidade de PDK fosforilado no grupo desnutrido do 28º dia de cultivo, quando comparado aos grupos controle e desnutrido do 35º dia de cultivo. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e desnutrido do 35º dia de cultivo (**Gráfico 6 A e A1**).

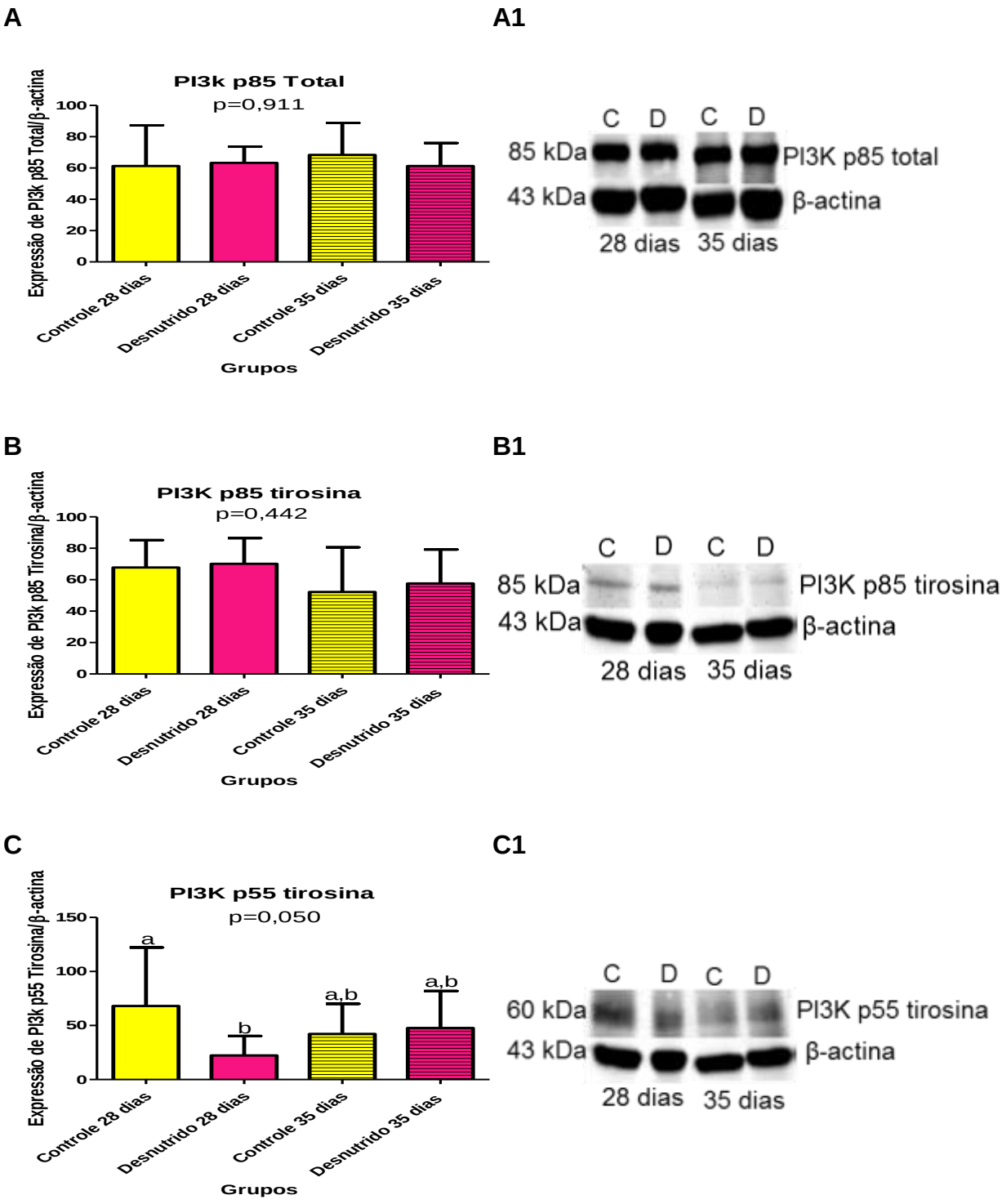


Gráfico 4 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de PI3K p85 total **(A e A1),** PI3K p85 tirosina **(B e B1)**, PI3K p55 tirosina **(C e C1).** (A e B) os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. **(C)** os valores estão apresentados por média geométrica e (intervalo de confiança) 95%. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. Grupo controle (N=7) e do grupo desnutrido (N=7). A expressão das proteínas foi normalizada pela β-actina. Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados. C (grupo controle), D (grupo desnutrido).

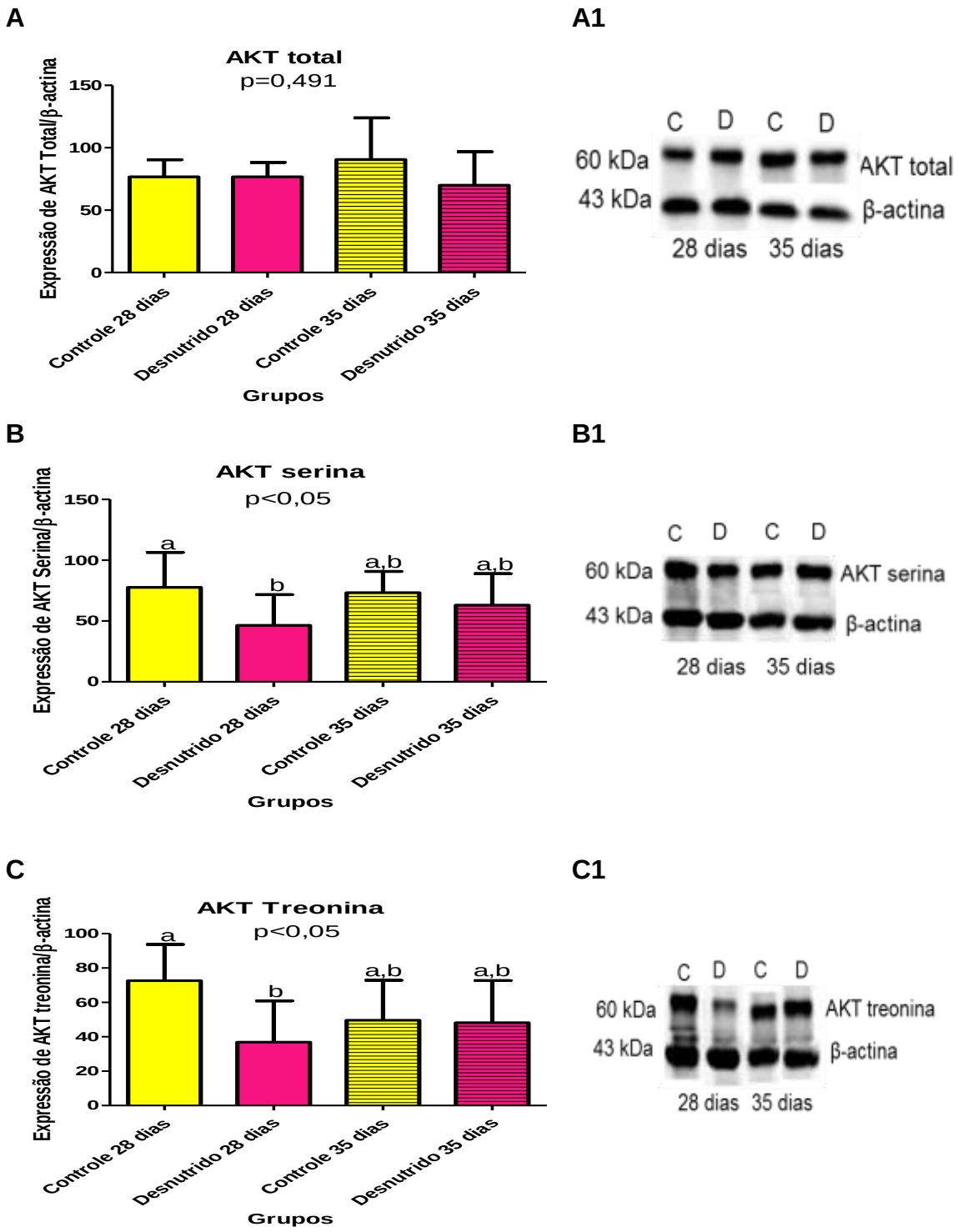


Gráfico 5 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. AKT total **(A e A1)**, AKT serina **(B e B1)**, AKT treonina **(C e C1)**. Os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=7) e do grupo desnutrido (N=7). A expressão das proteínas foi normalizada pela β-actina. Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados. C (grupo controle), D (grupo desnutrido).

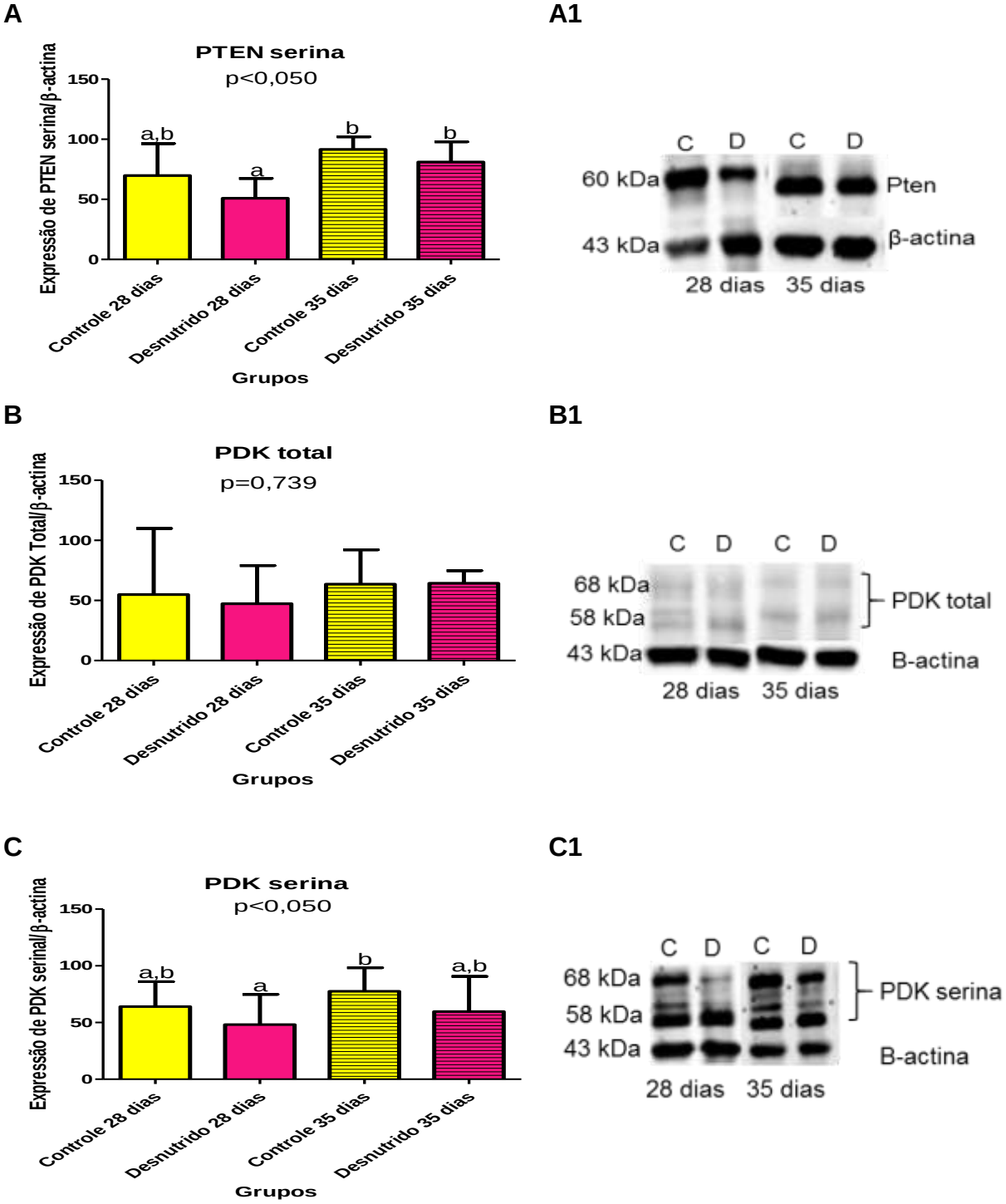


Gráfico 6 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de Pten serina **(A e A1),** PDK total **(B e B1)**, PDK serina **(C e C1)**. **(A)** os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. **(B e C)** os valores estão apresentados por média geométrica e (intervalo de confiança) 95%. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. Grupo controle (N=7) e do grupo desnutrido (N=7). A expressão das proteínas foi normalizada pela β-actina. Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados. C (grupo controle), D (grupo desnutrido)

5.4.5 mTOR total e fosforilado

O estroma da medula *in vitro* oriundos dos camundongos do grupo desnutrido do 28º dia de cultivo apresentaram menor quantidade de mTOR total, mTOR fosforilado no sítio serina 2481 e mTOR fosforilado no sítio serina 2448, quando comparado ao estroma oriundo grupo controle do 28º dia e 35º dia de cultivo (**Gráfico 7 A, A1; B, B1 e C e C1**, respectivamente). Além disso o grupo desnutrido 28º dia de cultivo, apresentou menor quantidade de mTOR fosforilado no sítio serina 2448 em relação ao grupo desnutrido do 35º dia de cultivo (**Gráfico 7 C e C1**). Não foi observado diferença nas quantidades de mTOR total, mTOR fosforilado no sítio serina 2481 e mTOR fosforilado no sítio serina 2448 entre os grupos controle e desnutrido do 35º dia de cultivo (**Gráfico 7 A, A1; B, B1 e C e C1**, respectivamente).

5.4.6 Rictor, GβL, Raptor total e fosforilado, PRAS40 total e fosforilado

Não foi observada diferença significativa nas quantidades de Rictor e GβL entre os extratos de cultura das células obtidas dos camundongos dos grupos controle e desnutrido do 28º dia e 35º dia de cultivo (**Gráfico 7 A, A1 e B e B1**, respectivamente).

Os resultados das proteínas Raptor total, Raptor fosforilado (**Gráfico 9 A, A1, 9 B, B1**), PRAS40 total e PRAS40 fosforilado determinados no estroma medula *in vitro* (**Gráfico 10 A, A1, 10 B e B1**) não diferiram entre os grupos e dias analisados.

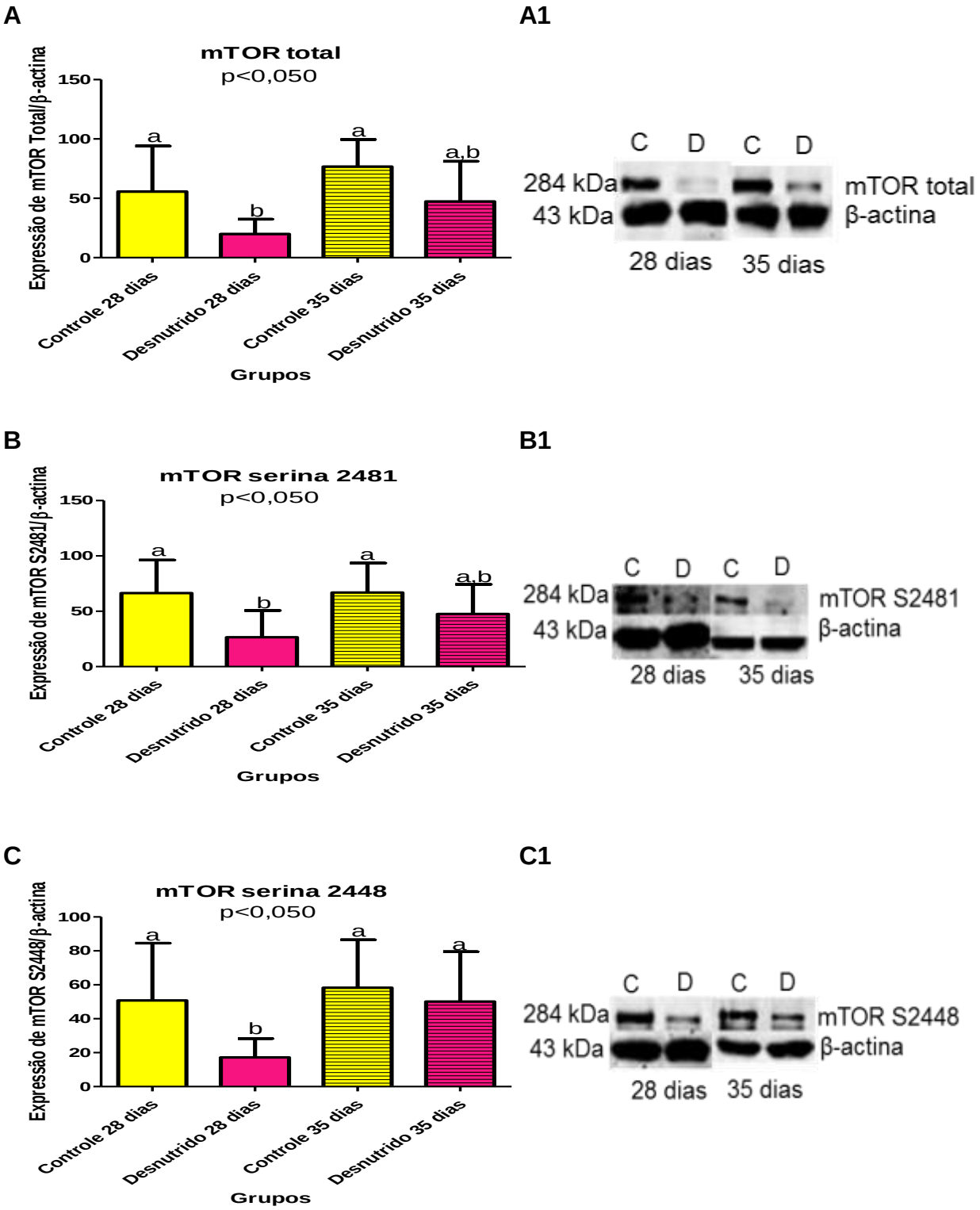


Gráfico 7 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de mTOR total **(A e A1)**, mTOR serina 2481 **(B e B1)** e mTOR serina 2448 **(C e C1)**. Os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=7) e do grupo desnutrido (N=7). A expressão das proteínas foi normalizada pela β-actina. Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados. C (grupo controle), D (grupo desnutrido).

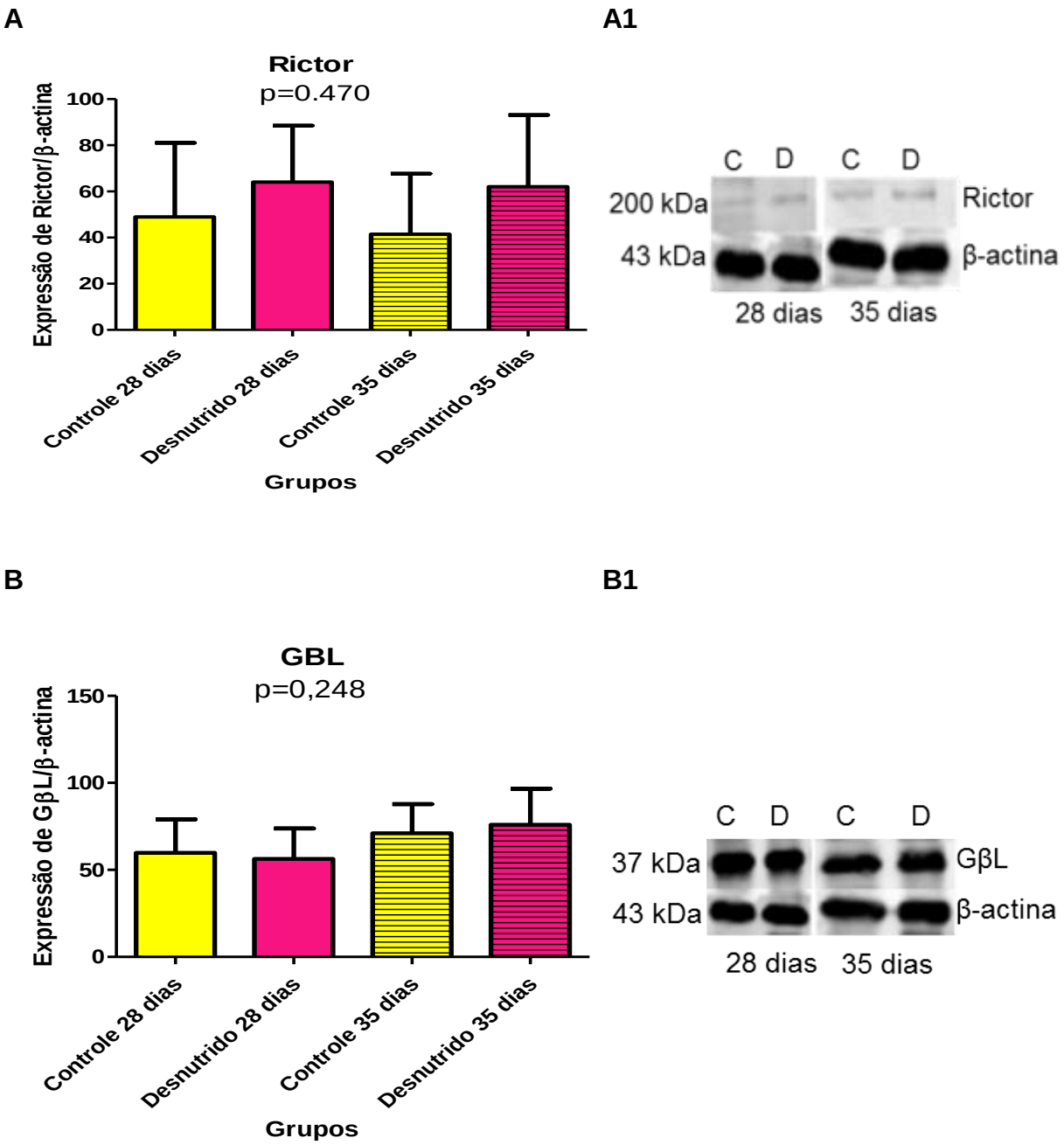


Gráfico 8 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de Rictor **(A e A1)** e GβL **(B e B1)**. Os valores estão apresentados por média e (intervalo de confiança) 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=7) e do grupo desnutrido (N=7). A expressão das proteínas foi normalizada pela β-actina. Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados. C (grupo controle), D (grupo desnutrido).

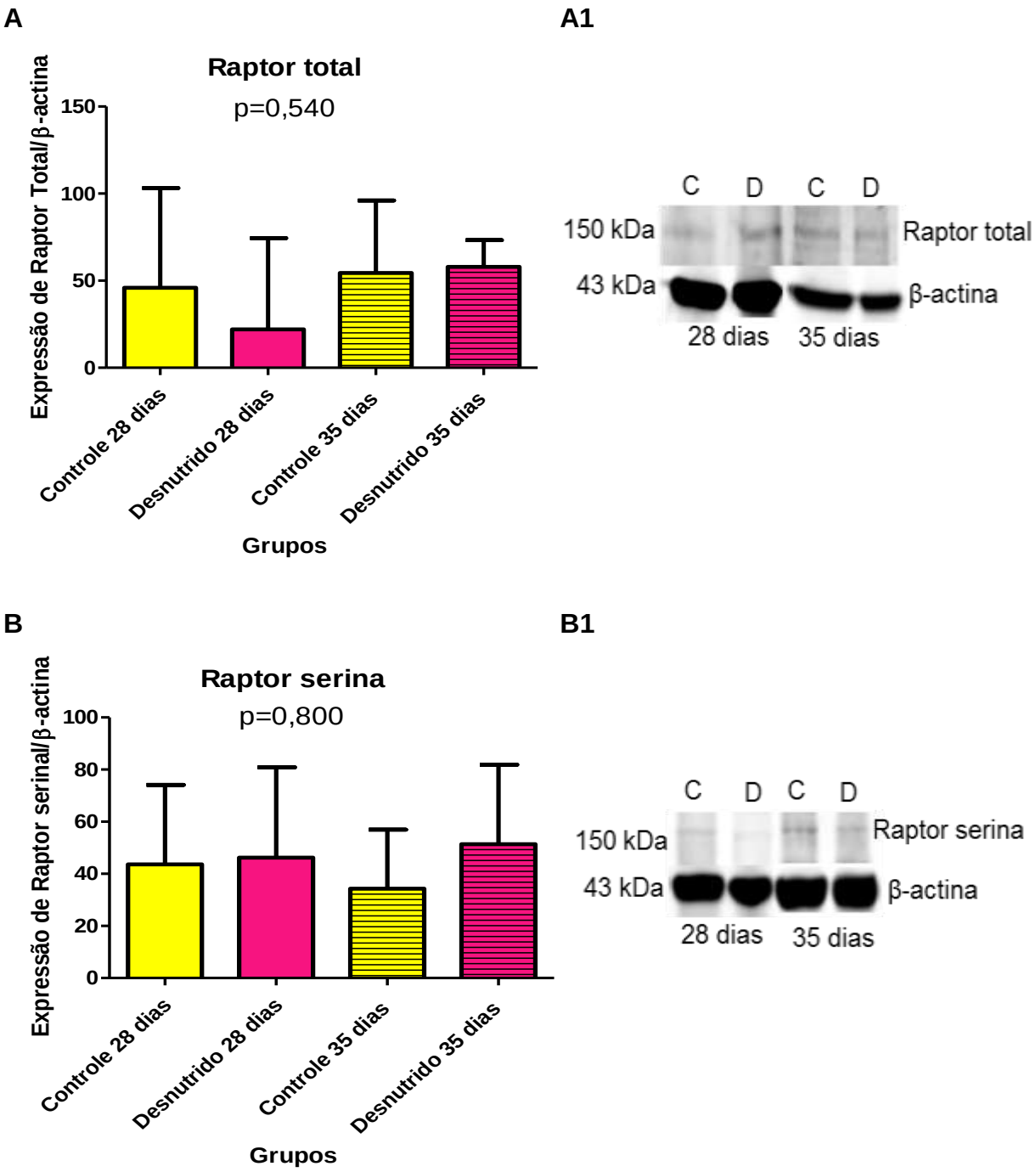


Gráfico 9 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de Raptor Total **(A e A1)**, Raptor serina **(B e B1)**. **(A)** os valores estão apresentados por média geométrica e intervalo de confiança 95%. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. **(B)** os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=7) e do grupo desnutrido (N=7). A expressão das proteínas foi normalizada pela β-actina. Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados. C (grupo controle), D (grupo desnutrido).

