UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

KARINA NAKAJIMA

**Avaliação do ciclo celular de células tronco/progenitoras
hemopoéticas da medula óssea de camundongos
submetidos à desnutrição protéica**

São Paulo
2010

KARINA NAKAJIMA

**Avaliação do ciclo celular de células tronco/progenitoras
hemopoéticas da medula óssea de camundongos submetidos à
desnutrição protéica**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para
a obtenção do título de doutor

Área de concentração: Análises Clínicas
Orientadora: Prof. Dra. Primavera Borelli

São Paulo

2010

Autorizo a divulgação e reprodução total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica

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

Nakajima, Karina

N163a Avaliação do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica / Karina Nakajima. -- São Paulo, 2010. 170p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Borelli, Primavera

1. Hematologia 2. Células-tronco : Genética experimental
3. Desnutrição protéica : Medicina I. T. II. Borelli, Primavera, orientador.

616.15 CDD

Karina Nakajima

**Avaliação do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas da
medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica**

Comissão julgadora
da
Tese para a obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Primavera Borelli
Orientadora/Presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo ____ de _____ de 2010

DEDICATÓRIA

Para minha família

AGRADECIMENTOS

À minha família, mãe, pai e irmãos, que estiveram longe muitas vezes, mas ainda assim acreditaram no meu esforço. Espero um dia recompensar as minhas ausências...

Ao Gerson Massao Kitano que nos últimos anos esteve sempre presente, me apoiando e incentivando, mas principalmente me fazendo acreditar nos meus propósitos. Obrigada por me fazer ver o mundo com outros olhos e espero tê-lo sempre comigo.

À Amanda Rabello Crisma, pela ajuda em todos os momentos e, principalmente, pela amizade que me acompanhou durante todos os dias e que espero permaneça por muito tempo; com certeza não teria conseguido sem você!

À Mariana Cristina Ferreira, técnica do laboratório e amiga, que sempre permaneceu ao meu lado e ajudou nas horas difíceis.

Às pessoas do laboratório de Bioquímica da Nutrição pela assistência no trabalho.

Ao Marco Aurélio Ramirez Vinolo, ao Ricardo Ambrósio Fock e ao Marcelo Macedo Rogero, por terem me ensinado que o trabalho é importante, mas que a amizade é primordial.

À Dulce Marta Schimieguel, que apesar do pouco tempo de convivência, trouxe muitas alegrias.

À Martina Rudinick e à Luciane Faine, e todas as minhas amigas da Bioquímica Clínica que sempre compartilharam as dificuldades e as alegrias.

À Graziela Batista, à Mariana Koeche e à Luciana Simões que me acompanharam nos últimos anos do doutorado sempre ajudando em todos os aspectos; espero que eu tenha conseguido passar meus conhecimentos, ajudando vocês a seguirem seus caminhos.

Aos estagiários e aos colegas de trabalho, por toda ajuda que prestaram e que me mostraram a importância do trabalho em equipe.

Ao professor Antônio Altair Magalhães de Oliveira, o Táta, que ensinou carismaticamente sobre o profissionalismo e a dedicação.

À Primavera Borelli, por ter me acolhido e me ensinado a difícil tarefa de ser pesquisadora.

Ao apoio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq sem o qual o trabalho não poderia ter sido executado.

Da perfeição segui em vã conquista
Mas vi depressa, já sem a alma acesa,
Que a própria idéia em nós dessa beleza
Um infinito de nós mesmos dista