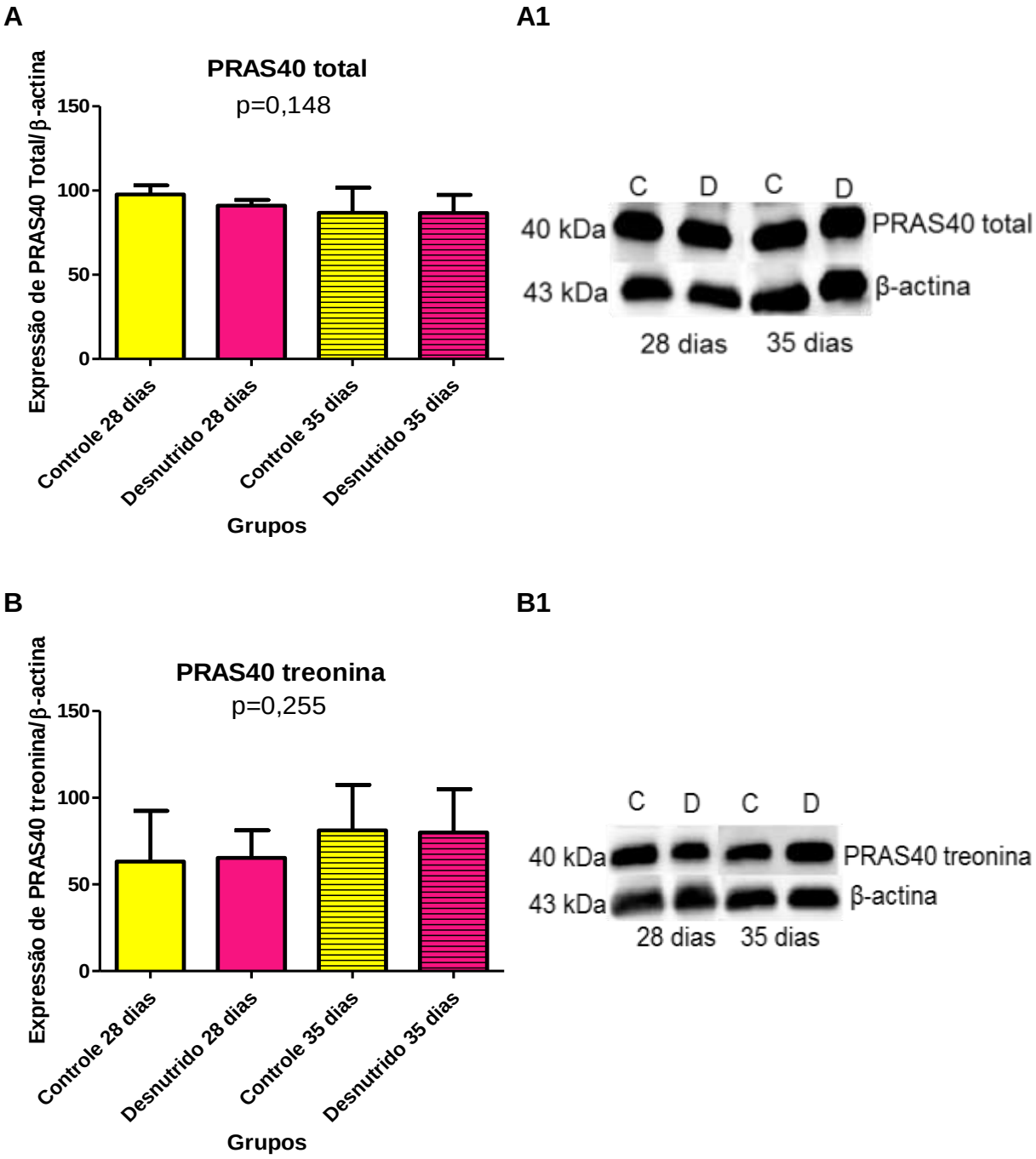


Gráfico 10 - Proteínas da via de sinalização do AKT em células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Determinação de PRAS40 Total **(A e A1)**, PRAS40 treonina **(B e B1)**. Os valores estão apresentados por média geométrica e intervalo de confiança 95%. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. Grupo controle (N=7) e do grupo desnutrido (N=7). A expressão das proteínas foi normalizada pela β-actina. Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados. C (grupo controle), D (grupo desnutrido).

5.4.7 LC3β

O anticorpo utilizado para determinação de LC3β, detectou concentrações endogénas das formas I e II desta proteína. Não foram observadas alterações quantitativas de LC3β-I e LC3β-II normalizado pela β-actina, entre os grupos e dias analisados (**Gráfico 11 B e C).** Na quantificação de LC3β-II normalizado pelo LC3β-I e a somatória das quantificações de LC3β-I e LC3β-II normalizados pela β-actina, foi observado maior expressão de LC3β-II no estroma medular ósseo *in vitro* do 28º dia de cultivo no grupo desnutrido quando comparado ao grupo controle no mesmo período e ao grupo desnutrido do 35º dia de cultivo. Mas o estroma medular ósseo *in vitro* do grupo desnutrido do 35º dia apresentou menor quantidade de LC3β-II quando comparado ao grupo controle do mesmo período (**Gráfico 11 A , A1 e D**).

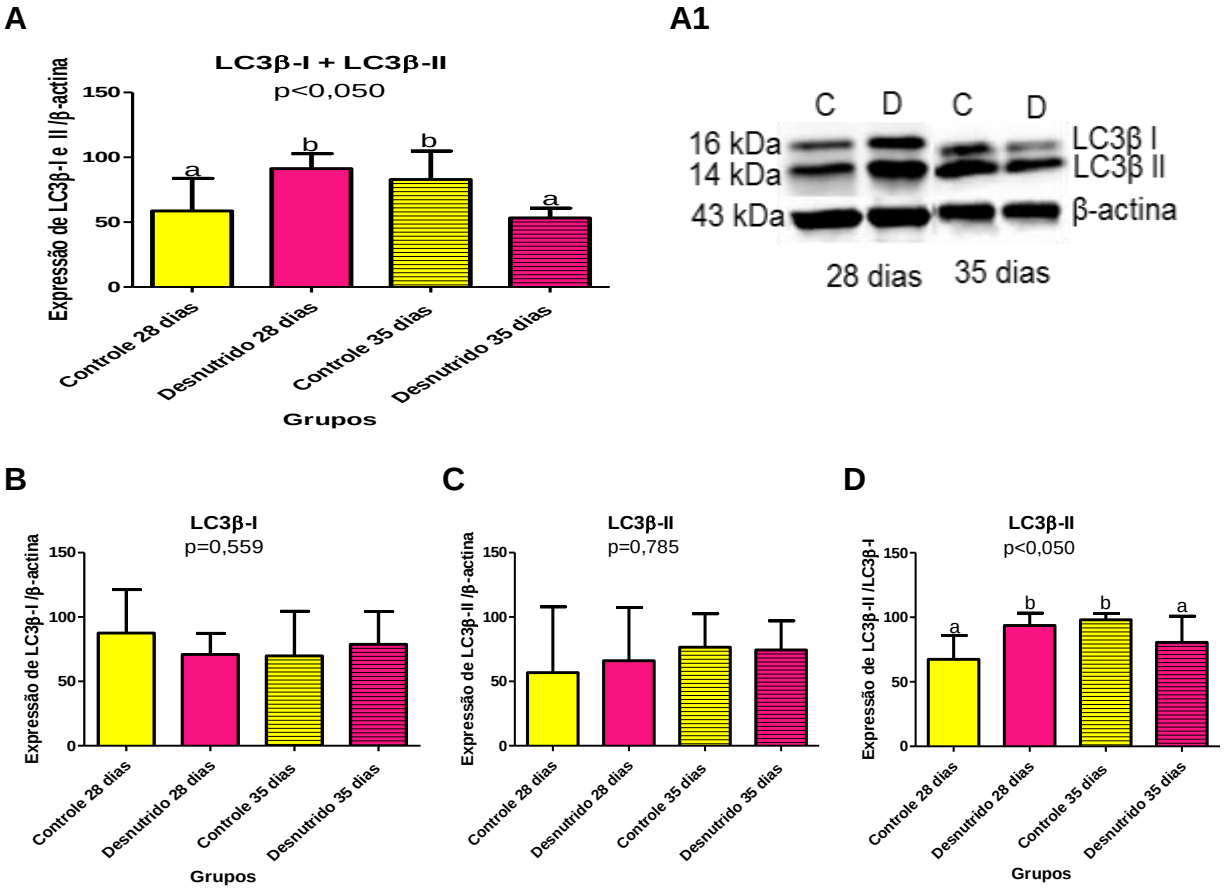


Gráfico 11 - Determinação de LC3β, no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Os valores estão apresentados por média geométrica e (intervalo de confiança) 95%. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. Grupo controle (N=6) e do grupo desnutrido (N=6). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados. C (grupo controle), D (grupo desnutrido).

5.5 Zimografia do sobrenadante de culturas de células estromais da medula óssea *in vitro*

As bandas claras identificadas no gel de zimografia correspondem a degradação da gelatina contida no gel pelas MMP-9 e MMP-2 em suas formas pró-enzima, intermediária e ativa. Foi realizado como controle da reação da zimografia, amostras de sobrenadante de culturas de células HT1080 carenciadas em soro e das culturas de longa duração, tipo Dexter et al., (1977), do grupo controle e desnutrido. O gel com estas amostras foi dividido em três partes e cada parte incubada com tampões diferentes; ou seja, tampão de incubação, tampão de incubação com EDTA e tampão de incubação com fenantrolina. A incubação do gel, por um período de 18 horas com tampão de incubação, possibilitou a degradação da gelatina contida no gel, por meio da MMP-2 e MMP-9 presentes nas amostras. Já os géis incubados no mesmo período com tampão de incubação contendo EDTA e tampão de incubação contendo fenantrolina, impediram, como era de se esperar, a ação da MMP-2 e MMP-9 de degradarem a gelatina presente no gel (**Figura 6**).

O sobrenadante das culturas de 28º dia do grupo desnutrido apresentaram maior atividade da forma pró-enzima da MMP-9 quando comparado ao grupo controle de 35º dia, mas não foi observada diferença significativa quando comparado ao grupo controle do mesmo período (**Gráfico 12 A1**). Em relação as formas ativa da MMP-9, pró-enzima e intermediária da MMP-2 não foi observada diferença significativa entre os grupos e dias analisados (**Gráfico 12 A1, B e B1**) e (**Figura 7 A e B**).

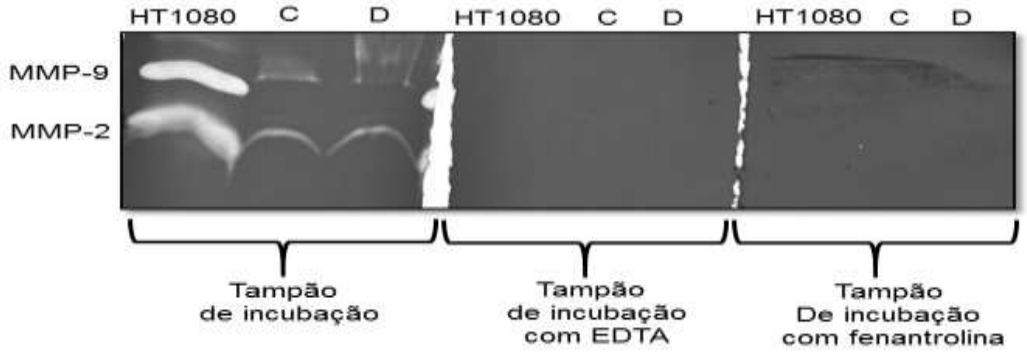


Figura 6 – Imagem do gel da reação controle da zimografia. Diferentes géis contendo as mesmas amostras, incubadas com diferentes tampões no mesmo período. Células HT1080, C (grupo controle), D (grupo desnutrido). Gel representativo de um experimento com N=8 para o grupo controle e N=8 para o grupo desnutrido. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

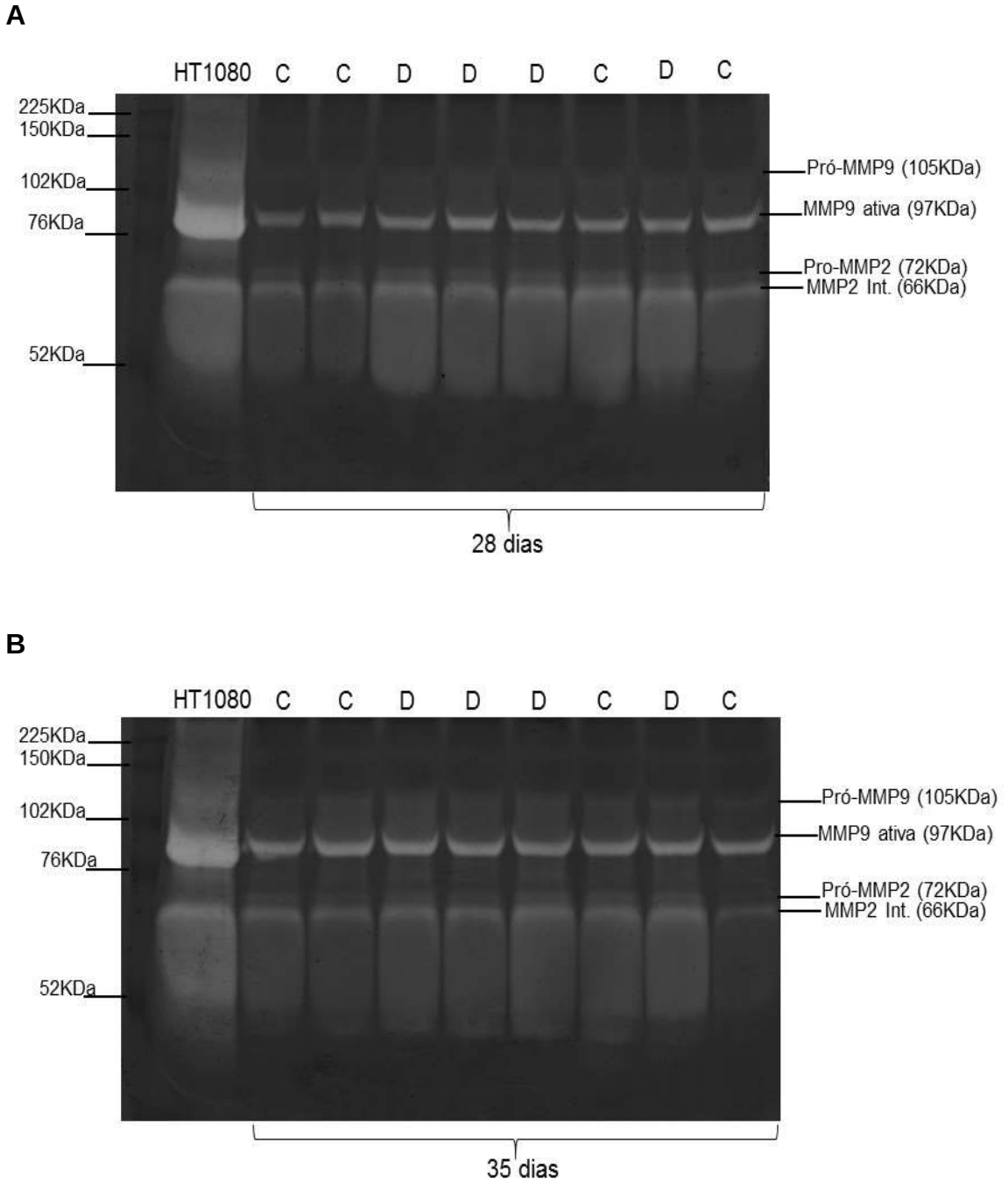


Figura 7 - Ensaio de zimografia com sobrenadante carenciado em soro do estroma medular ósseo *in vitro* **(A)** grupo controle e desnutrido do 28º dia e **(B)** grupo controle e desnutrido do 35º dia de cultivo. C (grupo controle), D (grupo desnutrido) células HT1080. Gel representativo de um experimento com N=8 para o grupo controle e N=8 para o grupo desnutrido. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

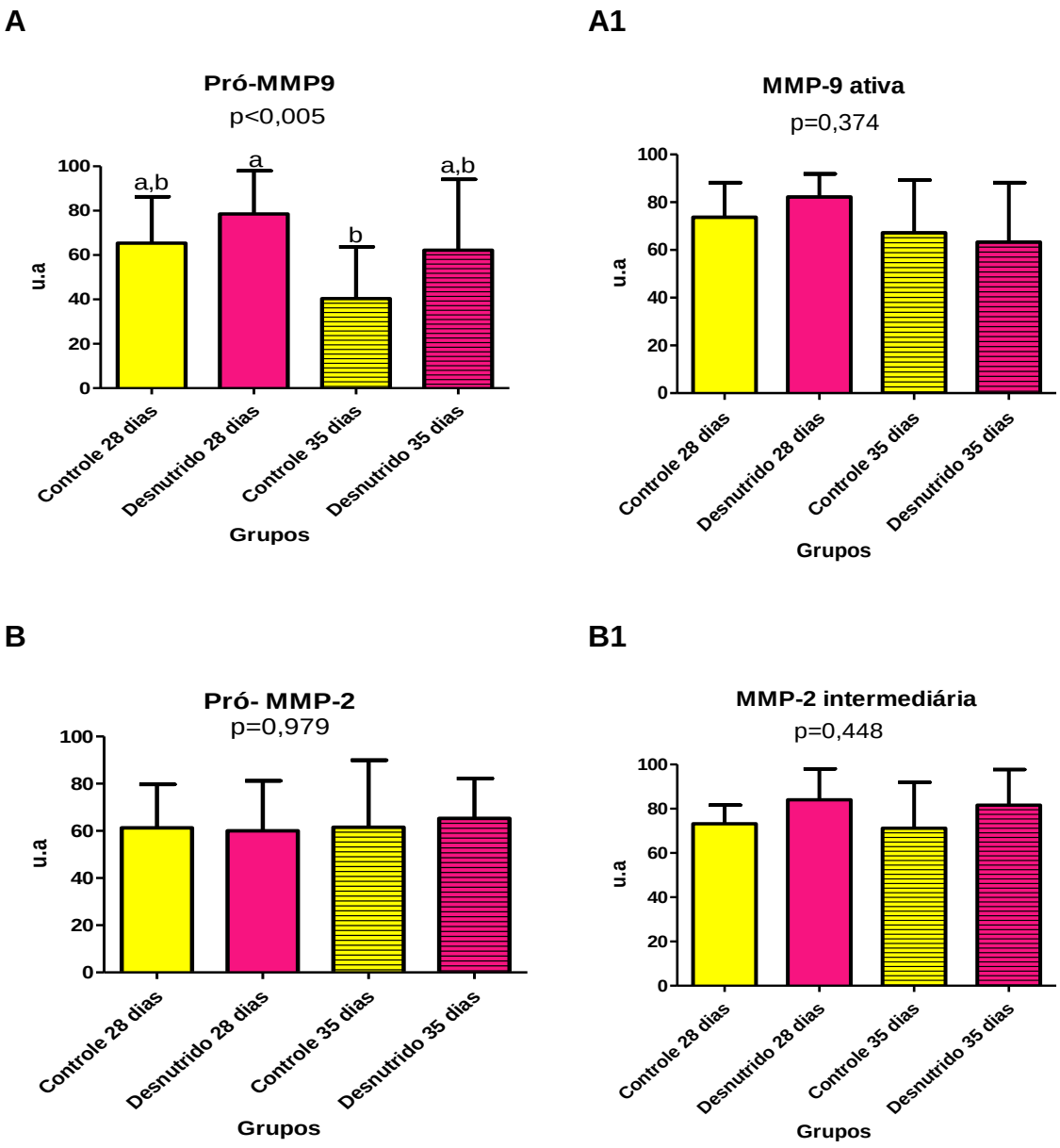


Gráfico 12 - Análise do ensaio de zimografia.realizado no sobrenadante carenciado em soro do estroma medular ósseo *in vitro*. nos 28º e 35º dia de cultivo. Atividade enzimática da **(A)** Pró-MMP-9, **(A1)** MMP-9 ativa **(B)** Pró-MMP-2 e **(C)** MMP-2 intermediária. Os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=8) e do grupo desnutrido (N=8). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.6 Ensaio de atividade MMP-2 e MMP-9 em sobrenadante de culturas de células da medula óssea *in vitro*

Foi detectada atividade endógena da MMP-9 e MMP-2 no sobrenadantes das culturas de longa duração de ambos os grupos e dias analisados. No entanto, não foi observada diferença significativa na atividades destas enzimas entre os grupos e dias analisados (**Gráfico 13 A e B**).

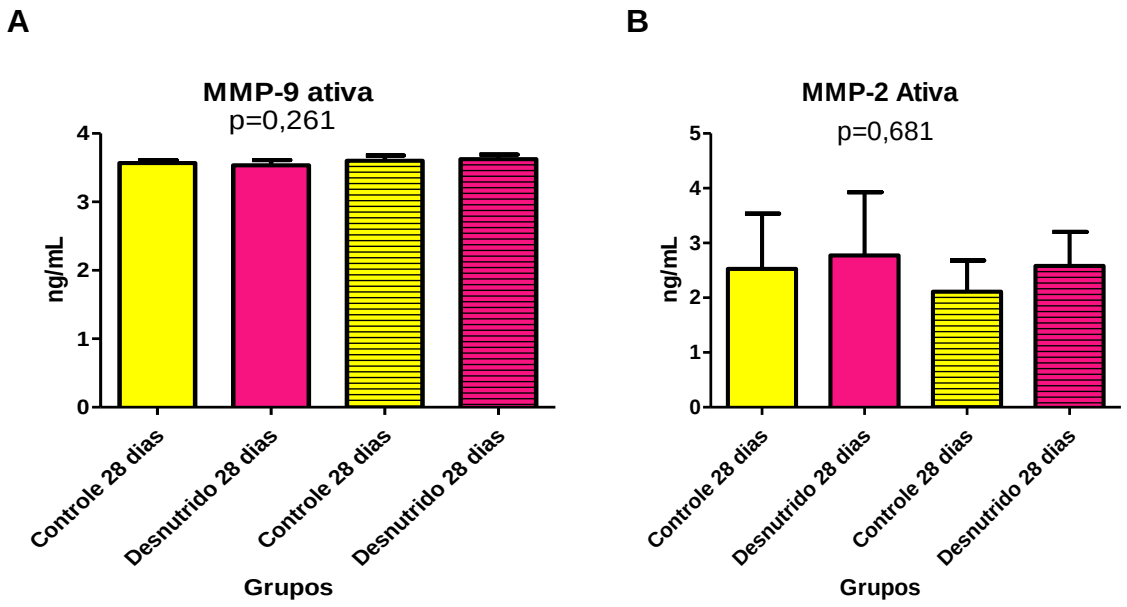


Gráfico 13 - Quantificação da atividade de MMPs no sobrenadante do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. **(A)** atividade de MMP-9 ativa. **(B)** atividade de MMP-2 ativa. **(A)** os valores estão apresentados por média geométrica e intervalo de confiança 95%. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. **(B)** os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=9) e do grupo desnutrido (N=10). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.7 Quantificação de TIMP-1 e TIMP-2 em sobrenadante de culturas de células da medula óssea *in vitro*

Não foi observada diferença significativa na concentração de TIMP-1 no sobrenadante das culturas de longa duração de cultivo quando comparado aos seus respectivos controles. No entanto, foi observado que tanto o sobrenadante de cultura de células do grupo controle e do desnutrido de 35ºdia de cultivo apresentaram menor concentração de TIMP-1 quando comparado ao grupo controle e desnutrido de 28º dia de cultivo (**Gráfico 14 A**).

Em relação a concentração de TIMP-2 no sobrenadante das culturas, não foi observada diferença significativa entre os grupos e dias analisados (**Gráfico 14 B**).

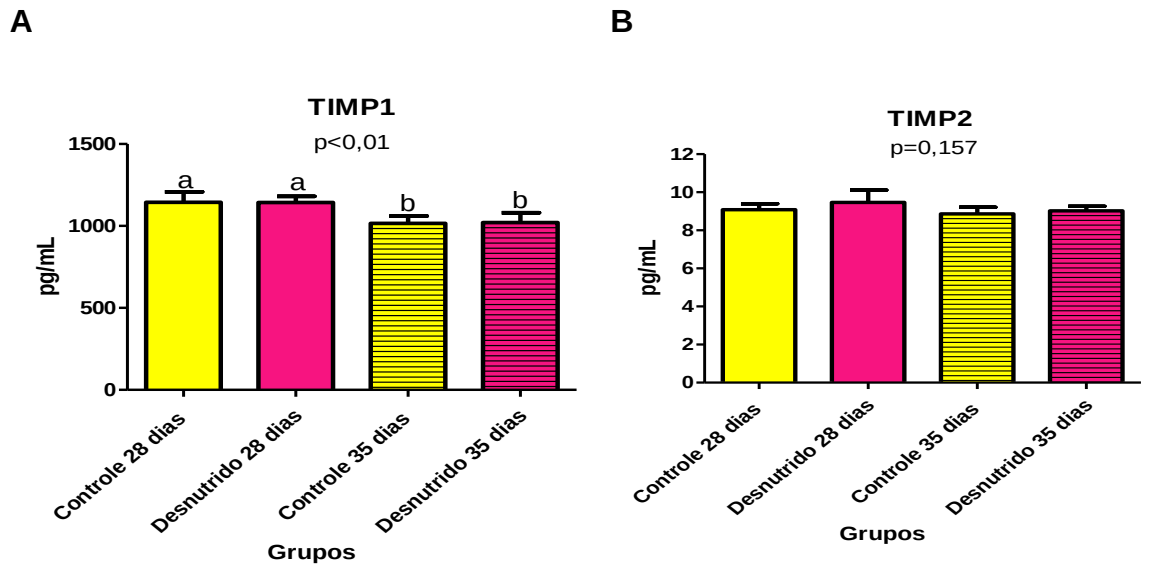


Gráfico 14 - Quantificação de TIMPs no sobrenadante do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Quantificação **(A)** TIMP-1, **(B)** TIMP-2. Os valores estão expressos em média e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=9) e grupo desnutrido (N=10). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

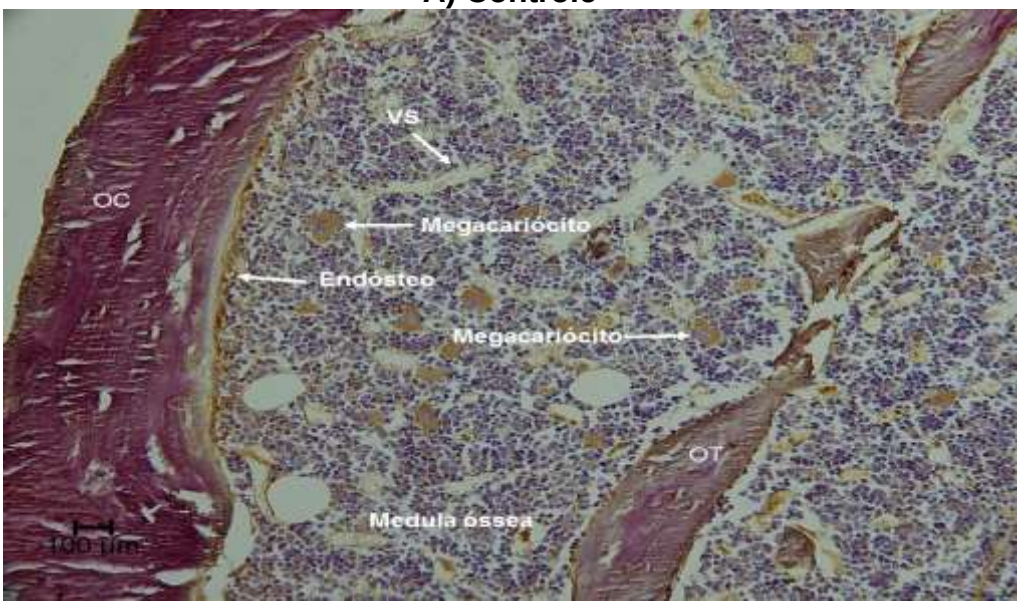
5.8 Análise de FN, MMP-9 e MMP-2 por imunohistoquímica na medula óssea femoral

Foi observado que a medula óssea dos camudongos do grupo desnutrido apresentou aumento da quantidade de FN quando comparado ao grupo controle. Este aumento é preferencialmente imunolocalizado nas regiões subendosteal, perivascular e nas regiões próximas ao osso trabecular (**Figura 8 A e B**). Também foi detectado FN nos megacariócitos e na MEC tanto na medula óssea de camundongos do grupo controle quanto do grupo desnutrido. A **figura 8 C**, corresponde ao controle negativo da reação imunohistoquímica.

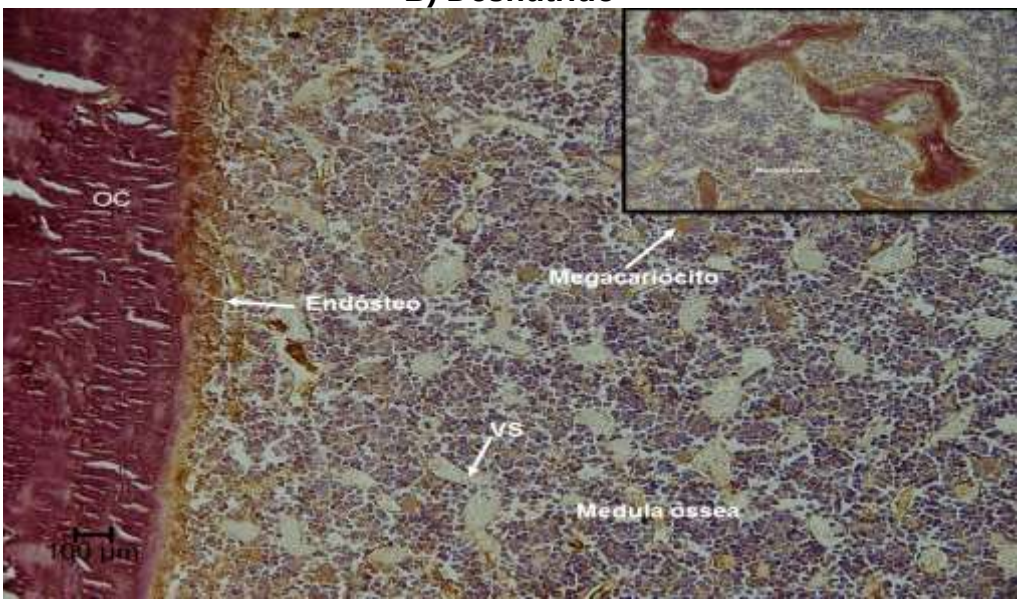
Foi detectado MMP-9 nos cortes histológicos da medula óssea femoral de camundongos do grupo controle e do grupo desnutrido, mas não houve diferenças quantitativas entre os grupos analisados. A imunolocalização desta proteína ocorre próxima às regiões subendosteal, osso trabecular e perivascular. Também foi detectado MMP-9 nos megacariócitos, nas células que estão localizadas dentro dos sinusoides, possivelmente neutrófilos segmentados e na MEC (**Figura 9 A, B**). A **figura 9 C**, corresponde ao controle negativo da reação de imunohistoquímica.

Foi detectado MMP-2 nos cortes histológicos da medula óssea femoral de camundongos do grupo controle e do grupo desnutrido, mas não houve diferenças quantitativas entre os grupos analisados. A imunolocalização desta proteína ocorre próximo às regiões endósteal, osso trabecular e perivascular. Também foi detectado MMP-2 nos megacariócitos e em torno das células da medula óssea (**Figura 10 A, B**). A **figura 10 C**, corresponde ao controle negativo da reação de imunohistoquímica.

A) Controle



B) Desnutrido



C) Controle negativo da reação

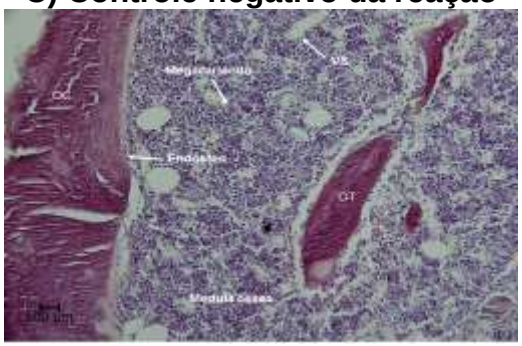
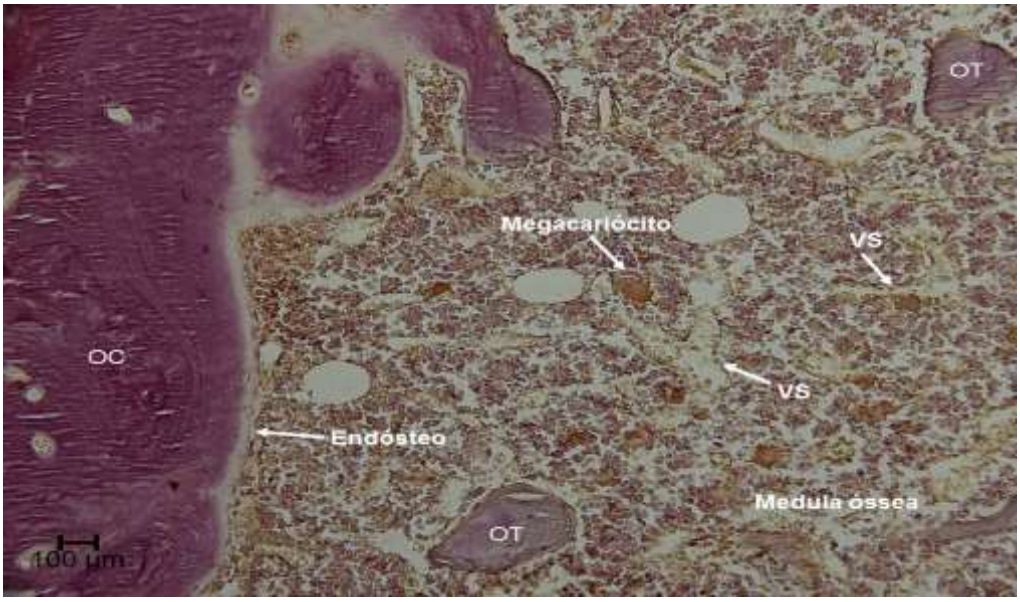
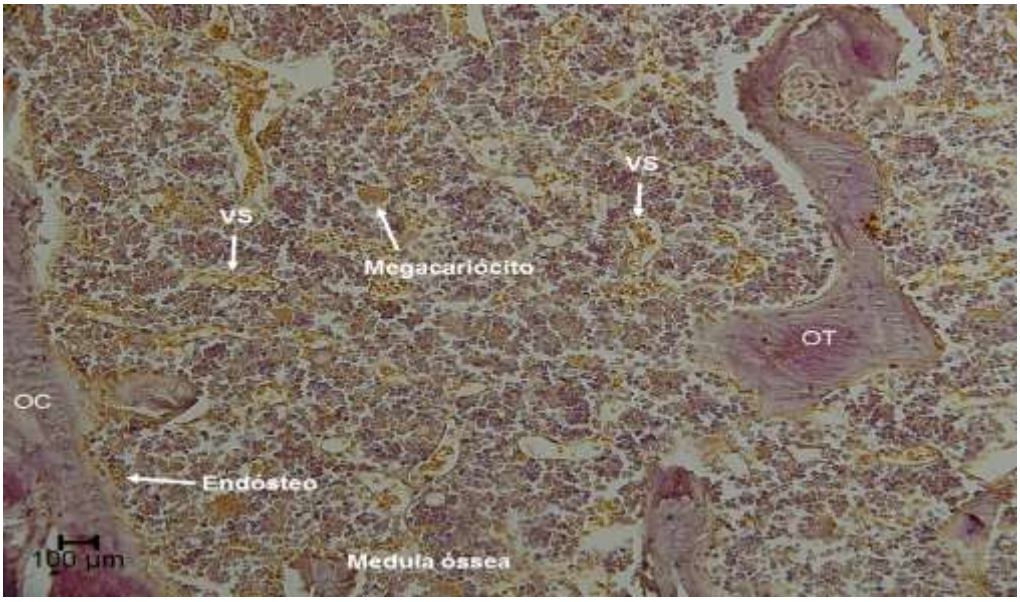


Figura 8 - Fotomicrografia de corte histológico da medula óssea femoral para imunomarcação de FN por imunohistoquímica. **(A)** grupo controle **(B)** grupo desnutrido **(C)** controle negativo da reação. Aumento de 200X. **OC** (Osso Cortical), **OT** (Osso Trabecular) e **VS** (Vaso Sinusoidal). Fotomicrografia representativa de um experimento com N=5 para o grupo controle e N=5 para o grupo desnutrido. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

A) Controle



B)Desnutrido



C) Controle negativo da reação

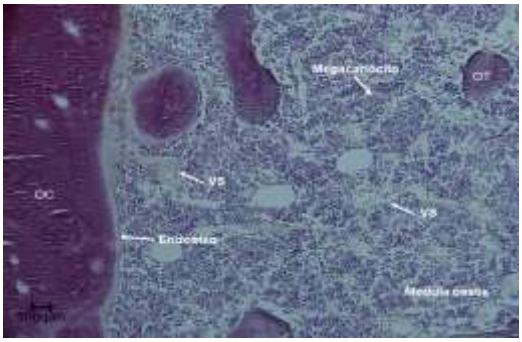
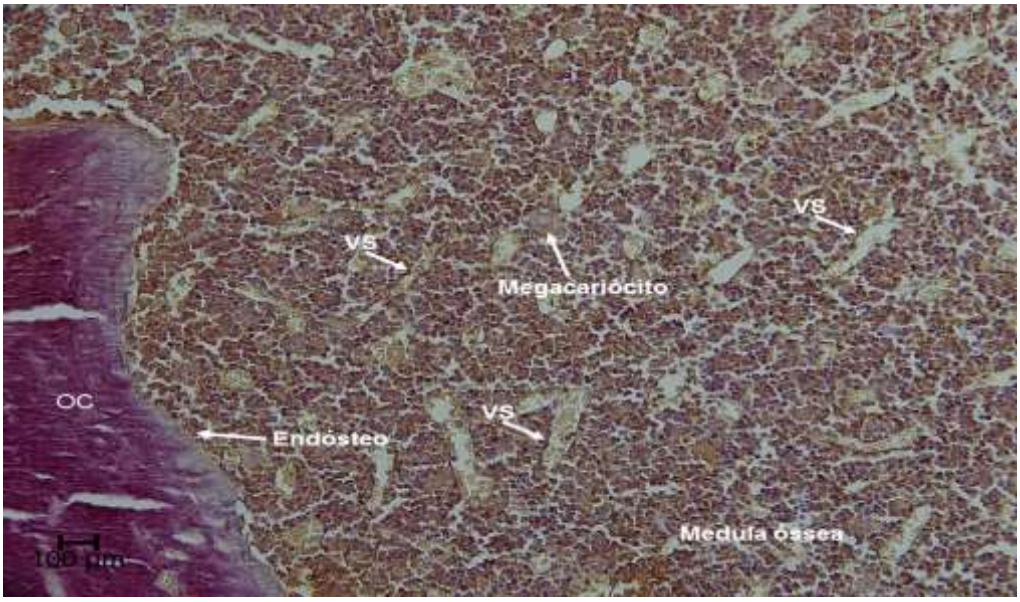
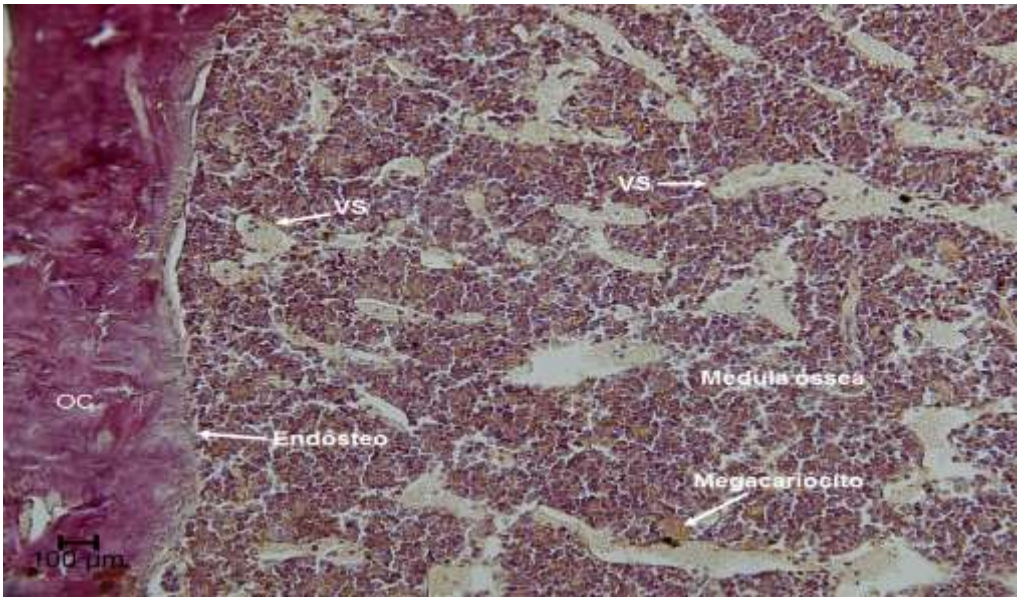


Figura 9 - Fotomicrografia da medula óssea, imunomarcação de MMP-9 por imunohistoquímica. **(A)** grupo controle **(B e B1)** grupo desnutrido **(C)** controle negativo da reação. Aumento de 200X. **OC** (Osso Cortical), **OT** (Osso Trabecular) e **VS** (Vaso Sinusoidal). Fotomicrografia representativa de um experimento com N=5 para o grupo controle e N=5 para o grupo desnutrido. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

A) Controle



A) Desnutrido



B) Controle negativo da reação

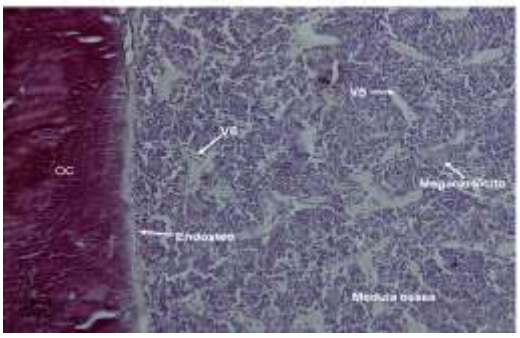


Figura 10 - Fotomicrografia de corte histológico da medula óssea femoral para imunomarcação de MMP-2 por imunohistoquímica. **(A)** grupo controle **(B e B1)** grupo desnutrido **(C)** controle negativo da reação. Aumento de 200X. **OC** (Osso Cortical), **OT** (Osso Trabecular) e **VS** (Vaso Sinusoidal). Fotomicrografia representativa de um experimento com N=5 para o grupo controle e N=5 para o grupo desnutrido. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.9 Avaliação das citocinas sintetizadas por células estromais do estroma mdeular *in vitro*

No sobrenadante das culturas de longa duração do grupo desnutrido do 28º dia de cultivo a concentração de TNFα foi menor que a do grupo controle do 28º e 35º dia de cultivo. A concentração dessa citocina no sobrenadante do 35º dia de cultivo não diferiu entre os grupos analisados (**Gráfico15 A**).

A concentração de TGFβ foi menor no estroma do grupo desnutrido do 28º dia de cultivo, quando comparado ao grupo controle do mesmo período. Não foi observada diferença significativa na concentração de TGFβ entre os grupos no 35º dia de cultivo (**Gráfico 15 B**).

Em relação a concentração de IL-1β, não foi observado diferença significativa entre os grupos e dias analisados (**Gráfico 15 C**).

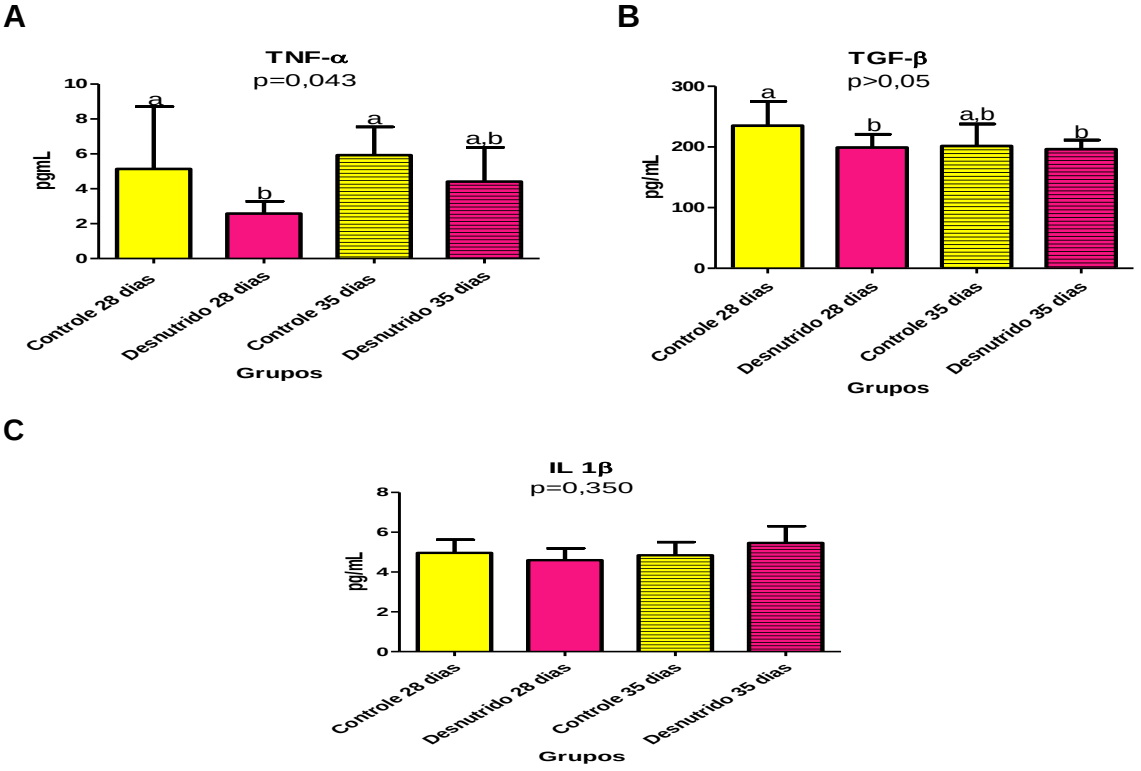


Gráfico 15 – Valores da concentração de citocinas no sobrenadante da cultura de células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. **(A)** Quantificação de TNFα. Os valores estão apresentados por média geométrica e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. Quantificação **(B)** TGFβ, **(C)** IL1β. Os valores estão expressos em média e (intervalo de confiança de 95%). Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=10) e grupo desnutrido (N=10). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.10 Análise da expressão de RNAm dos genes da FN e suas isoformas, MMPs, TIMPs, AKT, mTOR e LC3β

O gene β-actina foi selecionado como gene endógeno para normalização dos valores da expressão gênica.

5.10.1 Expressão do RNAm de FN e suas isoformas em células totais da medula óssea *ex vivo*

A expressão de RNAm da FN total e suas isoformas EDA, EDB e IIICS na médula óssea *ex vivo,* não apresentaram diferenças significativas entre os grupo e dias analisados (**Gráfico 16 A, B, C e D**).

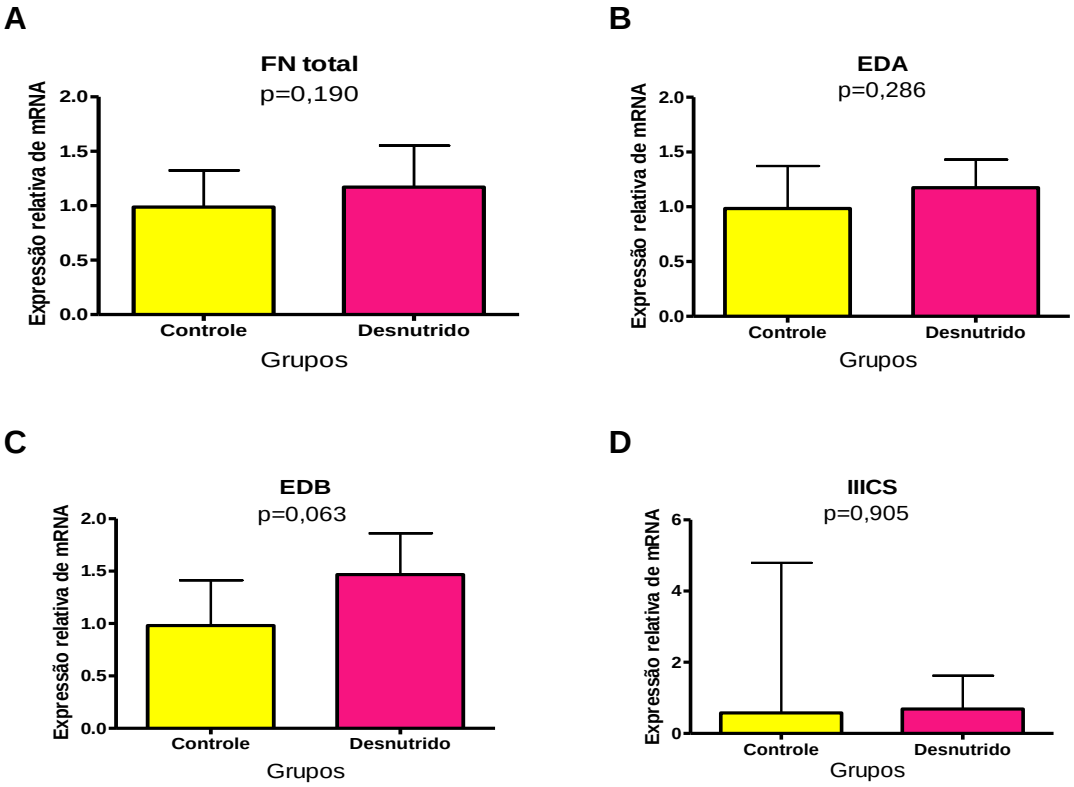


Gráfico 16 - Análise da expressão de RNAm da FN total e suas isoformas (EDA, EDB e IIICS) em células totais da medula óssea *ex vivo*. Expressão de RNAm da **(A)** FN total, **(B)** isoforma EDA, **(C)** isoforma EDB e **(D)** isoforma IIICS. Os valores estão apresentados por média geometrica e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Mann-Whitney. Grupo controle N=4 e grupo desnutrido N=4. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.10.2 Expressão do RNAm de FN e suas isoformas em células do estroma medular ósseo *in vitro*

Não houve diferença significativa na expressão de RNAm de FN total, e suas isoformas; EDA e EDB no estroma medular ósseo *in vivo* entre os grupos e dias analisados (**Gráfico 17 A, B e C**). Em relação a isoforma IIICS foi observado que o estroma oriundo de células do grupo desnutrido do 28º dia de cultivo apresentou menor quantidade de RNAm da região IIICS, quando comparado ao estroma oriundo de células do grupo desnutrido do 35º dia de cultivo. No entanto, não foi observado diferença entre o grupo desnutrido do 28º dia e 35º dia de cultivo quando comparado aos seus respectivos controles (**Gráfico 17 D**).

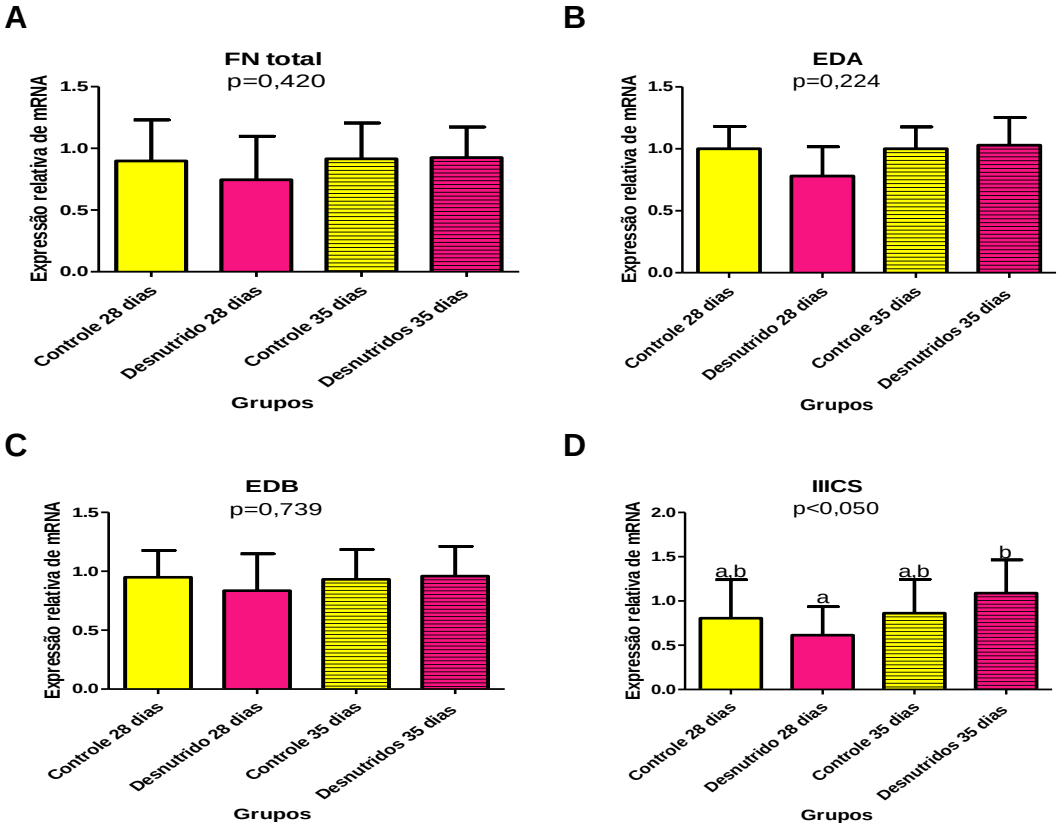


Gráfico 17 - Análise da expressão de RNAm da FN total e suas isoformas (EDA, EDB e IIICS) no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm **(A)** FN total, **(C)** isoforma EDB, **(D)** isoforma IIICS. Os valores estão apresentados por média geométrica e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. **(B)** Expressão de RNAm isoforma EDA. Os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=10) e grupo desnutrido (N=10). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.10.3 Expressão do RNAm de MMP-2 e MMP-9 em células do estroma medular ósseo *in vitro*

A expressão de RNAm da MMP-2 no estroma medular ósseo *in vitro*, não foi diferente entre os grupos e dias analisados (**Gráfico 18 A)**. Mas o estroma medular ósseo *ex vivo* do grupo desnutrido do 28º dia de cultivo apresentou maior expressão de RNAm da MMP-9, quando comparado ao grupo desnutrido do 35º dia de cultivo. No entanto, não foi observada diferença entre o grupo desnutrido do 28º dia e 35º dia de cultivo, quando comparado aos seus respectivos controles (**Gráfico 18 B**).

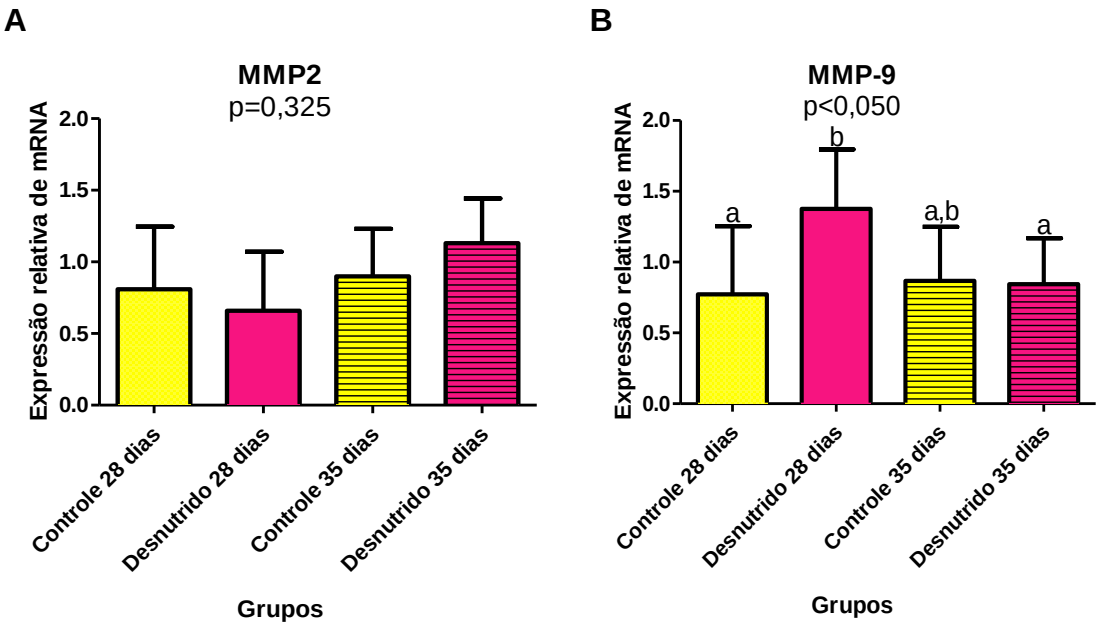


Gráfico 18 – Análise da expressão de RNAm das MMPs no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm **(A)** MMP-2, **(B)** MMP-9. Os valores estão apresentados por média geométrica e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. Grupo controle (N=10) e grupo desnutrido (N=10). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferente entre os grupos.

5.10.4 Expressão do RNAm de TIMP-1 e TIMP-2 em células do estroma medular ósseo *in vitro*

Em relação a expressão de RNAm da TIMP-1, foi observado que o estroma do grupo desnutrido do 28º dia de cultivo apresentou maior quantidade expressão de RNAm quando comparado ao grupo desnutrido do 35º dia de cultivo. Não houve diferença significativa entre o estroma grupo desnutrido do 28º dia e 35º dia de cultivo quando comparado aos seus respectivos controles (**Gráfico 19 A**). Não houve diferença significativa na expressão de RNAm da TIMP-2 no estroma medular ósseo *in vivo* entre os grupos e dias analisados (**Gráfico 19 B**).

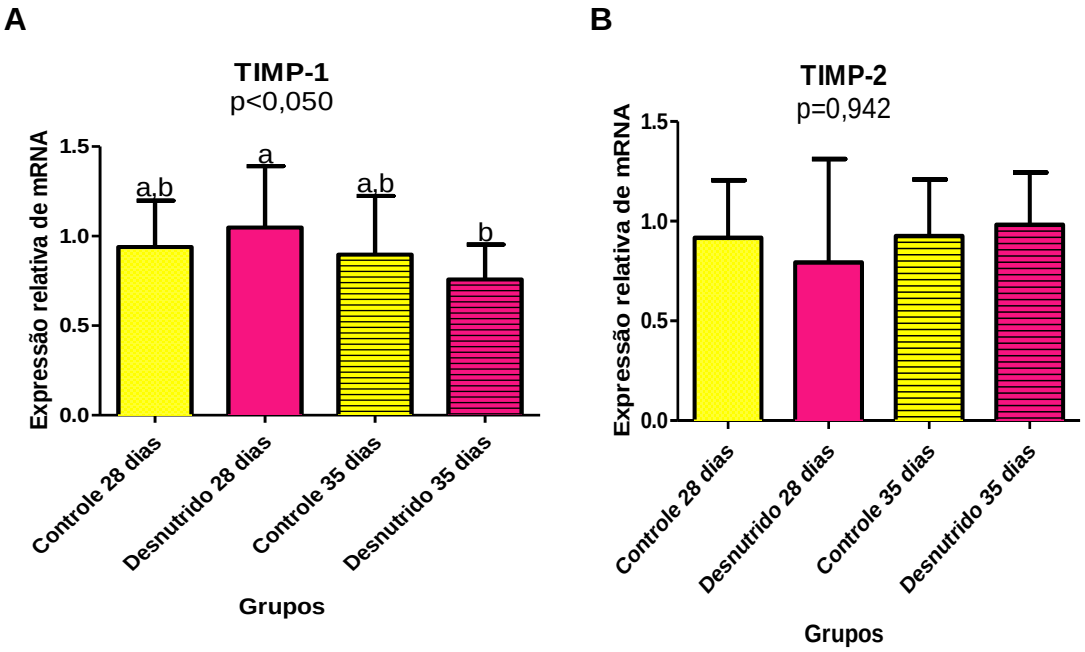


Gráfico 19 - Análise da expressão de RNAm das TIMPs no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm **(A)** TIMP-1, **(B)** TIMP-2. Os valores estão apresentados por média geométrica e (intervalo de confiança de 95%). Foi utilizado o teste Kruskal-Wallis com pós teste em Dunn. Grupo controle (N=10) e grupo desnutrido (N=10). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferente entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.10.5 Expressão do RNAm de AKT1, AKT2 em células do estroma medular ósseo *in vitro*

Os resultados da expressão dos RNAm de AKT mostraram que o estroma medular ósseo *in vivo* do grupo desnutrido do 35º dia de cultivo apresentou menor expressão de AKT1 quando comparado aos grupos controle do 28º e 35º dia de cultivo e ao grupo desnutrido do 28º dia de cultivo (**Gráfico 20 A**). A expressão de AKT2 não apresentou diferença significativa entre os grupos e dias analisados (**Gráfico 20 B**).

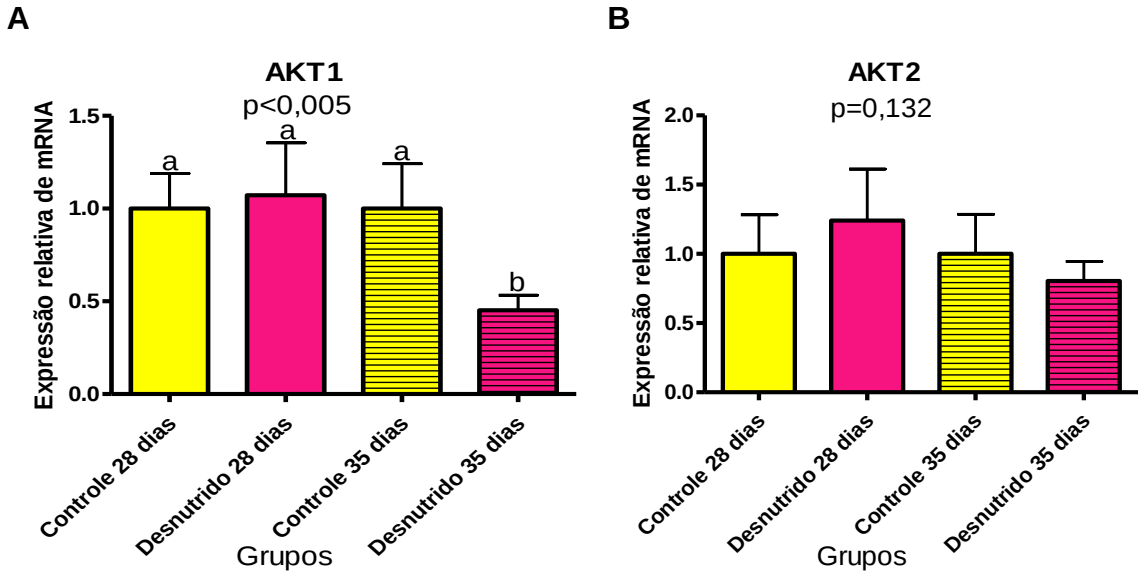


Gráfico 20 - Análise da expressão de RNAm do AKT no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm (**A**) AKT1 e (**B**) AKT2, Os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=10) e grupo desnutrido (N=10). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.10.6 Expressão do RNAm de mTOR em células do estroma medular ósseo *in vitro*

O estroma medular ósseo oriundo de células do grupo desnutrido do 28º dia de cultivo apresentou maior expressão de RNAm de mTOR quando comparado aos grupos controle do 28º e 35º dia de cultivo e ao grupo desnutrido do 25° dia de cultivo (**Gráfico 21 A**).

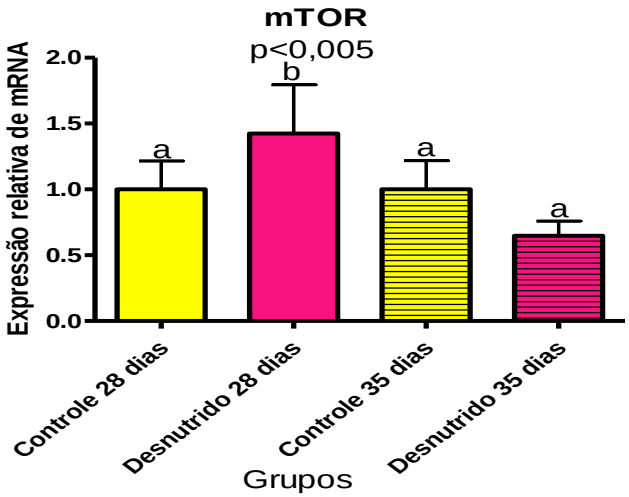


Gráfico 21 - Análise da expressão de RNAm do mTOR no estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm mTOR, Os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=10) e grupo desnutrido (N=10). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferentes entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

5.10.7 Expressão do RNAm de LC3α e LC3β em células do estroma medular ósseo *in vitro*

Foi detectado RNAm para as duas isoformas do LC3, LC3α e LC3β. Houve maior expressão de RNAm tanto do LC3α quanto do LC3β no estroma medular ósseo *in vitro* do grupo desnutrido do 35º dia de cultivo, quando comparado aos grupos controle do 28º e 35º dia de cultivo e ao grupo desnutrido do 28º dia de cultivo (**Gráfico 22 A e B**).

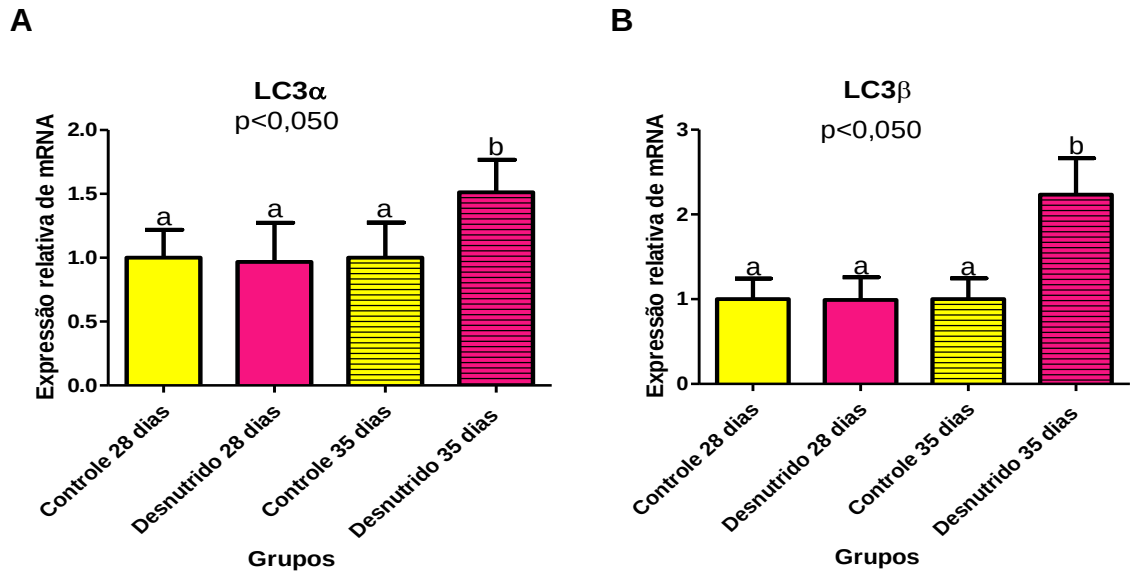


Gráfico 22 - Análise da expressão de RNAm do LC3α e LC3β nas células do estroma medular ósseo *in vitro* nos 28º e 35º dia de cultivo. Expressão de RNAm. (**A**) LC3α (**B**) LC3β. Os valores estão apresentados por média e intervalo de confiança de 95%. Foi utilizado o teste Anova (One-Way) com pós teste em Bonferroni. Grupo controle (N=10) e grupo desnutrido (N=10). Colunas com letras diferentes são de valores significativamente diferente entre os grupos. A letra N indica o número de camundongos avaliados.

Em síntese, observamos que o modelo murino de desnutrição proteica desenvolvido nesta pesquisa resultou nas seguintes alterações nutricionais, hemopoéticas e do estroma medular ósseo:

- redução do peso corporal, proteínas totais e albumina plasmática;
- pancitopenia no sangue periférico, hipoplasia medular com redução de precursores mieloides da medula óssea e sem alterações evidentes no histopatológico da medula óssea;
- aumento da deposição de fibronectina nas regiões subendosteais, perivascular e nas regiões próximas ao osso trabecular, observado em cortes histológicos da medula femoral;
- não houve alterações significativas da expressão de RNAm de FN e suas isoformas em células do estroma medular ósseo *in vitro* e em células totais da medula óssea *ex vivo*;
- não houve modificações na imunolocalização de MMP-2 e MMP-9, observada em cortes histológicos da medula femoral;
- aumento da expressão do RNAm de MMP-9 em células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo. Não houve alterações significativas em MMP-2;
- não houve alterações quantitativas nas formas pró-enzima e intermediária de MMP-2, pró-enzima e ativa de MMP-9 e na atividade de MMP-2 e MMP-9 em sobrenadante da cultura de células do estroma medular ósseo;
- não houve modificações significativas na expressão do RNAm e quantificação da proteína de TIMP-1 e TIMP-2 em células do estroma medular ósseo *in vitro*;
- houve redução significativa de TNFα, TGFβ no sobrenadante da cultura de células do estroma medular ósseo em 28 dias de cultivo;
- houve redução significativa na expressão do RNAm de AKT1 em células do estroma medular ósseo de 35 dias de cultivo;

- houve aumento significativa na expressão do RNAm de mTOR em células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo;
- houve redução significativa das formas fosforiladas de PI3K, AKT, PTEN, mTOR e mTOR total em células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo;
- houve aumento da expressão de RNAm de LC3α e LC3β em células do estroma medular ósseo de 35 dias de cultivo;
- detecção da expressão proteica de LC3β e suas formas I e II em células do estroma medular ósseo *in vitro*, com aumento significativo da expressão de LC3β-II em 28 dias de cultivo e menor expressão em 35 dias de cultivo.

6. DISCUSSÃO

6.1 Aspectos nutricionais e hematológicos

O modelo experimental desenvolvido neste trabalho, caracteriza-se por induzir à desnutrição proteica, devido à redução de proteínas contidas na ração oferecida aos camundongos. Não houve modificações nos demais componentes da ração, com exceção do amido. Nesse modelo experimental não houve diferença significativa no consumo de ração entre os grupos de camundongos analisados, porém, os camudongos desnutridos apresentaram redução da massa corporal em função da menor ingestão de proteínas, o que pode estar relacionado à depleção do tecido muscular esquelético para fornecimento de aminoácidos para os processos anabólicos. Esses resultados vêm ao encontro a dados já obtidos pelo nosso grupo (XAVIER et al., 2007; BORELLI, 2009; NAKAJIMA, 2014) e também de trabalhos desenvolvidos com modelo de desnutrição proteica por outros (TOMERA; MARTYN,1989; CROZIER et al., 2009; SUGIYAMA et al., 2011; RODRIGUES-BARBOSA et al., 2012). A redução da massa corporal pode variar de acordo com as diferentes concentrações de proteína na ração, com a duração do experimento e a espécie utilizada.

Os camundongos desnutridos apresentaram diminuição nas concentrações de proteínas totais e albumina plasmática decorrente da deficiência de aminoácidos disponíveis para a síntese dessas proteínas. As proteínas plasmáticas são usadas como recurso para avaliação da desnutrição, sendo a albumina um dos parâmetros bioquímico mais utilizado para a avaliação do estado nutricional (CABRAL et al., 2001; FONTOURA et al., 2006). Porém, dados da literatura são conflitantes em relação à utilização da albumina como indicador bioquímico da desnutrição, pois a diminuição da albumina pode também ser decorrente de processos infecciosos. A pré-albumina é considerada melhor indicador bioquímico da desnutrição, uma vez que é mais sensível às mudanças do *status* de proteína e energia no organismo (INGENBLEEK; YOUNG, 2002; FONTOURA et al., 2006; SHENKIN, 2006). Dados já obtidos pelo nosso grupo demonstraram que camundongos desnutridos apresentam menor concentração de pré-albumina plasmática (FOCK et al., 2012; CUNHA et al.,

2013).

Foi observada menor celularidade na medula óssea dos camundongos desnutridos, na contagem de células totais nucleadas, apesar de não haver diferença na celularidade observada nos corte histológico da medula óssea. Essa aparente discrepância pode ser explicada pelo fato de que, em termos histológicos, a celularidade da medula óssea é considerada normal quando há a presença de 25 a 75% de células hemopoéticas (FARHI et al., 2004). Em nosso modelo experimental a menor celularidade da medula óssea aconteceu, em parte, devido à diminuição da população das CTPH (células tronco progenitoras hemopoéticas) presentes no nicho medular. Foi observado em camundongos desnutridos aumento da população das CTPH nas fases G0/G1 (quiescência) e diminuição nas fases S/G2/M (proliferação), fato esse relacionado à redução das proteínas indutoras do ciclo celular (Ciclina D1, Cdk4, Cdk2, Cdc25a e Ciclina E) e ao aumento das proteínas inibitórias do ciclo celular (P21 e P27) (NAKAJIMA et al., 2014), resultando no comprometimento do ciclo celular das CTPH na medula óssea. As alterações observadas no ciclo celular das CTPH resultaram na redução de células primitivas hemopoéticas (XAVIER et al., 2007, BORELLI et al., 2009, NAKAJIMA, 2014) e também de progenitores de linhagem, redução no número de células das unidades formadoras de colônias grânulo-monocítica (CFU-GM), unidades de formação expansiva eritróide (BFU-E) e unidades formadoras de colônias eritróide (BORELLI et al., 2007). Em consequência da redução de células precursoras. os camundongos desnutridos apresentaram pancitopenia no sangue periférico, dados estes já observados em trabalhos anteriores (BORELLI et al., 2007; XAVIER et al., 2007; NAKAJIMA et al., 2014).

6.2 Fibronectina

A CTPH está em íntimo contanto com a MEC presente no microambiente hemopoético e a interação dessa célula com a MEC acontece por meio das integrinas, proteínas de adesão celular transmembrana. As integrinas VLA4 e VLA5 são as principais ligantes da FN e são expressas pelas CTPH. A CTPH dos camundongos desnutridos apresentaram maior quantidade de VLA5 (dados ainda

não publicados NAKAJIMA, 2010) enquanto que a MEC da medula óssea apresentou maior quantidade de FN (XAVIER et al., 2007; VITURI et al., 2000). Neste trabalho também observamos aumento de FN, principalmente nas regiões subendosteais e perivascular, que são regiões de nicho das CTPH. Em células estromais da medula óssea de camundongos desnutridos, observamos aumento da expressão proteica de FN em 28 dias de cultivo enquanto que em 35 dias de cultivo observamos diminuição de FN (dados ainda não publicados SILVA, 2011). Apesar do aumento do receptor e do seu ligante foi observado o comprometimento do ciclo celular das CTPH (NAKAJIMA et al., 2014). Tendo em vista que essa interação é importante para a progressão do ciclo celular, podemos inferir que as interações da FN com as integrinas podem estar comprometidas.

A FN possui múltiplos domínios para a ligação com as integrinas, proteínas da MEC e outras moléculas de FN (SCHWARZBAUER; SECHLER, 1999; LEISS et al., 2008). No entanto, esses domínios podem estar ou não presentes na molécula de FN, pois no momento da sua síntese pode ocorrer *splicing* alternativo originando diferentes isoformas de FN (FRENCH_CONSTANT, 1995, WHITE e tal., 2008). Desse modo, apesar da presença das integrinas, a FN pode não apresentar a região de ligação para as mesmas. Dados ainda não publicados do nosso grupo demonstraram que células do estroma medular ósseo de camundongos desnutridos possuem menor quantidade da região EDA na molécula de proteína da FN (SILVA, 2011), região essa de interação com integrinas. Na ausência da interação das integrinas presentes na CTPH com a FN não ocorre a transdução de sinal para as vias de sinalização (WHITE et al., 2008), o que pode explicar a não progressão do ciclo celular e, consequentemente, menor celularidade da medula óssea e as alterações hematológicas observadas nos camundongos desnutridos.

Para elucidar as alterações quantitativas da expressão proteica de FN e da região EDA previamente observadas em camundongos desnutridos, avaliamos a expressão do RNAm de FN e suas isoformas originadas por *splicing* alternativos no RNA. A via de AKT está associada aos *splicing* alternativos na FN. A ativação da via altera os níveis de fosforilação das proteínas SR SF2/ASF, resultando no *splicing* alternativo da região EDA na molécula de FN, originando assim, diferentes isoformas de FN (BLAUSTEIN et al., 2007; WHITE et al., 2008) (**Figura 11**). White et al. (2010), observaram que fibrolastos oriundos de embrião de camundongos Pten $^{-/-}$, apresentaram maior fosforilação de AKT, aumentando a expressão proteica de FN e

da região EDA. Mas, quando essas células foram tratadas com inibidor de mTOR, rapamicina, ocorreu diminuição da expressão proteica de FN e da região EDA, concomitantemente com redução das formas fosforiladas das proteínas SF2/ASF. Portanto, a via de sinalização AKT/mTOR regula a expressão e o *splicing* da FN. Não observamos alterações quantitativas na expressão do RNAm de FN, EDA e as demais isoformas em células totais da medula óssea e em células do estroma medular ósseo *in vitro,* mas em resultados anteriores observamos alterações da expressão proteica de FN e região EDA (SILVA, 2011), já mencionadas. Sendo assim, podemos sugerir que as alterações quantitativas de FN e suas isoformas não estão relacionadas às alterações na expressão do RNAm.

6.3 Via de sinalização AK/mTOR

Com o intuito de esclarecer as alterações da expressão proteica de FN e região EDA, investigamos se a via de sinalização de AKT/mTOR poderia estar associada a essas alterações.

No presente projeto, avaliamos nas células do estroma medular ósseo *in vitro* parte da via de AKT. Essa avaliação foi realizada em dois momentos distintos da cultura celular: em 28 dias e em 35 dias de cultivo.

Não foram observadas alterações quantitativas da expressão de RNAm e proteica de AKT total em 28 dias de cultivo do estroma medular ósseo de camundongos desnutridos, resultado semelhante foi obtido em células totais da medula óssea de camundongos desnutridos (dados ainda não publicados, BELTRAN, 2012). Contudo, há menor fosforilação no sítio treonina do AKT nesses mesmos camundongos. Essa menor fosforilação no sítio treonina do AKT parece não estar associada à ação do PDK, pois não foram observadas alterações quantitativas de PDK total e fosforilado nas células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo. Essa menor fosforilação de AKT no sítio treonina pode estar envolvida com alterações quantitativas de PIP3. Uma vez que para ocorrer a fosforilação no sítio treonina, o AKT deve estar colocalizado com o PDK, colocalização esta dependente de PIP3, ou seja, o AKT possui um domínio denominado PH que interage com o PIP3 e esse, por sua vez, recruta o AKT para a

membrana plasmática, alterando sua conformação para permitir a fosforilação por PDK (**Figura 11**) (ANDERSON et al.,1998; DOWNWARD, 1998; SONG et al., 2005).

O PIP3 é produzido por PI3K fosforilado, o que ocorre quando a via é ativada. Foi observado que as células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo apresentaram menor fosforilação de PI3K na subunidade reguladora p55. A subunidade reguladora p55 tem um domínio de ligação com a subunidade catalítica e sua fosforilação está envolvida na regulação da atividade de PI3K (FUNAKI et al., 2000). Desta forma, a menor fosforilação de p55 conduz a alterações quantitativa de PIP3 e, por conseguinte, menor fosforilação do sítio treonina do AKT. A atividade do PI3K também pode ser regulada por PTEN, que desfosforila o PIP3 (MANNING; CANTLEY, 2007; NICHOLSON; ANDERSON, 2008), mas não encontramos alterações quantitativas de PTEN nas células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo (**Figura 11**).

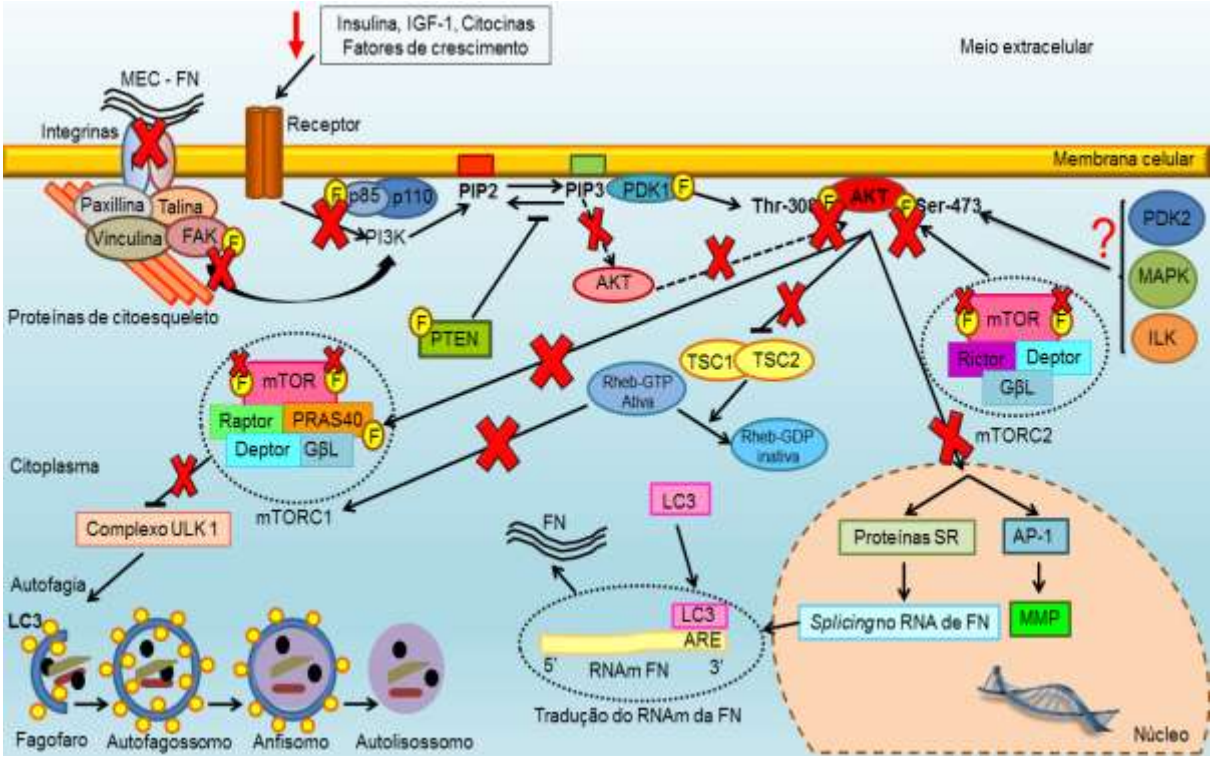


Figura 11: Via esquemática proposta das alterações da via de sinalização de AKT e expressão de MMP e isoformas de FN em células do estroma medular ósseo em **28 dias de cultivo**. Fonte: Adaptado de White et al., 2010.

A insulina e o IGF-1 (*insuline-like growth factor-1*) ativam PI3K, por meio de um receptor de tirosina quinase (BIBOLLET-BAHENA; ALMAZAN, 2009;

CHAKRABORTY et al., 2010). Fatores de crescimento como o TNF-α e TGF-β, também podem ativar o PI3K (MANNING; CANTLEY, 2007, LEE et al., 2007, FAURSCHOU, GNIADECKI., 2008, ZHANG, 2009). Os camundongos desnutridos apresentam menor concentração de insulina e IGF-1 (NAKAJIMA et al., 2014). Também foi observado que as células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo de camundongos desnutridos têm menor quantidade de TNF-α e TGF-β. Sendo assim, podemos inferir que as alterações na fosforilação de AKT no sítio treonina, podem ser devidas a não ativação de PI3K (**Figura 11**).

Adicionalmente, a menor fosforilação do sítio treonina do AKT, também pode estar associada a alterações da interação integrina-FN, uma vez que essa interação conduz também à ativação de FAK (*focal adhesion kinase*), que por sua vez pode estar associado à ativação da via de AKT (BAILLAT et al., 2008; MENG et al., 2009). Camundongos desnutridos apresentaram menor fosforilação de FAK (dados não publicados NAKAJIMA, 2010).

Foi observada menor fosforilação do sítio serina do AKT em células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo de camundongos desnutridos. Essa menor ativação de AKT pode estar envolvida com a menor expressão proteica da região EDA, apesar de não terem sido observadas alterações na expressão do seu RNAm. Em dados obtidos anteriormente (SILVA, 2011), foi observada a expressão de RNAm com presença e ausência do exon de EDA, mas não foi possível detectar diferenças quantitativas entre eles. Em vista disso, a menor ativação de AKT pode estar envolvida na expressão de RNAm sem o exon EDA e, consequentemente, menor expresão proteica de EDA.

Várias proteínas quinases podem estar envolvidas na fosforilação do sítio serina do AKT, tais como PDK2, MAP (*mitogen-activated protein*), ILK (integrin-linked kinase) e mTOR C2 (DONG , LIU, 2005) (**Figura 11**).

As células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo dos camundongos desnutridos apresentaram maior expressão do RNAm de mTOR porém com menor expressão proteica de mTOR total. Adicionalmente, foi observada menor fosforilaçao nos dois sítios serinas de mTOR; esse resultado também foi obtido em células totais da medula óssea de camundongos desnutridos (dados ainda não publicados, BELTRAN, 2012). A menor fosforilação de mTOR pode ter ocorido devido à menor quantidade de insulina e IGF-1, que ocasiona a menor fosforilação de AKT e ativação de TSC1/TSC2 que inibe Rheb, sendo esse último responsável pela

ativação de mTORC1 (**Figura 11**). O mTORC1 também pode ser ativado por aminoácidos, especialmente por leucina e arginina e uma família de GTPases; RagA, RagB, RagC e RagD. Os animoácidos ativam Rag GTPases, que formam heterodímeros e se associam com Raptor, o que permite a fosforilação de mTORC1 (WULLSCHLEGER et al., 2006, ZONCU et al., 2011, LAPLANTE, SABATINE, 2012). Os camudongos desnutridos apresentaram menor concentração sérica de isoleucina, lisina, metionina, valina e taurina (dados ainda não publicados, BELTRAN, 2012), o que pode conduzir à não ativação das Rag GTPases, resultando na desfosforilação de mTORC1 (WULLSCHLEGER et al., 2006, ZONCU et al., 2011). Honda et al (2011), observaram que pacientes com hepatite C crônica, que apresentavam diminuição das concentrações plasmática de leucina, isoleucina e valina; devido à desnutrição associada ao processo patológico, apresentaram menor fosforilaçao de mTOR. Esse resultado assemelha-se ao obtido *in vitro,* onde células hepáticas cultivadas em baixas concentrações de leucina, isoleucina e valina também expressaram menor fosforilação de mTOR.

Coop et al (2009), demonstraram que células tumorais com deleção de Raptor tiveram fosforilação do síto serina S2481 e ausência de fosforilação do sítio S2448 de mTOR, já na deleção de Rictor apresentaram fosforilação de S2448 e ausência de fosforilação de S2481. Esses resultados indicam que o a fosforilação do sítio S2448 está associada a ativação de mTORC1 e a fosforilação do sítio S2481 está associada à ativação de mTORC2. Sendo assim, podemos inferir que a células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo, apresentaram menor atividade de mTORC1 e mTORC2, e este último levou à menor fosforilação do sito serina do AKT (**Figura 11)**.

Coop et al (2009), ainda observaram que células tumorais com deleção de Rictor e Raptor, cultivadas com insulina, apresentaram aumento da fosforilação dos sítios S2448 e S2481, indicando que tanto mTORC1 quanto mTORC2 podem ser ativados por insulina.

Apesar da menor fosforilação de mTOR em células do estroma medular ósseo de 28 dias, não foram observadas alterações quantitativas de Raptor, PRAS40 total e fosforilado, proteínas essas que formam o complexo mTORC1, Rictor e GβL, formam o complexo mTORC2. Isso confirma que que a inatividade de mTORC1 e mTORC2 em 28 dias de cultivo, deve-se à menor fosforilação e não às alterações na formação dos complexos.

Em 35 dias de cultivo as células do estroma medular ósseo dos camundongos desnutridos não apresentaram alterações quantitativas de PI3K total e fosforilado, Pten, PDK total e fosforilado, esse último responsável pela fosforilação do sítio treonina do AKT (DONG; LIU, 2005; SONG et al., 2005; VADLAKONDA et al., 2013). Também não foram observadas alterações quantitativas em relação ao AKT total e à fosforilação do sítio treonina e serina. Em relação ao mTORC1 e mTORC2, não foram observadas alterações quantitativas.

Desde modo, podemos inferir que a via de AKT/mTOR em células do estroma medular ósseo de 35 dias de cultivo de camundongos desnutridos não apresentou modificações em sua ativação. O AKT parece não estar envolvido na regulação do *splicing* alternativo da região EDA, visto que em 35 dias de cultivo foi detectada diminuição da expressão proteica de EDA sem alterações da ativação do AKT.

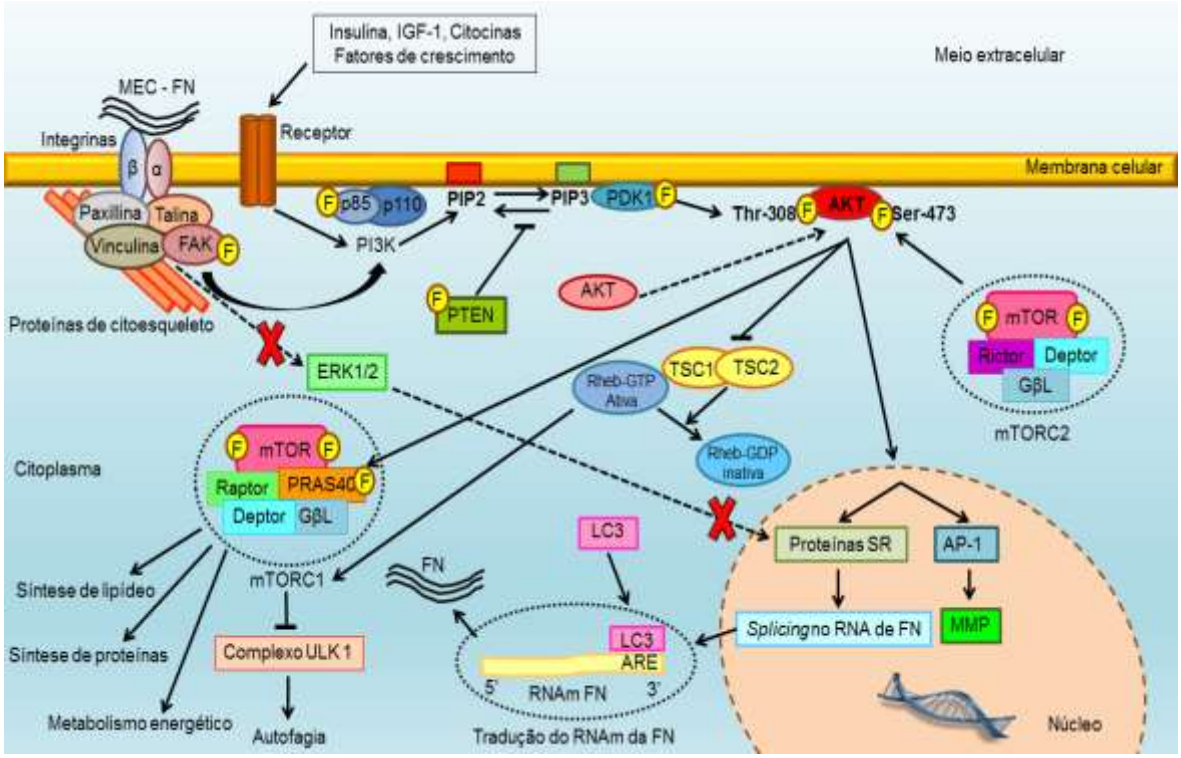


Figura 12 - Via esquemática proposta das alterações da via de sinalização de AKT/mTOR e expressão de MMP e isoformas de FN em células do estroma medular ósseo em **35 dias de cultivo**. Fonte: Adaptado de White et al., 2010.

Blaustein et al (2004, 2007) demonstraram que cultura de células do epitélio mamário de camundongos tratadas com inibidor de PI3k apresentaram menor expressão da região EDA e IIICS e quando tratadas com inibidor de MEK1, inibindo a fosforilação de ERK, também apresentaram menor expressão de EDA, sugerindo

assim, que tanto a via de sinalização PI3K-AKT quanto a via de sinalização MEK-ERK1/2 regulam a inclusão do exon EDA dentro do RNA mensageiro da FN (**Figura 12**). Trabalhos anteriores do nosso grupo já demostraram que as CTPH dos camundongos desnutrido apresentaram menor fosforilação de ERK (dados não publicados NAKAJIMA, 2010). Isso poderia explicar a redução da expressão proteica de EDA em células do estroma medular ósseo de 35 dias dos camundongos desnutridos. Menor fosforilação de ERK também pode conduzir à diminuição da expressão proteica de FN (PAN et al., 2015), o que pode elucidar a menor expressão proteica de FN nesse período. Mas será necessário pesquisar a expressão e ativação da via de sinalização de ERK em células do estroma medular ósseo, para esclarecermos a possível regulação de FN pela via de ERK.

6.4 Metaloproteinases de matriz

Para elucidar as alterações quantitativas da expressão proteica de FN observadas em camundongos desnutridos, também avaliamos a MMP-2 e a MMP-9, que são estão envolvidas na degradação de FN.

Foram detectadas a expressão proteica e a imunolocalização de MMP-2 e MMP-9 na medula óssea dos camundognos desnutridos. Não houve alterações quantitativas e na localização de MMP-2 e MMP-9 na medula óssea desses camundongos. Esses resultados não mostraram a atividade dessas proteínas no tecido mieloide dos camudongos desnutridos, sendo necessário um ensaio de atividade para que possamos avaliar a ação das MMPs na medula óssea *ex vivo*.

As MMPs são reguladas na transcrição, secreção, ativação e pela ação dos inibidores (BJORKLUND, KOIVUNEN, 2005). O cultivo de células musculares lisas da traqueia de humanos tratadas com TNF-α, induz ao aumento da expressão do RNAm, proteica e atividade de MMP-9, sem modificar os paramêtros da MMP-2. Mas quando tratadas com inibidor da via AKT e inibidor para o NF-κβ, que é um fator de transcrição, associadas com o tratamento de TNF-α, apresentam redução da expressão do RNAm de MMP-9. Desse modo, o TNF-α modula a MMP-9 por meio da via do AKT e pela ativação do NF-κβ (LEE et al., 2006). Em 28 dias de cultivo as células do estroma medular ósseo os camundongos desnutridos apresentaram

menor concentração de TNF-α, mas aumento da expressão do RNAm de MMP-9, não havendo modificações na atividade dessa proteína. Sendo assim, O TNF-α parece não regular a MMP-9 em células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo dos camundongos desnutridos. Mas estão envolvidas na regulação da MMP-9 em 35 dias de cultivo, que não apresentam alterações de TNF-α, via de AKT e MMP-9.

Qin et al (2012) demonstraram que células endoteliais da veia umbilical tratadas com IL-1β, têm aumento na expressão de RNAm, proteica e atividade de MMP-9, sem alterar a MMP-2, mas apresentaram menor expressão de RNAm e proteica de TIMP-1 e sem modificar TIMP-2. Quando essas células são tratadas com IL-1β e melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal que pode inibir MMP, mostram diminuição da expressão do RNAm e atividade de MMP-9, além de aumento na expressão do RNAm e proteica de TIMP-1. Também foi observado que o tratamento com IL-1β induz à translocação do NF-κβ para o núcleo e o tratamento combinado com melatonina conduz à supressão do NF-κβ. A IL-1β regula a MMP-9 por meio da ativação do NF-κβ. Células mesenquimais da medula óssea de humanos tratadas com IL1-β, que conduz o aumento da expressão do RNAm de MMP-9, não modificando a expressão do RNAm de MMP-2 e TIMPs (Ries et al.,2007). As células do estroma medular ósseo de 28 e 35 dias de cultivo dos camundongos desnutridos não apresentaram alteração na concentração de IL-1β. Podemos inferir que essa interleucina pode modular a MMP-9 e TIMP-1 tanto em 28 dias, quanto em 35 dias de cultivo. Isso se dá, pois não observamos alterações na expressão do RNAm e proteica de TIMP-1 em células do estroma medular ósseo de 28 e 35 dias de cultivo dos camundongos desnutridos.

Cultura de astrócitos de cérebro de ratos tratados com TGF-β apresentam maior expressão do RNAm e atividade MMP-9, sem modificações na MMP-2 e aumento da fosforilação de ERK1/2. Quando essas células foram tratadas com inibidor de MEK, juntamente com TGF-β, expressaram menor quantidade de RNAm e atividade de MMP-9 e diminuição na fosforilação de ERK. Desse modo o TGF-β regula a MMP-9 via ERK (HSIEH et al., 2010). As células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo dos camudongos desnutridos apresentaram diminuição na concentração de TGF-β. Sendo assim, a regulação de MMP-9 em 28 dias de cultivo não é realizada pelo o TGF-β. Em 35 dias de cultivos das células do estroma medular ósseo de camundongos desnutridos, não foram observadas alterações

quantitativas na concentração de TFG-β e na MMP-9, o que indica a participação dessa citocina na regulação da MMP-9.

Portanto, os efeitos do TNF-α, IL-1β e TGF-β sobre a regulação de MMP-9 e MMP-2, bem como de inibidores, parecem agir de maneiras distintas em células do estroma medular ósseo de 28 e 35 dias de cultivo dos camundongos desnutridos.

A atividade das MMP-2 e MMP-9 é regulada pela ação de TIMP-2 e TIMP-1, respectivamente. As células do estroma medular ósseo dos camudongos desnutridos de 28 e 35 dias de cultivo não apresentaram alterações quantitativas na expressão e na concentração de TIMP-1 e TIMP-2, o que pode justificar a não modificação da atividade das MMP-2 e MMP-9 nos mesmos períodos de cultivo.

Portanto, as alterações quantitativas de FN encontradas não estão associadas à ação das MMP-2, MMP-2 bem como de seus inibidores.

6.5 LC3

As alterações encontradas na via de sinalização AKT/mTOR não elucidam totalmente o aumento da expressão proteica de FN. A nossa hipótese é que outros mecanismos estejam envolvidos na expressão proteica dessa proteína. A síntese da FN pode ser controlada por processos transcricionais e pós-transcricionais. O LC3 é uma proteína que pode controlar a FN a nível pós-transcricional, intensificando a expressão proteica de FN por meio do aumento da tradução do RNAm (ZHOU et al., 1997). Cann et al (2008) demonstraram que LC3β está envolvido na regulação da tradução do RNA FN, e não o LC3α. Além disso, a deleção do LC3β não modifica a expressão do RNAm de LC3α. No presente trabalho, observamos a expressão tanto do RNAm de LC3β quanto do LC3α sendo que o padrão de expressão do RNAm de ambos são semelhantes.

Analisamos apenas a expressão proteica de LC3β, onde foi detectado a forma I e II dessa proteína. Observamos aumento da expressão proteica da forma II do LC3β nas células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo dos camundongos desnutridos. Este resultados também foi encontrado em células totais da medula óssea de camundongos desnutridos (dados ainda não publicados, BELTRAN, 2012). Em resultados obtidos anteriormente, observamos aumento da expressão proteica

de FN em células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo (SILVA, 2011) e em células totais de medula óssea dos camundongos desnutridos (XAVIER et al., 2007; VITURI et al., 2000). Tendo vista esses achados, nossa hipótese é que o LC3β regula a expressão proteica de FN na desnutrição proteica. Não observamos alteração na expressão do RNAm de FN tanto em células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo quanto em células totais da medula óssea de camundongos desnutridos. Alterações quantitativas da expressão proteica de FN podem não estar relacionada com alterações quantitativas do RNAm. Células HT1080 transfectadas com plasmídeo de LC3 apresentaram aumento da expressão proteica de FN sem alteração na expressão do RNAm de FN, mas quando transfectadas com plasmídeo de LC3 mutante, ou seja, com redução da atividade na região ARE (*AU-rich element*) localizada na região 3' do RNAm, resultou menor expressão proteica de FN sem alterar a expressão do RNAm (YING et al., 2009).

Em células totais da medula óssea de camudongos desnutridos o aumento da expressão proteica de LC3β essa envolvido com aumento do processo autofágico, devido às alterações na via de sinalização de AKt/mTOR (dados ainda não publicados, BELTRAN, 2012). Mas não podemos afirmar se o aumento do LC3β em células do estroma medular ósseo de 28 dias de cultivo dos camundongos desnutridos também está envolvido com o aumento do processo autofágico, para isso é necessária análise de proteínas como Beclin-1 e Bcl-2, que regulam a autofagia (ZHOU et al., 2016).

Observamos que as células do estroma medular ósseo de 35 dias de cultivo de camundongos desnutrido mostraram menor expressão da forma II do LC3β com aumento da expressão do RNAm. Cann et al (2008) mostraram que fibroblastos oriundos de embrião de camundongos LC3β $^{-/-}$ apresentam menor síntese de FN, sem alterações quantitativas na expressão do seu RNAm. Podemos inferir que a menor expressão proteica de FN em células do estroma medular ósseo de 35 dias de camundongos desnutrido também pode estar relacionada à menor expressão proteica de LC3β.

7. CONCLUSÃO

Podemos concluir que a desnutrição proteica em camundongos conduz alterações quantitativas de fibronectina em células estromais da medula óssea de camudongos desnutridos. Essas alterações quantitativas não estão relacionadas à ação de MMP-2 e MMP-9, e sim com modificações da ativação da via de sinalização de AKT/mTOR, ocasionando a formação de isoformas de fibronectina e a ação de LC3β, que regula o processo pós-transcricional da fibronectina. Todas essas alterações favorecem o compromedimento da hemopoese de camundongos submetidos á desnutrição proteica.

REFERÊNCIAS[1]

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. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 1, p. 6–24, 2001.

AMĂLINEI, C.; CĂRUNTU, I. D.; BĂLAN, R. A. Biology of metalloproteinases. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 48, n. 4, p. 323–334, 2007.

ANDERSON, K. E.; COADWELL, J.; STEPHENS, L. R.; HAWKINS, P. T. Translocation of PDK-1 to the plasma membrane is important in allowing PDK-1 to activate protein kinase B. **Current biology: CB**, v. 8, n. 12, p. 684–691, 1998.

ARPINO, V.; BROCK, M.; GILL, S. E. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. **Matrix Biology**, v. 44-46, p. 247–254, 2015.

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

AXELSSON, I.; PITA, J. C.; HOWELL, D. S.; et al., Kinetics of proteoglycans and cells in growth plate of normal, diabetic, and malnourished rats. **Pediatric research**, v. 27, n. 1, p. 41–44, 1990.

BAILLAT, G.; SIRET, C.; DELAMARRE, E.; LUIS, J. Early adhesion induces interaction of FAK and Fyn in lipid domains and activates raft-dependent Akt signaling in SW480 colon cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1783, n. 12, p. 2323–2331, 2008.

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

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, p. S181–S191, 2003.

BAUER, J.; CAPRA, S.; FERGUSON, M. Use of the scored Patient-Generated

[1] De acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023

Subjective Global Assessment (PG-SGA) as a nutrition assessment tool in patients with cancer. **European journal of clinical nutrition**, v. 56, n. 8, p. 779–785, 2002.

BELTRAN, J. S. O. **Avaliação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição protéica,** 2013. (Dissertação).

BIANCO, P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. **Blood**, v. 117, n. 20, p. 5281–5288, 2011.

BIBOLLET-BAHENA, O.; ALMAZAN, G. IGF-1-stimulated protein synthesis in oligodendrocyte progenitors requires PI3K/mTOR/Akt and MEK/ERK pathways. **Journal of Neurochemistry**, v. 109, n. 5, p. 1440–1451, 2009.

BJÖRKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1755, n. 1, p. 37–69, 2005.

BLAUSTEIN, M.; PELISCH, F.; COSO, O. A.; et al. Mammary epithelial-mesenchymal interaction regulates fibronectin alternative splicing via phosphatidylinositol 3-kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 20, p. 21029–21037, 2004.

BLAUSTEIN, M.; PELISCH, F.; TANOS, T.; et al. Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 12, p. 1037–1044, 2005.

BLAUSTEIN, M.; PELISCH, F.; TANOS, T.; et al., Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. **Nature structural & molecular biology**, v. 12, n. 12, p. 1037–1044, 2005.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786–801, 2014.

BONONI, A.; AGNOLETTO, C.; DE MARCHI, E.; et al. Protein Kinases and Phosphatases in the Control of Cell Fate. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–26, 2011.

BORELLI, P. Fundamentos de Hematologia: Teoria e Prática, Ed. Blücher, 2014 (em impressão).

BORELLI, P.; BARROS, F. E. V.; NAKAJIMA, K.; et al. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica ... [et Al.]**, v. 42, n. 6, p. 523–530, 2009.

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

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: Effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutrition Research**, v. 15, n. 10, p. 1477–1485, 1995.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: Effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutrition Research**, v. 15, n. 10, p. 1477–1485, 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.

BORGES, Lúcia Rota et al. Can nutritional status influence the quality of life of cancer patients? **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 5, Oct. 2010 .

BOWERS, S. L. K.; BANERJEE, I.; BAUDINO, T. A. The extracellular matrix: at the center of it all. **Journal of molecular and cellular cardiology**, v. 48, n. 3, p. 474–482, 2010.

BRECHER, G. New methylene blue as a reticulocyte stain. **American journal of clinical pathology**, v. 19, n. 9, p. 895, 1949.

BRUNDTLAND, G. H. Nutrition and Infection: Malnutrition and Mortality in Public Health. **Nutrition Reviews**, v. 58, p. S1–S4, 2009.

CABRAL, M. J.; VIEIRA, K. A.; SAWAYA, A. L.; FLORÊNCIO, T. M. M. T. Perfil socioeconômico, nutricional e de ingestão alimentar de beneficiários do Programa Bolsa Família. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 78, p. 71–87, 2013.

CABRAL, V. L. R.; CARVALHO, L. DE; MISZPUTEN, S. J. Importância da albumina sérica na avaliação nutricional e de atividade inflamatória em pacientes com doença

de Crohn. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, 2001.

CANN, G. M.; GUIGNABERT, C.; YING, L.; et al. Developmental expression of LC3alpha and beta: absence of fibronectin or autophagy phenotype in LC3beta knockout mice. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 237, n. 1, p. 187–195, 2008.

CELEBI, B.; MANTOVANI, D.; PINEAULT, N. Effects of extracellular matrix proteins on the growth of haematopoietic progenitor cells. **Biomedical Materials (Bristol, England)**, v. 6, n. 5, p. 055011, 2011.

CHAKRABORTY, A.; KOLDOBSKIY, M. A.; BELLO, N. T.; et al. Inositol Pyrophosphates Inhibit Akt Signaling, Thereby Regulating Insulin Sensitivity and Weight Gain. **Cell**, v. 143, n. 6, p. 897–910, 2010.

CHANDRA, R. K. Lymphocyte subpopulations in human malnutrition: cytotoxic and suppressor cells. **Pediatrics**, v. 59, n. 3, p. 423–427, 1977.

CHANDRA, R. K. Nutrient regulation of immune functions. **Forum of nutrition**, v. 56, p. 147–148, 2003.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **The American journal of clinical nutrition**, v. 66, n. 2, p. 460S–463S, 1997.

CONDE, W. L.; MONTEIRO, C. A. Nutrition transition and double burden of undernutrition and excess of weight in Brazil. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 100, n. 6, p. 1617S–1622S, 2014.

COPP, J.; MANNING, G.; HUNTER, T. TORC-Specific Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Phospho-Ser2481 Is a Marker for Intact mTOR Signaling Complex 2. **Cancer Research**, v. 69, n. 5, p. 1821–1827, 2009.

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

CROZIER, S. J.; D'ALECY, L. G.; ERNST, S. A.; GINSBURG, L. E.; WILLIAMS, J. A. Molecular mechanisms of pancreatic dysfunction induced by protein malnutrition. **Gastroenterology**, v. 137, n. 3, p. 1093–1101, 1101.e1–3, 2009.

CUNHA, M. C. R.; LIMA, F. DA S.; VINOLO, M. A. R.; et al. Protein Malnutrition Induces Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Commitment to Adipogenic Differentiation Leading to Hematopoietic Failure. (X.-M. Shi, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58872, 2013.

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

DEXTER, T. M.; ALLEN, T. D.; LAJTHA, L. G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*. **Journal of cellular physiology**, v. 91, n. 3, p. 335–344, 1977.

DONG, L. Q. PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 2, p. E187–E196, 2005.

DONG, L. Q. PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 289, n. 2, p. E187–E196, 2005.

DOUMAS, B. T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromcresol green. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 31, n. 1, p. 87–96, 1971.

DOWNWARD, J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. **Current opinion in cell biology**, v. 10, n. 2, p. 262–267, 1998.

DU, F.; HIGGINBOTHAM, D. A.; WHITE, B. D. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 3, p. 514–521, 2000.

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

FANJUL-FERNÁNDEZ, M.; FOLGUERAS, A. R.; CABRERA, S.; LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinases: Evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 3–19, 2010.

FAO, IFAD and WFP. 2015. **The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress.** Rome, FAO.

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

FAURSCHOU, A.; GNIADECKI, R. TNF-alpha stimulates Akt by a distinct aPKC-dependent pathway in premalignant keratinocytes. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 992–997, 2008.

FFRENCH-CONSTANT, C. Alternative splicing of fibronectin--many different proteins but few different functions. **Experimental cell research**, v. 221, n. 2, p. 261–271, 1995.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A. R.; BLATT, S. L.; BORELLI, P. Impairment of the hematological response and interleukin-1β; production in protein-energy malnourished mice after endotoxemia with lipopolysaccharide. **Brazilian**

FOLGUERAS, A. R.; PENDÁS, A. M.; SÁNCHEZ, L. M.; LÓPEZ-OTÍN, C. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. **The International journal of developmental biology**, v. 48, n. 5-6, p. 411–424, 2004.

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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of Food Insecurity in the World The multiple dimensions of food security**. Rome: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013.

FOSTER, K. G.; FINGAR, D. C. Mammalian target of rapamycin (mTOR): conducting the cellular signaling symphony. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 19, p. 14071–14077, 2010.

FUNAKI, M.; KATAGIRI, H.; INUKAI, K.; KIKUCHI, M.; ASANO, T. Structure and function of phosphatidylinositol-3,4 kinase. **Cellular Signalling**, v. 12, n. 3, p. 135–142, 2000.

GADDUCCI, A.; COSIO, S.; FANUCCHI, A.; GENAZZANI, A. R. Malnutrition and

cachexia in ovarian cancer patients: pathophysiology and management. **Anticancer research**, v. 21, n. 4B, p. 2941–2947, 2001.

GARCIA, P. B. Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição proteica: análise da mobilidade celular e da hematopoese. São Paulo, 1992. 2v. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnica – Universidade de São Paulo.

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

GONZALEZ, E.; MCGRAW, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 8, n. 16, p. 2502–2508, 2009.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **The Journal of biological chemistry**, v. 177, n. 2, p. 751–766, 1949.

GRASSEL, S.; AHMED, N. Influence of cellular microenvironment and paracrine signals on chondrogenic differentiation. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 12, p. 4946–4956, 2007.

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

GROVER, Z.; EE, L. C. Protein energy malnutrition. **Pediatric clinics of North America**, v. 56, n. 5, p. 1055–1068, 2009.

HAVIERNIK, P.; DIAZ, M. T.; HAVIERNIKOVA, E.; et al. Hematopoiesis in mice is extremely resilient to wide variation in TIMP/MMP balance. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 41, n. 2, p. 179–187, 2008.

HAWKES, S. P.; LI, H.; TANIGUCHI, G. T. Zymography and reverse zymography for detecting MMPs, and TIMPs. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 151, p. 399–410, 2001.

HE, H.; DANG, Y.; DAI, F.; et al. Post-translational Modifications of Three Members of the Human MAP1LC3 Family and Detection of a Novel Type of Modification for MAP1LC3B. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 29278–29287, 2003.

HEISSIG, B.; OHKI, Y.; SATO, Y.; et al., A role for niches in hematopoietic cell development. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 10, n. 3, p. 247–253, 2005.

HIRAYAMA, C.; WATANABE, H.; NAKASHIMA, R.; et al. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 4, p. 827–835, 2008.

HONDA, M.; TAKEHANA, K.; SAKAI, A.; et al. Malnutrition impairs interferon signaling through mTOR and FoxO pathways in patients with chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 141, n. 1, p. 128–140, 140.e1–2, 2011.

HSIEH, H.-L.; WANG, H.-H.; WU, W.-B.; CHU, P.-J.; YANG, C.-M. Transforming growth factor-β1 induces matrix metalloproteinase-9 and cell migration in astrocytes: roles of ROS-dependent ERK- and JNK-NF-κB pathways. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 1, p. 88, 2010.

INGENBLEEK, Y.; YOUNG, V. R. Significance of transthyretin in protein metabolism. **Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC**, v. 40, n. 12, p. 1281–1291, 2002.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil.** Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

ITOH, Y. Membrane-type matrix metalloproteinases: Their functions and regulations. **Matrix Biology**, v. 44-46, p. 207–223, 2015.

JANOWSKA-WIECZOREK, A.; MARQUEZ, L. A.; MATSUZAKI, A.; et al., Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and -9) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1 and -2) in acute myelogenous leukaemia blasts: comparison with normal bone marrow cells. **British journal of haematology**, v. 105, n. 2, p. 402–411, 1999.

JIN, E.-J.; PARK, K. S.; BANG, O.-S.; KANG, S.-S. Akt signaling regulates actin organization via modulation of MMP-2 activity during chondrogenesis of chick wing limb bud mesenchymal cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 102, n. 1, p. 252–

261, 2007.

JIN, Y.-J.; PARK, I.; HONG, I.-K.; et al., Fibronectin and vitronectin induce AP-1-mediated matrix metalloproteinase-9 expression through integrin α(5)β(1)/α(v)β(3)-dependent Akt, ERK and JNK signaling pathways in human umbilical vein endothelial cells. **Cellular signalling**, v. 23, n. 1, p. 125–134, 2011.

KEUSCH, G. T. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 1, p. 336S–340S, 2003.

KLEIN, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. **Experientia**, v. 51, n. 9-10, p. 914–926, 1995.

KOUKOURAKIS, M. I.; KALAMIDA, D.; GIATROMANOLAKI, A.; et al. Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines. (S. M. Srinivasula, Org.) **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0137675, 2015.

KOURY, M. J, LICHTAMAN, M. A. Structure of the marrow and the hematopoietic microenviroment. In: Willims Hematoloy, McGraw-Hill. 8 ed, 2010.

KOZACI, L. D.; BALKAYA, M.; UNSAL, C.; et al. The expression of matrix metalloproteinases 8 and 9 by neutrophils of Wistar albino rats with severe qualitative and quantitative protein malnutrition. **International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition**, v. 75, n. 4, p. 257–265, 2005.

KRAWINKEL, Michael. Kwashiorkor is still not fully understood. **Bull World Health Organ**, Genebra, v. 81, n. 12, Dec. 2003.

LAPLANTE, M.; SABATINI, D. M. mTOR Signaling in Growth Control and Disease. **Cell**, v. 149, n. 2, p. 274–293, 2012.

LEE, C.-W.; LIN, C.-C.; LIN, W.-N.; et al. TNF- induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF- B/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells. **AJP: Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, n. 3, p. L799–L812, 2006.

LEE, C.-W.; LIN, C.-C.; LIN, W.-N.; et al. TNF-alpha induces MMP-9 expression via

activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 292, n. 3, p. L799–812, 2007.

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.; FÄSSLER, R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly *in vivo*. **Current opinion in cell biology**, v. 20, n. 5, p. 502–507, 2008.

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

LONG, J. C.; CACERES, J. F. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. **The Biochemical journal**, v. 417, n. 1, p. 15–27, 2009.

LORENZI, T. F. Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica. Medsi. 4ed, 2006.
LYRA, J. S.; MADI, K.; MAEDA, C. T.; SAVINO, W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. **The Journal of pathology**, v. 171, n. 3, p. 231–236, 1993.

MANN, S. S.; HAMMARBACK, J. A. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 15, p. 11492–11497, 1994.

MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261–1274, 2007.

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. **European journal of clinical nutrition**, v. 54 Suppl 1, p. S61–64, 2000.

MARQUEZ-CURTIS, L. A.; DOBROWSKY, A.; MONTAÑO, J.; et al., Matrix metalloproteinase and tissue inhibitors of metalloproteinase secretion by haematopoietic and stromal precursors and their production in normal and leukaemic long-term marrow cultures. **British journal of haematology**, v. 115, n. 3, p. 595–604, 2001.

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

MENG, X. N.; JIN, Y.; YU, Y.; et al. Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. **British Journal of Cancer**, v. 101, n. 2, p. 327–334, 2009.

MONTE, Cristina M. G. Desnutrição: um desafio secular à nutrição infantil. Jornal de Pediatria, v. 76, LOn. 3, p. 285- 297, Rio de Janeiro, 2000.

MONTEIRO, C. A.; BENICIO, M. H. D.; KONNO, S. C.; et al., Causas do declínio da desnutrição infantil no Brasil, 1996-2007. **Revista de Saúde Pública**, v. 43, n. 1, 2009.

MURATE, T.; YAMASHITA, K.; ISOGAI, C.; et al. The production of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in megakaryopoiesis: possible role of platelet- and megakaryocyte-derived TIMPs in bone marrow fibrosis. **British Journal of Haematology**, v. 99, n. 1, p. 181–189, 1997.

NAGASE, H.; VISSE, R.; MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 562–573, 2006.

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

NAKAJIMA, Karina. **Avaliação do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica**. 2010. Tese (Doutorado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-21012011-102527/>.

NEILL, T.; SCHAEFER, L.; IOZZO, R. V. Instructive roles of extracellular matrix on autophagy. **The American Journal of Pathology**, v. 184, n. 8, p. 2146–2153, 2014.

NERI, L. M.; BORGATTI, P.; CAPITANI, S.; MARTELLI, A. M. The nuclear phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway: a new second messenger system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1584, n. 2-3, p. 73–80, 2002.
NICHOLSON, K. M.; ANDERSON, N. G. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. **Cellular signalling**, v. 14, n. 5, p. 381–395, 2002.

NORMAN, K.; PICHARD, C.; LOCHS, H.; PIRLICH, M. Prognostic impact of disease-related malnutrition. **Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)**, v. 27, n. 1, p. 5–15, 2008.

NOVA, E.; SAMARTÍN, S.; GÓMEZ, S.; MORANDÉ, G.; MARCOS, A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. **European journal of clinical nutrition**, v. 56 Suppl 3, p. S34–37, 2002.

OGAWA, M.; KAWAMOTO, M.; YAMANAKA, N. Matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase in human bone marrow tissues-an immunohistochemical study. **Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi**, v. 67, n. 4, p. 235–241, 2000.

OH, I.-H.; KWON, K.-R. Concise review: multiple niches for hematopoietic stem cell regulations. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 28, n. 7, p. 1243–1249, 2010.

OH, J.; TAKAHASHI, R.; KONDO, S.; et al., The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v. 107, n. 6, p. 789–800, 2001.

OWEN, M. E. The marrow stromal cell system. In: **Marrow stromal cell culture**. JON, N; OWEN, M. E. Cambridge University Prees, 1998.

PAGE-MCCAW, A.; EWALD, A. J.; WERB, Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 3, p. 221–233, 2007.

PAN, H.-C.; JIANG, Q.; YU, Y.; et al. Quercetin promotes cell apoptosis and inhibits the expression of MMP-9 and fibronectin via the AKT and ERK signalling pathways in human glioma cells. **Neurochemistry International**, v. 80, p. 60–71, 2015.

PEREIRA, A. C; CARMO, E. D; SILVEIRA, V. A. S; AMADEI, S. U; ROSA, L. E. B. o Papel Das Mmp-2 E -9 No Desenvolvimento Do Carcinoma Epidermóide. **Rev. Bras. Can.** v.52 (3), p.257-262, 2006.

PIPERATA, B. A.; IVANOVA, S. A.; DA-GLORIA PEDRO; et al. Nutrition in transition: Dietary patterns of rural Amazonian women during a period of economic change. **American Journal of Human Biology**, v. 23, n. 4, p. 458–469, 2011.

QIN, W.; LU, W.; LI, H.; et al. Melatonin inhibits IL1β-induced MMP9 expression and activity in human umbilical vein endothelial cells by suppressing NF-κB activation. **The Journal of Endocrinology**, v. 214, n. 2, p. 145–153, 2012.

RA, H.-J.; PARKS, W. C. Control of matrix metalloproteinase catalytic activity. **Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology**, v. 26, n. 8, p. 587–596, 2007.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **The Journal of nutrition**, v. 127, n. 5 Suppl, p. 838S–841S, 1997.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., Jr. AIN-93 porfie diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

REIF, S.; LU, R. B.; TANO, M.; et al. Perinatal food restriction in rats reduces the content but not concentration of liver extracellular matrix proteins. **The Journal of nutrition**, v. 123, n. 5, p. 811–816, 1993.

RIES, C.; EGEA, V.; KAROW, M.; et al. MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. **Blood**, v. 109, n. 9, p. 4055–4063, 2007.

RITZENTHALER, J. D.; HAN, S.; ROMAN, J. Stimulation of lung carcinoma cell growth by fibronectin-integrin signalling. **Molecular bioSystems**, v. 4, n. 12, p. 1160–1169, 2008.

RODRIGUES-BARBOSA, M. C.; CARNEIRO, C. M.; DE OLIVEIRA, L. B.; et al. Protein malnutrition modifies medullary neuronal recruitment in response to intermittent stimulation of the baroreflex. **Brain research**, v. 1483, p. 20–30, 2012.

RODRÍGUEZ, D.; MORRISON, C. J.; OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1803, n. 1, p. 39–54, 2010.

RODRÍGUEZ, L.; CERVANTES, E.; ORTIZ, R. Malnutrition and gastrointestinal and

respiratory infections in children: a public health problem. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, n. 4, p. 1174–1205, 2011.

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

ROZARIO, T.; DESIMONE, D. W. The extracellular matrix in development and morphogenesis: A dynamic view. **Developmental Biology**, v. 341, n. 1, p. 126–140, 2010.

SAGAR, B. M. M.; RENTALA, S.; GOPAL, P. N. V.; SHARMA, S.; MUKHOPADHYAY, A. Fibronectin and laminin enhance engraftibility of cultured hematopoietic stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 4, p. 1000–1005, 2006.

SANCAK, Y.; THOREEN, C. C.; PETERSON, T. R.; et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. **Molecular Cell**, v. 25, n. 6, p. 903–915, 2007.

SAUNDERS, J.; SMITH, T. Malnutrition: causes and consequences. **Clinical medicine (London, England)**, v. 10, n. 6, p. 624–627, 2010.

SAVINO, W.; DARDENNE, M.; VELLOSO, L. A.; DAYSE SILVA-BARBOSA, S. The thymus is a common target in malnutrition and infection. **The British journal of nutrition**, v. 98 Suppl 1, p. S11–16, 2007.

SAWAYA, A. L. Desnutrição: conseqüências em longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estudos Avançados**, v. 20, n. 58, p. 147–158, 2006.

SAWAYA, A. L.; PELIANO, A. M. M.; SOLYMOS, G. M. B.; WANDERLEY, M. B.; DOMENE, S. M. A. (ORGS.). **Desnutrição, pobreza e sofrimento psíquico**. São Paulo, SP, Brasil: Edusp, 2011.

SAWAYA, A. L.; SOLYMOS, G. M. B.; FLORÊNCIO, T. M. DE M. T.; MARTINS, P. A. Os dois Brasis: quem são, onde estão e como vivem os pobres brasileiros. **Estudos Avançados**, v. 17, n. 48, 2003.

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

SCHWARZBAUER, J. E.; SECHLER, J. L. Fibronectin fibrillogenesis: a paradigm for extracellular matrix assembly. **Current opinion in cell biology**, v. 11, n. 5, p. 622–627, 1999.

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

SHIRVAIKAR, N.; MARQUEZ-CURTIS, L. A.; JANOWSKA-WIECZOREK, A. Hematopoietic Stem Cell Mobilization and Homing after Transplantation: The Role of MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP. **Biochemistry Research International**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

SILVA, Graziela Batista da. **Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular ósseo de camundongos submetidos à desnutrição proteica**. 2011. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-10092013-135900/>

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M.; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **BioTechniques**, v. 38, n. 1, p. 73–83, 2005.

SONG, G.; OUYANG, G.; BAO, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 9, n. 1, p. 59–71, 2005.

SOTTILE, J.; CHANDLER, J. Fibronectin matrix turnover occurs through a caveolin-1-dependent process. **Molecular biology of the cell**, v. 16, n. 2, p. 757–768, 2005.

SPOONCER, E.; ELIASON, J.; DEXTER, T.M. Longterm mouse bone marrow cultures. In: N.G. Testa and G. Molineux, Editors, **Haemopoiesis: a practical approach**. Oxford; New York: IRL Press at Oxford University Press, p.55-74, 1993.

STETLER-STEVENSON, W. G. Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. **Science signaling**, v. 1, n. 27, p. re6, 2008.

SUGIYAMA, A.; FUJITA, Y.; KOBAYASHI, T.; et al., Effect of protein malnutrition on the skin epidermis of hairless mice. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 73, n. 6, p. 831–835, 2011.

TANIDA, I.; UENO, T.; KOMINAMI, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, n. 12, p. 2503–2518, 2004.

TAVASSOLI, M.; MINGUELL, J. J. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, v. 196, n. 4, p. 367–373, 1991.

TOKSÖZ, D.; DEXTER, T. M.; LORD, B. I.; WRIGHT, E. G.; LAJTHA, L. G. The regulation of hemopoiesis in long-term bone marrow cultures. II. Stimulation and inhibition of stem cell proliferation. **Blood**, v. 55, n. 6, p. 931–936, 1980.

TOMERA, J. F.; MARTYN, J. Intraperitoneal endotoxin but not protein malnutrition shifts d-tubocurarine dose-response curves in mouse gastrocnemius muscle. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 250, n. 1, p. 216–220, 1989.

TOMKINS, A. M. Protein-energy malnutrition and risk of infection. **Proc. Nutr. Soc**, v.45, p. 289-304, 1986.

TOTH, M.; SOHAIL, A.; FRIDMAN, R. Assessment of Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) by Gelatin Zymography. In: M. Dwek; S. A. Brooks; U. Schumacher (Orgs.); **Metastasis Research Protocols**. v. 878, p.121–135, 2012. Totowa, NJ: Humana Press.

VADLAKONDA, L.; DASH, A.; PASUPULETI, M.; ANIL KUMAR, K.; REDDANNA, P. The Paradox of Akt-mTOR Interactions. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 165, 2013.

VAN DER LOO, J. C.; XIAO, X.; MCMILLIN, D.; et al., VLA-5 is expressed by mouse and human long-term repopulating hematopoietic cells and mediates adhesion to extracellular matrix protein fibronectin. **The Journal of clinical investigation**, v. 102, n. 5, p. 1051–1061, 1998.

VICTORIA, J. W.; HERNANDEZ, V. Q. Efecto del estado nutricional de los pacientes sometidos a cirurgia eletiva. **Ver. Gastroenterol**. V.55, p.207-10, 1990.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. **Circulation Research**, v. 92, n. 8, p. 827–839, 2003.

VITURI, C. DE L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; TRAMONTE, V. L. C. G.; BORELLI, P. Thrombospondin in protein malnutrition induced hypoplasia. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 6, p. 727–731, 2005.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 33, n. 8, p. 889–895, 2000.

WHITE, E. S.; BARALLE, F. E.; MURO, A. F. New insights into form and function of fibronectin splice variants. **The Journal of pathology**, v. 216, n. 1, p. 1–14, 2008.

WHITE, E. S.; SAGANA, R. L.; BOOTH, A. J.; et al., Control of fibroblast fibronectin expression and alternative splicing via the PI3K/Akt/mTOR pathway. **Experimental cell research**, v. 316, n. 16, p. 2644–2653, 2010.

WILLEMS, L.; TAMBURINI, J.; CHAPUIS, N.; et al. PI3K and mTOR signaling pathways in cancer: new data on targeted therapies. **Current Oncology Reports**, v. 14, n. 2, p. 129–138, 2012.

Williams CD. Kwashiorkor: a nutritional disease of children associated with a maize diet. Lancet. 229:1151-2. 1935

WILLIAMS, D. A.; RIOS, M.; STEPHENS, C.; PATEL, V. P. Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell-microenvironment interactions. **Nature**, v. 352, n. 6334, p. 438–441, 1991.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global nutrition policy review what does it take to scale up nutrition action?** Geneva: World Health Organization, 2013.
WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR Signaling in Growth and Metabolism. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471–484, 2006.

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

YIN, T.; LI, L. The stem cell niches in bone. **The Journal of clinical investigation**, v. 116, n. 5, p. 1195–1201, 2006.

YING, L.; LAU, A.; ALVIRA, C. M.; et al. LC3-mediated fibronectin mRNA translation induces fibrosarcoma growth by increasing connective tissue growth factor. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 9, p. 1441–1451, 2009.

YU, X. F.; HAN, Z. C. Matrix metalloproteinases in bone marrow: roles of gelatinases in physiological hematopoiesis and hematopoietic malignancies. **Histology and histopathology**, v. 21, n. 5, p. 519–531, 2006.

ZHANG, Y. E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. **Cell Research**, v. 19, n. 1, p. 128–139, 2009.

ZHOU, B.; BOUDREAU, N.; COULBER, C.; HAMMARBACK, J.; RABINOVITCH, M. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 is a fibronectin mRNA-binding protein linked to mRNA translation in lamb vascular smooth muscle cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 12, p. 3070–3082, 1997.

ZHOU, B.; RABINOVITCH, M. Microtubule involvement in translational regulation of fibronectin expression by light chain 3 of microtubule-associated protein 1 in vascular smooth muscle cells. **Circulation Research**, v. 83, n. 5, p. 481–489, 1998.

ZHOU, Y.; RUCKER, E. B.; ZHOU, B. P. Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer. **Acta Biochimica Et Biophysica Sinica**, v. 48, n. 1, p. 60–74, 2016.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 21–35, 2011.

ANEXO A- PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/125/2011

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Remodelamento da matriz extracelular da medula óssea em desnutrição protéica: possível relação da expressão da fibronectina e metaloproteinases pela via de AKT"** (Protocolo CEUA/FCF/348), de responsabilidade da **Profa. Dra. Primavera Borelli**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 05 de dezembro de 2011.

São Paulo, 07 de dezembro de 2011.

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

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

INFORMAÇÕES PARA OS MEMBROS DE BANCAS JULGADORAS

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

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

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

FICHA DO ALUNO

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9136 - 6629882/2 - Graziela Batista da Silva

Email:	grazielafcf@usp.br
Data de Nascimento:	18/10/1984
Cédula de Identidade:	RG - 42.472.181-8 - SP
Local de Nascimento:	Estado de São Paulo
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Bacharel em Biomedicina - Universidade Metodista de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2008
Mestrado:	Mestre em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2011

Curso:	Doutorado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	06/02/2012
Início da Contagem de Prazo:	06/02/2012
Data Limite para o Depósito:	11/02/2016
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia - 06/02/2012 até o presente. Email: borelli@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 06/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 11/04/2014
Data do Depósito do Trabalho:	
Título do Trabalho:	
Data Máxima para Aprovação da Banca:	
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Primeira Matrícula em 06/02/2012

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).
Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015
Impresso em: 04/02/2016 13:33:45

9136 - 6629882/2 - Graziela Batista da Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
EDM5791-5/8	Metodologia do Ensino Superior (Faculdade de Educação - Universidade de São Paulo)	14/03/2012	29/06/2012	120	8	91	A	N	Concluída
MCM5872-3/2	Oficina de Redação de Trabalho Científico (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	02/04/2012	06/05/2012	45	3	100	A	N	Concluída
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
BMB5818-1/3	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/08/2012	13/09/2012	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida
QBQ5747-6/4	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	17/09/2012	23/09/2012	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5712-2/1	Métodos Modernos de Proteômica na Pesquisa em Análises Clínicas e Toxicólogicas	05/03/2013	15/04/2013	60	4	100	A	N	Concluída
BMH5764-2/1	Metaloproteinases da Matriz em Biologia Celular e Tumoral (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	13/03/2013	22/05/2013	120	8	95	B	N	Concluída
FBC5755-1/3	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	01/04/2013	05/05/2013	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas	20/05/2013	30/06/2013	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5705-4/4	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/02/2014	09/02/2014	30	2	100	A	N	Concluída
BMB5818-2/1	Praticando Análise de Proteínas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	13/08/2014	10/09/2014	60	0	-	-	N	Pré-matrícula indeferida

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	36
Estágios:			
Total:	0	20	36

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:
A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 20/07/2015
Impresso em: 04/02/2016 13:33:45

CURRÍCULO LATTES

Graziela Batista Da Silva

Endereço para acessar este CV:http://lattes.cnpq.br/6358199013700468

Última atualização do currículo em 04/02/2016

Resumo informado pelo autor

Atualmente é doutoranda pelo programa de análises clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas -USP. Possui mestrado em ciências pela Universidade de São Paulo (2011) , graduação em Biomedicina pela Universidade Metodista de São Paulo (2007) e curso de Prática Profissionalizante em Hematologia Experimental na Faculdade de ciênicas Farmacêuticas - USP. Tem experiência na área de Histologia e Análises Clínicas, com ênfase em hematologia, microambiente hematopoético e matriz extracelular.
(Texto informado pelo autor)

Dados pessoais

Nome Graziela Batista Da Silva

Nome em citações bibliográficas SILVA, G. B.;GRAZIELA BATISTA SILVA;DA SILVA, GRAZIELA B.;SILVA, GRAZIELA B.;SILVA, G. B. D.;SILVA, GRAZIELA;DA SILVA, GRAZIELA BATISTA

Sexo Feminino

Cor ou Raça Branca

Filiação Valdir Batista Da Silva e Lucia Batista Lima Da Silva

Nascimento 18/10/1984 - São Bernardo do Campo/SP - Brasil

Carteira de Identidade 424721818 SSP - SP - 08/12/1999

CPF 338.602.598-65

Endereço residencial Rua José Trindade, 130
Parque Esmeralda - Sao Bernardo do Campo
09842-140, SP - Brasil
Telefone: 11 43585692

Endereço profissional Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Av. Profº Lineu Prestes, 580 Bloco 17
Butantã - Sao Paulo
05508-900, SP - Brasil

Endereço eletrônico E-mail para contato : zizibati@yahoo.com.br
E-mail alternativo grazielafcf@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2012 Doutorado em Programa de Análises Clínicas (conceito 7 Capes).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP, FCF, Brasil
Título: REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR DA MEDULA ÓSSEA EM DESNUTRIÇÃO PROTÉICA: POSSÍVEL RELAÇÃO DA EXPRESSÃO DE FIBRONECTINA E METALOPROTEINASES PELA VIA DE AKT

Orientador: Primavera Borelli
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: Desnutrição, Fibronectina, Ciclo celular, matriz extracelular, Metaloproteinases, Hemopoese
Áreas do conhecimento : Análises Clínicas

2009 - 2011 Mestrado em Ciências.
Faculdade de Ciênicas Farmacêuticas FCF/USP, FCF, Brasil
Título: Pesquisa de isoformas de fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição protéica, Ano de obtenção: 2011

Orientador: Primavera Borelli
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Palavras-chave: Desnutrição, Fibronectina, Hemopoese
Áreas do conhecimento : Farmácia,Análises Clínicas,Hematologia Clínica

2003 - 2007 Graduação em Biomedicina.
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil
Título: Influência do Hipotireoidismo Induzido Por Propiltiouracil, Tireoidectomia e Reposição Hormonal (T4) Na Fetilidade Das Ratas Adultas
Orientador: Pedro Manuel Olmedo orellana, Nicolas Douglas Gómez

2008 - 2008 Aperfeiçoamento em Aperfeiçoamento em Hematologia Clínica.
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Prática Profissionalizante em Hematologia Experimental Avaliação do Estroma Medular
Orientador: Primavera Borelli

Formação complementar

2015 - 2015 Curso de curta duração em Imunohistoquímica- Uma Valiosa Ferramenta de Pesqu. (Carga horária: 8h).
Instituto de Ciências Biomédicas-USP, ICB-USP, Brasil

2015 - 2015 Curso de curta duração em Genômica Nutricional. (Carga horária: 3h).
Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, SBAN, Sao Paulo, Brasil

2015 - 2015 Curso de curta duração em Célula-tronco: Do início ao fim e na esperança. (Carga horária: 4h).
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil

2015 - 2015 Curso de curta duração em A biologia dos microRNA: função e investigação. (Carga horária: 2h).
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil

2013 - 2013 Treinamento Biossegurança -NB1. . (Carga horária: 2h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP, FCF, Brasil

2012 - 2012 Treinamento. .
Biotério de Produção e Experimentação FCF/IQ USP, FCF/IQ USP, Brasil

2012 - 2012 Curso de curta duração em 6° Curso de Citometria de Fluxo do IAL. (Carga horária: 30h).
Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil

2012 - 2012 Extensão universitária em Biologia Molecular. (Carga horária: 20h).
Instituto de Ciências Biomédicas-USP, ICB-USP, Brasil

2011 - 2011 Extensão universitária em Inglês Instrumental- Nível I. (Carga horária: 60h).
Faculdade de Filosofia, Letras e Ciências Humanas- USP, FFLCH, Brasil

2011 - 2011 Aplicações e Fundamentos da PCR Quantitativa RT. . (Carga horária: 24h).
Life Tecnologies , LIFE TEC, Sao Paulo, Brasil
Palavras-chave: Biologia Molecular

2011 - 2011 Flow Cytometry- Let's hear it. . (Carga horária: 8h).
Life Technologies, LT, Brasil

2011 - 2011 Curso de curta duração em Imunohistoquimica e Patologia Molecular. (Carga horária: 9h).
Faculdade de Medicina Veterináira e zootecnia -USP, FMVZ, Brasil

2010 - 2010 Curso de curta duração em Proliferação, diferenciação e morte celular. (Carga horária: 180h).
Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Sao Paulo, Brasil

2010 - 2010 Proteomics Methods and Approaches for Protein Iden. . (Carga horária: 12h).
Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP, FCF, Brasil

2007 - 2007 Workshop Identificação Bacteriana (Teorico Prátic). .
Laboratorio de Análises Clínicas da Universidade Metodista de São Paulo, LABMESP, Brasil

2007 - 2007 Estágio Curricular - Análises Clínicas. . (Carga horária: 920h).
Laboratorio de Análises Clínicas da Universidade Metodista de São Paulo, LABMESP, Brasil

2007 - 2007 Preparação de Reagentes. .
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

2007 - 2007 Programa de Treinamento - Equipamento de Proteção. . (Carga horária: 2h).
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

2007 - 2007 Treinamento - Brigada de Incêndio e Biossegurança. . (Carga horária: 4h).
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

2007 - 2007 Treinamento - Esterelização. .
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

2007 - 2007 Treinamento 5S. .
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

2007 - 2007 Treinamento - Diluição. .
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

2007 - 2007 Treinamento - RDC 302. .
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

2006 - 2006 Campanha de Prevenção Diabetes, Hipertensão, Coles. .
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

2005 - 2005 Campanha de Prevenção de Diabetes Hipertensão Cole. .
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

2004 - 2004 Campanha de Prevenção Diabetes Hipertensão Coleste. .
Universidade Metodista de São Paulo, UMESP, Sao Bernardo Do Campo, Brasil

Atuação profissional

1. Faculdade de Ciências Farmacêuticas FCF/USP - FCF

Vínculo institucional

2014 - 2015 Vínculo: Representante discente , Enquadramento funcional: Estudante, Regime: Parcial
Outras informações:
Membro suplente do representante discente da pós-graduação, na CONGREGAÇÃO da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP

2012 - Atual Vínculo: Doutorado , Enquadramento funcional: Estudante, Regime: Dedicação exclusiva

2012 - 2013 Vínculo: Representante discente , Enquadramento funcional: Estudante, Regime: Parcial
Outras informações:
Membro suplente do representante discente da comissão de ética no uso de animais -CEUA da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP.

2009 - 2011 Vínculo: Mestrado , Enquadramento funcional: Estudante, Regime: Dedicação exclusiva
Outras informações:
Mestrado, no programa Farmácia (Análises Clínicas), área de concentração Análises Clínicas, sob a orientação do Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia.

Atividades

2010 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Linhas de pesquisa:
Avaliação da participação dos processos apoptóticos , necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos a desnutrição protéica

02/2009 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Linhas de pesquisa:
Avaliação da presença de isoformas de fibronectina na medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica.

2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Estágiaria , Enquadramento funcional: Estágiaria, Regime: Dedicação exclusiva

Outras informações:
Prática Profissionalizante em Hematologia Experimental: "Avaliação do Estroma Medular". No laboratório de hematologia clínica do departamento de análises clínicas e toxicológicas, sob a supervisão da Profª. Drª. Primavera Borelli.

Atividades

06/2008 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Linhas de pesquisa:
Avaliação do ciclo celular de células tronco da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica

06/2008 - Atual Pesquisa e Desenvolvimento, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Linhas de pesquisa:
Avaliação da hemopoese e da resposta imune inata mediada por macrófagos, em camundongos, durante processo de recuperação nutricional após a desnutrição protéica

3. Universidade Metodista de São Paulo - UMESP

Vínculo institucional

2008 - 2008 Vínculo: Voluntária , Enquadramento funcional: Voluntária, Regime: Parcial
Outras informações:
Atividades Voluntárias na Disciplina de Histologia Básica

2005 - 2005 Vínculo: Estágiario , Enquadramento funcional: Estágiario , Carga horária: 5, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio extracurricular (monitoria) na disciplina de Histologia

4. Núcleo de Pesquisas Biológicas - Universidade Medotista de São Paulo - NPB - UMESP

Vínculo institucional

2006 - 2008 Vínculo: Estágiaria , Enquadramento funcional: Estágiaria , Carga horária: 4, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio extracurricular - Laboratório de Histologia : Tecnicas de Histologia e fotometria

2005 - 2006 Vínculo: Estágiaria , Enquadramento funcional: Estágiaria, Regime: Parcial
Outras informações:
Estágio extracurricular - Laboratório de Histologia, Laboratório Multidisciplinar.

Atividades

02/2007 - 12/2007 Pesquisa e Desenvolvimento, Núcleo de Pesquisas Biológicas

Linhas de pesquisa:
Influência do Hipotireoidismo Induzido Por Propiltiouracil, Tireoidectomia e Reposição Hormonal (T4) Na Fetilidade Das Ratas Adultas

Linhas de pesquisa

1. Influência do Hipotireoidismo Induzido Por Propiltiouracil, Tireoidectomia e Reposição Hormonal (T4) Na Fetilidade Das Ratas Adultas

   Objetivos:Sabendo que os hormônios da tireoide participam no crescimento, desenvolvimento e função de diversos órgãos dentre eles o ovario, avaliamos o efeito do hipotireoidismo induzido por propiltiouracil e tireoidectomia na fertilidade de ratas adultas e se a reposição hormonal T4 reverte as alterações observadas na fertilidade.
   Palavras-chave: Hipotireoidismo, Propiltiouracil, fertilidade
   Áreas do conhecimento : Fisiologia

2. Avaliação da hemopoese e da resposta imune inata mediada por macrófagos, em camundongos, durante processo de recuperação nutricional após a desnutrição protéica

   Objetivos:Sabendo-se que animais desnutridos apresentam hipoplasia severa de órgãos linfo-hemopoéticos, comprometimento da função imune e alterações hormonais, propõe-se, neste projeto, a avaliação de aspectos histológicos e funcionais da hemopoese e da resposta imune, e parâmetros bioquímicos indicativos do estado nutricional de animais desnutridos submetidos à recuperação nutricional..
   Palavras-chave: Desnutrição, Hemopoese, recuperação nutricional

3. Avaliação do ciclo celular de células tronco da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica

   Objetivos:A anemia, leucopenia e atrofia medular encontrada nos camundongos submetidos à desnutrição protéica sugerem queda na capacidade proliferativa dos progenitores hematopoiéticos, uma vez que a redução do compartimento medular não foi decorrente do aumento do influxo de células para o sangue periférico e nem devido a processos apoptóticos. Assim, nosso objetivo no presente projeto é o de avaliar o ciclo celular das células tronco hematopoiéticas da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica..
   Palavras-chave: Ciclo celular, Hemopoese, Desnutrição

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

   Objetivos:Considerando os resultados anteriores de nosso grupo evidenciando que a desnutrição protéica compromete a hemopoese induzindo hipoplasia medular com pancitopenia periférica, alterações na matriz extracelular da medula óssea, permanência de células tronco/progenitoras na fase G0/G1 do ciclo celular, aumento nas concentrações plasmáticas de glicocorticóide e redução de insulina e IGF1, nos propomos, neste projeto a avaliar a participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia supra mencionada.

5. Avaliação da presença de isoformas de fibronectina na medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica.

   Objetivos:Sabendo que animais submetidos a desnutrição proteíca apresentam evidências histológicas de alterção na propoorção de proteína, especialmente a fibronectina, havendo um aumento da deposição da mesma na matriz extracelular. Tal alteração ocasiona hipoplasia e modificação do ciclo celular nos animais desnutridos. Assim no presente projeto será avaliado a estrutura da molécula de fibronectina na medula óssea de animais desnutridos.
   Palavras-chave: Desnutrição, Fibronectina, Hemopoese

Projetos

Projetos de pesquisa

2010 - 2012 Redução da capacidade proliferativa de células tronco/progenitoras homopoeticas em modelo de desnutrição protéica: papel do microambiente medular na indução do ciclo celular

Descrição: Desenvolvemos um modelo de hipoplasia medular, em murinos, induzida por restrição protéica. Demonstramos neste modelo alterações histológicas evidentes na matriz extracelular da medula óssea, encontramos alterações na proporção de proteínas, especialmente de fibronectina, trombospondina e laminina, situação que poderia estar contribuindo para a hipoplasia observada. A caracterização imuno-histoquímica e ultra-estrutural de tais alterações evidenciou um aumento na deposição de fibronectina na medula óssea esternal de animais desnutrido em sítios endosteais/paratrabeculares (região de fixação de células troco hematopoéticas) e aumento e deposição de laminina em regiões perisinusais. Estas alterações podem modificar a co-localização de uma série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de crescimento e diferenciação de células hemopoéticas. Na medula óssea, as células trocb/progenitoras estão em contato estrito com a fibronectina, e isto ocorre através de integrinâs expressas por essas células, VLA-4 e VLA5 e esta interação fibronectina/integrina está relacionada com o ciclo celular. Resultados preliminares do nosso laboratório já demonstram que os animais desnutridos apresentam, significativamente, menor expressão de receptores para a fibronectina VLA-4 e VLA5, na populaçãode células CD 34+. Também foi verificado um aumento da população de células tronco na fase GO e G1 quando comparados com os animais controles. Em virtude dos dados apresentados propomos a avaliar a proliferação de células tronco/progenitoras por incorporação, "in vivo", de BrdU; determinar a localização das células tronco hemopoéticas no nicho medular através de microscopia confocal; caracterizar histológica e ultra-estruturalmente a matriz extracelular da medula óssea dos animais por análise imunohistoquímica, microscopia de transmissão e microscopia confocal;. quantificar fibronectina por western blotting e pesquisar suas isoformas por PCR e imunohis
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (2);
Integrantes: Graziela Batista Da Silva; Karina Nakajima; Amanda Rabello Crisma; Ricardo Ambrosio Fock; Primavera Borelli (Responsável); Orlando Garcia Ribeiro; José Guilherme Xavier; Victor Aranna Chaves
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2009 - Atual Avaliação da presença de isoformas de fibronectina na medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica.

Descrição: Sabendo que animais submetidos a desnutrição proteíca apresentam evidências histológicas de alterção na propoorção de proteína, especialmente a fibronectina, havendo um aumento da deposição da mesma na matriz extracelular. Tal alteração ocasiona hipoplasia e modificação do ciclo celular nos animais desnutridos. Assim no presente projeto será avaliado a estrutura da molécula de fibronectina na medula óssea de animais desnutridos.
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Graziela Batista Da Silva (Responsável); ;

2009 - Atual COMPROMETIMENTO DO CICLO CELULAR DE CÉLULAS TRONCO/PROGENITORAS NA DESNUTRIÇÃO PROTÉICA: O DESAFIO DA RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL

Descrição: Atualmente, a desnutrição é considerada um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Em sua grande maioria, os indivíduos desnutridos encontram-se nos países em desenvolvimento; na Ásia e Pacífico, estima-se que 642 milhões de pessoas apresentem-se cronicamente desnutridos; na África Sub-Saariana, 265 milhões; na África do norte 42 milhões e na América Latina e Caribe, 53 milhões. Já nos países desenvolvidos, a desnutrição afeta, aproximadamente, 15 milhões de pessoas. Mundialmente, um sexto da população é considera desnutrida, ou seja, cerca de 1 bilhão de pessoas. A desnutrição acomete principalmente crianças, idosos e indivíduos hospitalizados sob alimentação parenteral ou que apresentam distúrbios alimentares. No Brasil, estima-se que mais de 13 milhões de pessoas apresentam algum tipo de desnutrição, das quais aproximadamente 60% encontram-se em áreas urbanas. Segundo a Organização Mundial da saúde, a fome é a maior ameaça à saúde pública mundial, sendo que em 2006, foram registrados 58% de mortalidade devido à desnutrição ao redor o mundo. A desnutrição protéica e protéico-energética (DPE) são as formas mais freqüentes de desnutrição. A DPE apresenta amplo espectro de sinais e sintomas que decorrem, não só da(s) causa(s) que induzem a desnutrição, mas também dos diferentes graus de carência de proteínas e, ou de calorias. A DPE acomete 50 a 90% dos pacientes hospitalizados de países desenvolvidos e subdesenvolvidos, respectivamente, alterando a resposta terapêutica, dificultando tratamentos clínicos e aumentando a morbidade e a mortalidade. Cerca de 60% das infecções que evoluem para sepse são adquiridas no ambiente hospitalar, envolvendo geralmente bactérias Gram negativas e incidindo especialmente em indivíduos com nutrição inadequada..
Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa
Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1); Doutorado (2);
Integrantes: Graziela Batista Da Silva; Karina Nakajima; Amanda Rabello Crisma; Ricardo Ambrosio Fock; Primavera Borelli (Responsável); Marcelo Macedo Rogero; José Guilherme Xavier
Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP

2006 - 2007 Influência do Hipotireoidismo Induzido Por Propiltiouracil, Tireoidectomia e Reposição Hormonal (T4) Na Fetilidade Das Ratas Adultas

Descrição: Sabendo que os hormônios da tireoide participam no crescimento, desenvolvimento e função de diversos órgãos dentre eles o ovario, avaliamos o efeito do hipotireoidismo induzido por propiltiouracil e tireoidectomia na fertilidade de ratas adultas e se a reposição hormonal T4 reverte as alterações observadas na fertilidade.
Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa
Integrantes: Graziela Batista Da Silva (Responsável); ;

Áreas de atuação

1. Análises Clínicas
2. Hematologia Clínica
3. Histologia

Idiomas

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

Prêmios e títulos

2014 Menção honrosa-Doutorado-Ciências Biológicas, XXIII Semana Cientifica Benjamin Eurico Malucelli, FMVZ-USP

2014 Prêmio de melhor apresentação em forma de pôster categoria de Doutorado., XIX SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA-FCF-USP

2014 Prêmio de melhor apresentação oral na categoria de Doutorado., XIX SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA-FCF-USP

2014 1° lugar no prêmio Jovem Cientista Prof.Dr. Mariano-Doutorado-Ciências Biológicas, XXIII Semana Cientifica Benjamin Eurico Malucelli, FMVZ-USP

2011 XV Prêmio Jovem Cientista Prof. Dr. Mario Mariano 2º Lugar na Categoria Mestrado- Ciências Biomédicas, XX Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli - Dep. de Patologia da FMVZ- USP

2010 Mensão Honrosa, XXV Reunião da Federação de Sociedades de Biologia Experimental -FeSBE

Producão

Artigos completos publicados em periódicos

1. NAKAJIMA, KARINA, CRISMA, AMANDA R., **SILVA, GRAZIELA B.**, ROGERO, MARCELO M., FOCK, RICARDO A., BORELLI, PRIMAVERA
Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.). JCR, v.30, p.82 - 89, 2014.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page:
[doi:10.1016/j.nut.2013.05.029]

2. KATZ, I. S. S., ALBUQUERQUE, L. L., SUPPA, A. P., DE SIQUEIRA, D. M., ROSSATO, C., **SILVA, G. B. D.**, JENSEN, J. R., STAROBINAS, N., CABRERA, W. H. K., DE FRANCO, M., BORELLI, P., IBANEZ, O. M., RIBEIRO, O. G.
7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-Induced Myelotoxicity Differs in Mice Selected for High or Low Acute Inflammatory Response: Relationship With Aryl Hydrocarbon Receptor Polymorphism. International Journal of Toxicology. JCR, v.33, p.130 - 142, 2014.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page:
[http://ijt.sagepub.com/content/early/2014/02/20/1091581814522837.full.pdf]
[doi:10.1177/1091581814522837]

3. NAKAHARA, SHEILA B. R., SANCHES, DANIEL S., CANICEIRO, BEATRIZ D., WYSOCHI, HARRY L., **DA SILVA, GRAZIELA B.**, LATORRE, ANDREIA O.
Effects of selenium on *Pteridium aquilinum* and urethane-induced lung carcinogenesis. Immunopharmacology and Immunotoxicology. JCR, v.35, p.1 - 10, 2013.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page:
[http://10.3109/08923973.2013.830125]

4. KATZ, IANA SULY SANTOS, ALBUQUERQUE, LAYRA LUCY, SUPPA, ALESSANDRA PAES, **DA SILVA, GRAZIELA BATISTA**, JENSEN, JOSÉ RICARDO, BORREGO, ANDREA, MASSA, SOLANGE, STAROBINAS, NANCY, CABRERA, WAFA HANNA KOURY, DE FRANCO, MARCELO, BORELLI, PRIMAVERA, IBAÑEZ, OLGA MARTINEZ, RIBEIRO, ORLANDO GARCIA
7,12-Dimethylbenz(a)anthracene-induced genotoxicity on bone marrow cells from mice phenotypically selected for low acute inflammatory response. DNA Repair (Print). JCR, v.37, p.43 - 52, 2016.
Referências adicionais : Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page:
[doi:10.1016/j.dnarep.2015.11.006]

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **SILVA, G. B.**, HASTREITER, A., MASSARO, R. R., TSUJITA, MARISTELA, MARIA-ENGLER, S. S., BORELLI, PRIMAVERA
PROTEIN MALNUTRITION MODIFIES FIBRONECTIN REMODELING CAPABILITY IN LONG-TERM BONE MARROW CULTURE In: 13º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2015, São Paulo.
NUTRIRE- JOURNAL OF THE BRAZILIAN SOCIETY FOR FOOD AND NUTRITION. São Paulo: Nutrire, 2015. v.40. p.325 - 325
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital

2. **SILVA, G. B.**, TSUJITA, M., SANTOS, E. W., Beltran, J. O. S, BORELLI, PRIMAVERA
Role of AKT/mTOR pathway in fibronectin expression mediated by protein malnutrition In: 43rd Annual Scientific Meeting of the ISEH – International Society for Experimental Hematology, 2014, Montreal.
43rd Annual Scientific Meeting of the ISEH – International Society for Experimental Hematology. ELSEVIER, 2014. v.42. p.S60 - S60
Referências adicionais : Canadá/Inglês. Meio de divulgação: Vários. Home page:
[http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301472X14004676]
10.1016/j.exphem.2014.07.226

3. **SILVA, G. B.**, ALBUQUERQUE, L. L., KATZ, I. S. S., Beltran, J. O. S, Schimieguel, D. M, Ribeiro, O. G, BORELLI, P.
ANÁLISE PROTEÔMICA DO ESTROMA MEDULAR DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA In: XX SEMANA CIENTÍFICA "BENJAMIN EURICO MALUCELLI", 2011, São Paulo.
ANAIS DA XX SEMANA CIENTÍFICA "BENJAMIN EURICO MALUCELLI". , 2011.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page:
[http://www.semanadovpt.com/waUpload/anais-da-xx-sem0011112201209 4311.pdf]

4. **SILVA, G. B.**, ALBUQUERQUE, L. L., Katz, I. S. S, Beltran, J. O. S, Schimieguel, D. M, Ribeiro, O. G, BORELLI, P.
Análise proteômica do estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia-Supl. 2. , 2011. v.33. p.33 - 293
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page:
[http://www.rbhh.org/detalhe_artigo.asp?id=475&idioma=]

5. Beltran, J. O. S, **SILVA, G. B.**, Nakajima, K., Crisma, A. R, BORELLI, P.
Avaliação da participação dos processos de apoptose,necrose e autofagia na hipoplasia medularde camundongos submetidos à desnutrição proteíca In: Congresso Brasileiro de Hmeatologia e Hemoterapia - Hemo 2011, 2011, São Paulo.
Revista brasileira de hematologia e hemoterapia - Supl 2. , 2011. v.33. p.243 - 243
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page:
[http://www.rbhh.org/imageBank/PDF/v33s2a03.pdf]

6. Nakajima, K., Crisma, A. R, **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, BORELLI, P.
"Comprometimento do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas na desnutrição proteica: o desafio da recuperação nutricional" In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO 2011, 2011, São Paulo.
Revista brasileira de hematologia e hemoterapia-Supl. 2. , 2011. v.33. p.33 - 293
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page:
[http://www.rbhh.org/detalhe_artigo.asp?id=475&idioma=]

7. Crisma, A. R, Nakajima, K., **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, BORELLI, P.
Efeito da recuperação nutricional na reversão das alterações na via de NFKB em macrófagosperitoniais de camundongos submetidos à desnutrição proteica In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO, 2011, São Paulo.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia-Supl. 2. , 2011. v.33. p.33 - 293
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page:
[http://www.rbhh.org/detalhe_artigo.asp?id=475&idioma=]

8. Beltran, J. O. S, Crisma, A. R, **SILVA, G. B.**, Nakajima, K., BORELLI, P.
Evaluation of involvement of apoptotic processes, necrotic and autophagic marrow hypoplasia in mice submitted to protein malnutrition. In: Simpósio anual de pesquisa em ciências farmacêuticas e XLVI Semana Universitária paulista de farmácia e bioquímica, 2011, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: , 2011. v.47. p.85 - 85
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários

9. Crisma, A. R, AMARAL, C. L., MARTINS, A. R., MASI, L., **SILVA, G. B.**, CURI, R
Impacto da obesidade na hemopoese e na produção de mediadores pró-inflamatórios em camundongosalimentados com dieta hiperlipídica:Efeito da suplementação com óleo de peixe In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia-Supl. 2. , 2011. v.33. p.33 - 293
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page:
[http://www.rbhh.org/detalhe_artigo.asp?id=475&idioma=]

10. **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, Katz, I. S. S, Nakajima, K., Crisma, A. R, Ribeiro, O. G, BORELLI, P.
Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia-Supl. 2. , 2011. v.33. p.33 - 293
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page:
[http://www.rbhh.org/detalhe_artigo.asp?id=475&idioma=]

11. **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, Katz, I. S. S, ALBUQUERQUE, L. L., Ribeiro, O. G, BORELLI, P.

Proteomics analysis of the bone marrow extracellular matrix of mice submitted to protein malnutrition In: Simpósio anual de pesquisa em ciências farmacêuticas e XLVI Semana universitária paulista de farmácia e bioquímica, 2011, São Paulo.
Brazilian Journal of pharmaceutical sciences. São Paulo: , 2011. v.47. p.15 - 15
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

12. Nakajima, K., Crisma, A. R, **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, BORELLI, P.
Redução da capacidade proliferativa de células célulastronco/progenitoras hemopoéticas na desnutriçãoproteica: papel do microambiente medular nocomprometimento do ciclo celular In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - Hemo, 2011, São Paulo.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia-Supl. 2. , 2011. v.33. p.33 - 293
Referências adicionais : Brasil/Português. . Home page: [http://www.rbhh.org/detalhe_artigo.asp?id=475&idioma=]

13. **SILVA, G. B.**, SILVA, M. K., Nakajima, K., Crisma, A. R, Beltran, J. O. S, Fock, R. A, BORELLI, P.
Avaliação da fibronectina no estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2010, Brasília.
Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia (Impresso). , 2010. v.32. p.89 - 89
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

14. **SILVA, G. B.**, SILVA, M. K., Nakajima, K., Crisma, A. R, Beltran, J. O. S, Fock, R. A, BORELLI, P.
Evaluation of fibronectin in bone marrow stroma of mice subjected to protein malnutrition In: XV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2010, São Paulo.
Brasilian journal of Pharmaceutical Sciences. , 2010. v.26. p.36 - 36
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

15. Nakajima, K., Crisma, A. R, **SILVA, G. B.**, BORELLI, P.
Impairment of the cell cycle of hematopoietic stem/progenitor cells in protein malnutrition: the challenge of nutritional recovery In: XV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2010, São Paulo.
Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. , 2010. v.26. p.87 - 87
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

16. **SILVA, G. B.**, Gomes; N. A. D, ORELLANA, P. M. O., STIVALETTI; V. L. G
Conseqüências do hipotireoidismo e da reposição de T4 na fertilidade de ratas e da sua prole In: X Congresso de Iniciação e Produção Científica, no IX Seminário de Extensão da Metodista e no IV Seminário PIBIC/UMESP de Pesquisa da Universidade metodista de São Paulo, 2007, São Bernardo do Campo.
Anais do X Congresso de Iniciação e Produção Científica, IX Seminário de Extensão da Metodista e IV Seminário PIBIC/UMESP de Pesquisa / organização de Isildinha Martins. Documento eletrônico. São Bernardo do Campo : Universidade Metodista de São Paulo. , 2007.
Palavras-chave: Hipotireoidismo, Propiltiouracil, fertilidade
Áreas do conhecimento : Fisiologia
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, Katz, I. S. S, NAKAJIMA, KARINA, Crisma, A. R, Ribeiro, O. G, BORELLI, P.
PESQUISA DE ISOFORMAS DA FIBRONECTINA EM CULTURAS DE LONGA DURAÇÃO DE ESTROMA MEDULAR DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTÉICA In: XX SEMANA CIENTÍFICA "BENJAMIN EURICO MALUCELLI", 2011, São Paulo.
ANAIS DA XX SEMANA CIENTÍFICA "BENJAMIN EURICO MALUCELLI". , 2011.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: [http://www.semanadovpt.com/waUpload/anais-da-xx-sem00111122012094311.pdf]

Artigos em revistas (Magazine)

1. TEIXEIRA;, P. D., SALES, A. L. C., LOBO, A. R., CARLI;, E., **SILVA, G. B.**, BORELLI, P., TAKAYAMA, ;. L., PEREIRA, R. M. R., COLLI, C.
- DIETARY MAGNESIUM RESTRICTION: CHANGES IN WHOLE-BODY COMPOSITION AND TISSUE MAGNESIUM DISTRIBUTION IN RATS. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.52 - 52, 2013.
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://www.revistanutrire.org.br/files/v38nSuplemento/v38nSuplemento.pdf

2. Beltran, J. O. S, **SILVA, G. B.**, OLIVEIRA, D. C., SANTOS, E. W., MASSARO, R. R., ENGLER, S. S. M., OLIVEIRA, T. C., Chaves, V. A, BORELLI, P.
Desnutrição proteica ativa a sinalização da via autofágica regulada por mTOR na medula óssea. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.60 - 60, 2013.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://www.revistanutrire.org.br/files/v38nSuplemento/v38nSuplemento.pdf

3. TSUJITA, M., **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, SALGADO, P. B., ALLEGRINI, S. J., Chaves, V. A, Fock, R. A, BORELLI, P.
Efeitos da desnutrição proteica na densidade óssea e aspectos ósseos microanatômicos. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.343 - 343, 2013.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://www.revistanutrire.org.br/files/v38nSuplemento/v38nSuplemento.pdf

4. SANTOS, E. W., OLIVEIRA, D. C., Beltran, J. O. S, HASTREITER, A., **SILVA, G. B.**, TSUJITA, M., Fock, R. A, BORELLI, P.
Efeitos de dietas hipoproteica ou hiperlipídica nos parâmetros hematológicos e imunológicos em modelo murino. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.342 - 342, 2013.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://www.revistanutrire.org.br/files/v38nSuplemento/v38nSuplemento.pdf

5. Beltran, J. O. S, **SILVA, G. B.**, OLIVEIRA, D. C., SANTOS, E. W., BORELLI, P.
Effect of Protein Malnutrition and the Mechanisms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy in Marrow Hypoplasia. J Nutrigenet Nutrigenomics. São Paulo-Brasil, p.171 - 302, 2012.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://content.karger.com/ProduktеDB/produkte.asp?Aktion=ShowPDF&ArtikelNr=343955&Ausgabe=257529&ProduktNr=232009&filename=343955.pdf DOI:10.1159/000343955

6. **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, Katz, I. S. S, ALBUQUERQUE, L. L., Ribeiro, O. G, BORELLI, P.
Proteomics Analysis of the Bone Marrow Extracellular Matrix of Mice Submitted to Protein Malnutrition. J Nutrigenet Nutrigenomics. São Paulo-Brasil, p.171 - 302, 2012.
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://content.karger.com/ProduktеDB/produkte.asp?Aktion=ShowPDF&ArtikelNr=343955&Ausgabe=257529&ProduktNr=232009&filename=343955.pdf DOI: 10.1159/000343955

Apresentação de trabalho e palestra

1. SANTOS, E. W., DIAS, C., OLIVEIRA, D. C., HASTREITER, A., **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, PAREDES-GAMERO, E. J., FOCK, RICARDO A.
Ex vivo Study of Hematopoiesis in Protein Malnutrition: characterization of bone marrow stromal cells in mice, 2015. (Outra,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP; Cidade: São Paulo; Evento: XXIV Semana Científica Benjamin Eurico Mallucelli; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

2. TSUJITA, M., BURI, M. V., OLIVEIRA, J. L., **SILVA, G. B.**, PAREDES-GAMERO, E. J., FOCK, RICARDO A., BORELLI, PRIMAVERA
'Protein Malnutrition: Effects On Hematopoietic Stem Cell Frequency Cell Cycle and Chemokine Receptors Expression in the Endosteal Niche Regulation', 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: Hemo-Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e terapia celular; Inst.promotora/financiadora: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia celular

3. **SILVA, G. B.**, HASTREITER, A., MASSARO, R. R., TSUJITA, MARISTELA, MARIA-ENGLER, S. S., BORELLI, PRIMAVERA

PROTEIN MALNUTRITION MODIFIES FIBRONECTIN REMODELING CAPABILITY IN LONG-TERM BONE MARROW CULTURE, 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Medicina da USP

4. **SILVA, G. B.**, HASTREITER, A., MASSARO, R. R., TSUJITA, M., ENGLER, S. S. M., BORELLI, PRIMAVERA
'Protein Malnutrtion Modifies Fibronectin Remodeling Capability in Long-Term Bone Marrow Culture', 2015. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: Hemo-Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e terapia celular; Inst.promotora/financiadora: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular

5. **SILVA, G. B.**, HASTREITER, A., MASSARO, R. R., Beltran, J. O. S, TSUJITA, M., MARIA-ENGLER, S. S., BORELLI, PRIMAVERA
'Regulatory mechanisms of fibronectin turnover in long term bone marrowculture: impacts of low protein diet', 2015. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários; Local: Atlântico Búzios, Rio de Janeiro, Brazil; Cidade: Búzios-RJ; Evento: XIII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular & VIII International Symposium on Extracellular Matrix; Inst.promotora/financiadora: Sociedade Brasileira de Biologia Celular

6. BELTRAN, JACKELINE, **SILVA, G. B.**, OLIVEIRA, D. C., OLIVEIRA, T. C., SANTOS, E. W., Chaves, V. A, FOCK, RICARDO A., BORELLI, P.
DESNUTRIÇÃO PROTEICA ATIVA A SINALIZAÇÃO AUTOFÁGICA REGULADA POR Akt/mTOR NAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
1° lugar no prêmio Jovem Cientista Prof.Dr. Mariano-Doutorado-Ciências Biológicas; Local: Universidade de São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXIII Semana Cientifica Benjamin Eurico Malucelli , realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

7. TSUJITA, M., TEIXEIRA, M., RODRIGUES, M., HASTREITER, A., **SILVA, G. B.**, GOUVEIA, C., Fock, R. A, BORELLI, PRIMAVERA
Femoral Microarchitecture and Endosteal Niche Alterations in Protein Malnutrition: Possible Effects on Hematopoiesis?, 2014. (Seminário,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português.
Prêmio de melhor apresentação em forma de pôster categoria de Doutorado. Prêmio de melhor apresentação oral categoria de Doutorado.; Local: FCF-USP; Cidade: São Paulo; Evento: XIX SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA; Inst.promotora/financiadora: FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-USP

8. TSUJITA, MARISTELA, RODRIGUES, M., TEIXEIRA, M., HASTREITER, A., **SILVA, G. B.**, GOUVEIA, C., Fock, R. A, BORELLI, PRIMAVERA
Femoral Microarchitecture and Endosteal Niche Alterations in Protein Malnutrition: Possible Effects on Hematopoiesis?, 2014. (Seminário,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: Montréal, Canada; Cidade: Montréal, Canada; Evento: 43° Annual Scientific Meeting of the ISEH Society for Experimental Hematology; Inst.promotora/financiadora: Society for Experimental Hematology

9. **SILVA, G. B.**, TSUJITA, MARISTELA, HASTREITER, A., BORELLI, PRIMAVERA
REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR DA MEDULA ÓSSEA EM MODELO MURINO DE DESNUTRIÇÃO PROTEICA, 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português.
Menção honrosa-Doutorado-Ciências Biológicas; Local: Universidade de São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XXIII Semana Cientifica Benjamin Eurico Malucelli , realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

10. **SILVA, G. B.**, TSUJITA, MARISTELA, SANTOS, E. W., BELTRAN, JACKELINE, BORELLI, PRIMAVERA
'Role of AKT/mTOR Pathway in Fibronectin Expression meidated by Protein Malnutrition', 2014. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Local: FCF- USP; Cidade: Saõ Paulo; Evento: XIX Semana Farmacêutica De Ciênicas e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP

11. SANTOS, E. W., OLIVEIRA, D. C., BELTRAN, JACKELINE, **SILVA, G. B.**, TSUJITA, M., CARMO, L. S., Crisma, A. R, Fock, R. A, BORELLI, PRIMAVERA
'Valores de referência de parâmentros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss Webster, C57BL/6, BALB/c e ratos Wistar, 2014. (Seminário,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português; Local: FMVZ-USP; Cidade: São Paulo; Evento: XXIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

12. Beltran, J. O. S, **SILVA, G. B.**, OLIVEIRA, D. C., SANTOS, E. W., BORELLI, P.
Effect of protein malnutrition in the mechanisms of apoptosis, necrosis and autophagy in marrow hypoplasia, 2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital; Local: FCF-USP; Cidade: São Paulo; Evento: XVII Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia; Inst.promotora/financiadora: FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUITCAS-USP

13. Beltran, J. O. S, **SILVA, G. B.**, OLIVEIRA, D. C., SANTOS, E. W., BORELLI, P.
Effect of Protein Malnutrition in the Mecanisms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy in Marrow Hypoplasia, 2012. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Desnutrição, Hemopoese, Medula óssea, Apoptose, Necrose, Autofagia
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://2010.interevent.com.br/sistema/_img/_fck/LIVRO%20DE%20RESUMOS%20final%20para%20site%2023jul12.pdf; Local: Riocentro Exhibition and Convection Center; Cidade: Rio de Janeiro; Evento: 10th Internacional Congress on Cell Biology and the XVI Meetineting Of the Brazilian Society for Cell Biology; Inst.promotora/financiadora: Brazilian Society for Cell Biology and Internacional Federation for Cell Biology

14. Thaísa M. Sandini, Mariana S. B. Udo, **SILVA, G. B.**, Daniel Sanches, Helenice de S. Spinosa
"HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS IN ADULTHOOD RAT OFFSPRING EXPOSED TO Senecio brasiliensis IN THE PRENATAL PERIOD", 2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Faculdade de Medicina Veterinária -USP; Cidade: São Paulo; Evento: 4th Symposium of the Latin American Society of Toxicologic Pathology - A PANORAMIC VIEW OF TOXICOLOGIC PATHOLOGY; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Medicina veterinária -USP e Instituto Butantan

15. Katz, I. S. S, ALBUQUERQUE, L. L., Suppa A, Moreira PC, **SILVA, G. B.**, Carvalho LV, Jensen JR, Starobinas N, Cabrera WHK, De Franco M, Sant Anna AO, BORELLI, P., Ibañez OM, Ribeiro, O. G
Myelotoxixity contribute to the phenotypes of susceptibility to cancer in AIRmin selected mice, 2012. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Instituto Butantan,; Cidade: São Paulo, SP; Evento: XIV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan; Inst.promotora/financiadora: Instituto Butatan

16. **SILVA, G. B.**, ALBUQUERQUE, L. L., Katz, I. S. S, Beltran, J. O. S, Schimieguel, D. M, BORELLI, P.
Análise proteômica do estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição protéica, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: XX Semana Científica; Local: Universidade de São Paulo - SP; Cidade: São Paulo; Evento: XX Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Medicina veterinária e zootecnica - USP

17. **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, Katz, I. S. S, Nakajima, K., Crisma, A. R, Ribeiro, O. G, BORELLI, P.
Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongossubmetidos à desnutrição proteica, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: http://www.rbhh.org/detalhe_artigo.asp?id=475&idioma=; Local: Centro de Convenções Sheraton WTC; Cidade: São Paulo; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia- Hemo; Inst.promotora/financiadora: Associação Brasileira de Hemoterapia e Hematologia

18. **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, Katz, I. S. S, Nakajima, K., Crisma, A. R, Ribeiro, O. G, BORELLI, P.
Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongossubmetidos à desnutrição proteica, 2011. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários. Home page: http://www.rbhh.org/detalhe_artigo.asp?id=475&idioma=; Local: Centro de Convenções Sheraton WTC;

Cidade: São Paulo; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia; Inst.promotora/financiadora: Associação Brasileira de Hematologia e hemoterapia

19. **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, Katz, I. S. S, Nakajima, K., Crisma, A. R, Ribeiro, O. G, BORELLI, P.
Pesquisa de Isoformas de Fibronectina em Culturas de Longa Duração de Estroma Medular de Camundongos Submetidos À Desnutrição Protéica, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Palavras-chave: Fibronectina, matriz extracelular, Desnutrição, Hemopoese
Áreas do conhecimento : Hematologia Clínica
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital
XV Prêmio Jovem Cientista Prof. Dr. Mario Mariano 2º Lugar na Categoria Mestrado- Ciências Biomédicas; Local: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo; Cidade: São Paulo; Evento: XX Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli; Inst.promotora/financiadora: Departamento de Patologia

20. **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, Katz, I. S. S, ALBUQUERQUE, L. L., Ribeiro, O. G, BORELLI, P.
Proteomics analysis of the bone marrow extracellular matrix of mice submitted to protein malnutrition, 2011. (Simpósio,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital; Local: Faculdade de Ciências Faramcêuticas - USP; Cidade: São Paulo; Evento: Simpósio anual de Pesquisa em Ciências Farmacêuticas e XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas -USP

21. **SILVA, G. B.**, SILVA, M. K., Nakajima, K., Crisma, A. R, Beltran, J. O. S, Fock, R. A, BORELLI, P.
Avaliação da fibronectina no estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição protéica, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro
Mensão Honrosa-Prêmio; Cidade: Águas de Lindóia; Evento: XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE

22. **SILVA, G. B.**, SILVA, M. K., Nakajima, K., Crisma, A. R, Beltran, J. O. S, Fock, R. A, BORELLI, P.
Evaluation of fibronectin in bone marrow stroma of mice subjected to protein malnutrition, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários; Cidade: São Paulo; Evento: XV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA; Inst.promotora/financiadora: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

23. Nakajima, K., Crisma, A. R, ROGERO, M. M., **SILVA, G. B.**, SILVA, M. K., BORELLI, P.
Desnutrição protéica altera o ciclo celular de células tronco/progenitoras hematopoéticas da medula óssea comprometendo a hemopoese, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro; Local: Brasil; Cidade: Florianópolis - SC; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia

24. Nakajima, K., Crisma, A. R, ROGERO, M. M., **SILVA, G. B.**, SILVA, M. K., BORELLI, P.
Desnutrição protéica altera o ciclo celular de células tronco/progenitoras hematopoéticas da medula óssea comrpometendo a hemopoese, 2009. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso; Cidade: Florianópolis-SC; Evento: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia - HEMO

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **SILVA, G. B.**
Anemias, 2014. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 1 hora.
Evento: Ciclo de palestras do Projeto de extensão universitária: Jornada Científica dos Acadêmicos de Farmácia e Bioquímica;

2. **SILVA, G. B.**
Anemias, 2013. (Outro, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 1 hora.
Evento: Ciclo de palestras do Projeto de extensão universitária: Jornada Científica dos Acadêmicos de Farmácia e Bioquímica;

3. **SILVA, G. B.**
Hematologia em Laboratório Clínico e Imunohematologia, 2010. (Especialização, Curso de curta duração ministrado)
Referências adicionais : Brasil/Português. 10 horas.
Pós-graduação Lato Sensu. Especialização em Análises Clínias

Educação e Popularização de C&T

Artigos em revistas (Magazine)

1. TEIXEIRA;, P. D., SALES, A. L. C., LOBO, A. R., CARLI;, E., **SILVA, G. B.**, BORELLI, P., TAKAYAMA, ;. L., PEREIRA, R. M. R., COLLI, C.
- DIETARY MAGNESIUM RESTRICTION: CHANGES IN WHOLE-BODY COMPOSITION AND TISSUE MAGNESIUM DISTRIBUTION IN RATS. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.52 - 52, 2013.
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://www.revistanutrire.org.br/files/v38nSuplemento/v38nSuplemento.pdf

2. Beltran, J. O. S, **SILVA, G. B.**, OLIVEIRA, D. C., SANTOS, E. W., MASSARO, R. R., ENGLER, S. S. M., OLIVEIRA, T. C., Chaves, V. A, BORELLI, P.
Desnutrição proteica ativa a sinalização da via autofágica regulada por mTOR na medula óssea. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.60 - 60, 2013.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://www.revistanutrire.org.br/files/v38nSuplemento/v38nSuplemento.pdf

3. TSUJITA, M., **SILVA, G. B.**, Beltran, J. O. S, SALGADO, P. B., ALLEGRINI, S. J., Chaves, V. A, Fock, R. A, BORELLI, P.
Efeitos da desnutrição proteica na densidade óssea e aspectos ósseos microanatômicos. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.343 - 343, 2013.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://www.revistanutrire.org.br/files/v38nSuplemento/v38nSuplemento.pdf

4. SANTOS, E. W., OLIVEIRA, D. C., Beltran, J. O. S, HASTREITER, A., **SILVA, G. B.**, TSUJITA, M., Fock, R. A, BORELLI, P.
Efeitos de dietas hipoproteica ou hiperlipídica nos parâmetros hematológicos e imunológicos em modelo murino. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.342 - 342, 2013.
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital. Home page: http://www.revistanutrire.org.br/files/v38nSuplemento/v38nSuplemento.pdf

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIV Semana Científica Benjamin Eurico Mallucelli**, 2015. (Outra)
Ex vivo Study of Hematopoiesis in Protein Malnutrition: characterization of bone marrow stromal cells in mice.

2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Reunião anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**, 2015. (Congresso)
PROTEIN MALNUTRITION MODIFIES FIBRONECTIN REMODELING CAPABILITY IN LONG-TERM BONE MARROW CULTURE.

3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **13º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN**, 2015. (Congresso)
PROTEIN MALNUTRITION MODIFIES FIBRONECTIN REMODELING CAPABILITY IN LONG-TERM BONE MARROW CULTURE.

4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Hemo-Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e terapia celular**, 2015. (Congresso)
"Protein Malnutrtion Modifies Fibronectin Remodeling Capability in Long-Term Bone Marrow Culture".

5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular & VIII International Symposium on Extracellular Matrix**, 2015. (Simpósio)
"Regulatory mechanisms of fibronectin turnover in long term bone marrowculture: impacts of low protein diet".

6. **"Transição Nutricional no Brasil"**, 2015. (Outra)
.

7. **XIII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular & VIII International Symposium on Extracellular Matrix**, 2015. (Simpósio)
.

8. **I Congresso de Graduação da USP**, 2015. (Congresso)
.

9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXIII Semana Cientifica Benjamin Eurico Malucelli , realizada na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, 2014. (Congresso)
REMODELAMENTO DA MATRIZ EXTRACELULAR DA MEDULA ÓSSEA EM MODELO MURINO DE DESNUTRIÇÃO PROTEICA.

10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIX SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**, 2014. (Simpósio)
"Role of AKT/mTOR Pathway in Fibronectin Expression mediated by Protein Malnutrition".

11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **43rd Annual Scientific Meeting of the ISEH – International Society for Experimental Hematology**, 2014. (Congresso)
Role of AKT/mTOR pathway in fibronectin expression mediated by protein malnutrition.

12. **"Programas de Monitoria para a Graduação"**, 2014. (Seminário)
.

13. **12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN**, 2013. (Congresso)
.

14. **V Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2013. (Simpósio)
.

15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **6 º Congress of the International Society of Nutrigenetics/ nutNutrigenomics**, 2012. (Congresso)
Effect of protein malnutrition in the mechanisms of apoptosis, necrosis and autophagy in marrow hypoplasia.

16. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XVII Semana Farmacêutica de Ciências e Tecnologia**, 2012. (Simpósio)
Effect of protein malnutrition in the mechanisms of apoptosis, necrosis and autophagy in marrow hypoplasia.

17. Apresentação de Poster / Painel no(a) **10th Internacional Congress on Cell Biology and the XVI Meetineting Of the Brazilian Society for Cell Biology**, 2012. (Congresso)
Effect of Protein Malnutrition in the Mecanisms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy in Marrow Hypoplasia.

18. Apresentação de Poster / Painel no(a) **4th Symposium of the Latin American Society of Toxicologic Pathology - A PANORAMIC VIEW OF TOXICOLOGIC PATHOLOGY**, 2012. (Simpósio)
"HAEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL EFFECTS IN ADULTHOOD RAT OFFSPRING EXPOSED TO Senecio brasiliensis IN THE PRENATAL PERIOD".

19. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XIV Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**, 2012. (Simpósio)
Myelotoxicity contribute to the phenotypes of susceptibility to cancer in AIRmin selected mice.

20. Apresentação de Poster / Painel no(a) **6 º Congress of the International Society of Nutrigenetics/ nutNutrigenomics**, 2012. (Congresso)
Proteomics Analysis of the Bone Marrow Extracellular Matrix of Mice Submitted to Protein Malnutrition.

21. **IV Simpósio de pós-graduação em Análises Clínicas**, 2012. (Simpósio)
.

22. Apresentação Oral no(a) **III Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2011. (Simpósio)
Remodelamento da matriz da medula óssea decorrente da desnutrição: Análise proteômica.

23. **III Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2011. (Simpósio)
.

24. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2010. (Congresso)
Avaliação da Fibronectina no Estroma Medular de Camundongos Submetidos à Desnutrição Protéica.

25. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE**, 2010. (Congresso)
Avaliação da Fibronectina no estroma Medular de Camundongos submetidos A Desnutrição Protéica.

26. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA**, 2010. (Congresso)
Evaluation of fibronectin in bone marrow stroma of mice subjected to protein malnutrition.

27. **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2010. (Congresso)
.

28. **Workshop - " O uso de animias na pesquisa e no ensino" - FMVZ - USP**, 2010. (Outra)
.

29. **II Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas**, 2010. (Simpósio)
.

30. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2009. (Congresso)
Desnutrição protéica altera o ciclo celular de células tronco/progenitoras hematopoéticas da medula óssea comprometendo a hemopoese.

31. **ISimpósio do programa de Pós-Graduação em Farmácia -Área de Análises Clínicas**, 2009. (Simpósio)
.

32. **Highlights of ASH in Latin America**, 2009. (Congresso)
.

33. Apresentação Oral no(a) **X Congresso de Iniciação e Produção Científica, IX Seminário de Extensão**

da Metodista e IV Seminário PIBIC/UMESP de Pesquisa da Universidade Metodista de São Paulo, 2007. (Congresso)
Conseqüências do Hipotireoidismo e da reposição de T4 na fertilidade de ratas adultas e da sua proles.

34. **VII BIOMIX**, 2007. (Congresso)
.

35. **Colóquios Ambientais - "Qualidade do Ar: Novas estratégias de Comunicação"**, 2007. (Outra)
.

36. **Colóquios Ambientais - "Exposição materna aos agentes poluentes e riscos para fetos e recém nascidos"**, 2007. (Outra)
.

37. **VI BIOMIX**, 2006. (Congresso)
.

38. **11ª Jornada de Medicina Laboratorial**, 2006. (Congresso)
.

39. **8º Congresso de Iniciação e Produção Científica e 7º Seminário de Extensão da Universidade Metodista de São Paulo**, 2005. (Congresso)
.

40. **V BIOMIX**, 2005. (Congresso)
.

41. **IV BIOMIX**, 2004. (Congresso)
.

42. **7º Congresso de Produção Cientifica e 6º Seminário de Extensão da Universidade Metodista de São Paulo**, 2004. (Congresso)
.

43. **III BIOMIX - III Jornada de Biomedicina**, 2003. (Congresso)
.

Organização de evento

1. **SILVA, GRAZIELA B.**
VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas- SIMPAC and I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology, 2015. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Inglês. Meio de divulgação: Vários

2. **SILVA, G. B.**
V Simpósio da Pós-Graduação em Análises Clínicas, 2013. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

3. **SILVA, G. B.**
8º Congresso de Iniciação Científica e VI BIOMIX, 2006. (Outro, Organização de evento)
Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

Bancas

Bancas

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. **13º Feira Brasileira de Ciências e Engenharia-FEBRACE**, 2015
Universidade de São Paulo
Referências adicionais : Brasil/Português.

Totais de produção

Produção bibliográfica	
Artigos completos publicados em periódico	4
Revistas (Magazines)	6
Trabalhos publicados em anais de eventos	17
Apresentações de trabalhos (Congresso)	10
Apresentações de trabalhos (Seminário)	3
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	10
Apresentações de trabalhos (Outra)	1

Produção técnica	
Curso de curta duração ministrado (especialização)	1
Curso de curta duração ministrado (outro)	2

Eventos	
Participações em eventos (congresso)	25
Participações em eventos (seminário)	1
Participações em eventos (simpósio)	12
Participações em eventos (outra)	5
Organização de evento (outro)	3
Participação em banca de comissões julgadoras (outra)	1

Outras informações relevantes

1

1. Programa de Aperfeiçoamento de Ensino-PAE 2010 Universidade de São Paulo - USP
Disciplina: Hematologia Clínica Responsável pela disciplina: Primavera Borelli

2. Programa de Aperfeiçoamento de Ensino- PAE 2011 Universidade de São Paulo - USP
Disciplina: Fisiologia do Sistema Hematopoético Responsável pela disciplina: Primavera Borelli

3.Programa de Aperfeiçoamento de Ensino- PAE 2014 Universidade de São Paulo - USP
Disciplina: Fisiologia do Sistema Hematopoético Responsável pela disciplina: Ricardo Ambrósio Fock

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 04/02/2016 às 15:46:39.