Fernando Pessoa

RESUMO

NAKAJIMA, K. **Avaliação do ciclo celular de células tronco/progenitoras da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica.** 2010. Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A hemopoese é um processo dinâmico regulado pelo microambiente no qual se situa. O principal tecido hemopoético após o nascimento, a medula óssea, é constituído basicamente por substâncias solúveis, como fatores de crescimento, por uma matriz extracelular (MEC) e por células estromais, além das células hemopoéticas. Esse microambiente indutor íntegro é capaz de regular os processos de sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, induzindo a célula a sair de um estado quiescente e entrar em ciclo celular. Contudo, na desnutrição protéica (DP) observa-se redução significativa da celularidade das células hemopoéticas, tanto no compartimento periférico quanto no central, a medula óssea. O comprometimento estrutural do microambiente medular decorrente da desnutrição pode prejudicar a sinalização de indução do ciclo celular, fato este que justificaria o quadro de pancitopenia. Portanto, no presente estudo nos propusemos avaliar o ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas (CTPH) da medula óssea de camundongos desnutridos. Para tanto, utilizamos um modelo murino, sendo a desnutrição induzida a partir de uma ração hipoprotéica. As CTPH foram obtidas por método de depleção imunomagnética e utilizadas para a avaliação do ciclo celular a partir da incorporação de Iodeto de Propídeo (PI) e Laranja de Acridina (AO). Também, foram quantificadas proteínas regulatórias do ciclo celular por western blot e avaliada a expressão de receptores para fibronectina, VLA4 e VLA5. Paralelamente, em modelo *ex vivo*, avaliou-se a influência de fatores de crescimento e de uma matriz de fibronectina sobre a proliferação das CTPH. Considerando a importância das células estromais na sinalização celular, realizamos o ensaio de CFU-F para a quantificação de células estromais e dos fatores de crescimento secretados. Por fim, avaliamos a eficácia da recuperação nutricional frente às alterações no ciclo celular observadas no modelo de desnutrição. Resumidamente,

observou-se um comprometimento no ciclo celular das CTPH de camundongos desnutridos, com um aumento desta população celular nas fases G0/G1. As proteínas indutórias do ciclo celular apresentaram uma expressão reduzida enquanto que as proteínas inibitórias apresentaram um aumento de expressão nas CTPH dos animais desnutridos. *Ex vivo*, porém, as CTPH dos animais desnutridos responderam adequadamente aos estímulos externos fornecidos, uma vez que a proliferação celular foi igual para ambos os grupos. A avaliação da cultura de CFU-F indicou comprometimento quantitativo das células estromais nos animais desnutridos e uma redução da produção de citocinas importantes no controle da hemopoese. Após a renutrição, observamos uma reversão das alterações do ciclo celular, com recuperação da celularidade medular, aumento da população de CTPH nas fases proliferativas (S/G2/M) e a normalização da expressão das proteínas regulatórias do ciclo celular. Podemos concluir que a desnutrição protéica compromete o ciclo celular de CTPH, provavelmente devido às alterações no microambiente medular, comprovadas pela redução de células estromais e de fatores de crescimento. Uma vez que o fornecimento de quantidades ótimas de fatores de crescimento e de uma matriz de fibronectina, mimetizando *ex vivo* o microambiente íntegro, estimula as células de animais desnutrido a proliferarem, podemos sugerir que todo o mecanismo intracelular de controle do ciclo, aparentemente, não foi comprometido. Em relação à recuperação nutricional, podemos afirmar que esta é eficaz na reversão do quadro de pancitopenia, sendo demonstrado um aumento da proliferação das CTPH

Palavras-chave: Ciclo celular, hemopoese, desnutrição protéica

ABSTRACT

NAKAJIMA, K. **Hematopoietic stem/progenitor cell cycle evaluation from bone marrow of malnourished mice**. 2010. Thesis (PhD) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Brazil, 2010.

Hematopoiesis is a dynamic process governed by the microenvironment in which it is located. Basically, the main hematopoietic tissue, the bone marrow, is composed by soluble factors such growth factors, extracellular matrix (ECM) and stromal cells, besides the hematopoietic cells. This intact inducible microenvironment is capable to control cell survival, proliferation and differentiation, inducing cell to exit a quiescent state and enter the cell cycle. However, in protein malnutrition (PM) is observed a significant reduction of hematopoietic cells, both in peripheral and central compartments. The bone marrow structural impairment due to malnutrition could harm the cell cycle signaling, a fact that could justify the establishment of pancytopenia. Therefore, in this study we set out to assess the cell cycle of hematopoietic stem/progenitors cells (HSPC) from bone marrow of malnourished mice. We used a murine model, and malnutrition induced from a low protein diet. The HPSC were obtained by immunomagnetic depletion method and used for the evaluation of cell cycle from the incorporation of propidium iodide (PI) and Acridine Orange (AO). Also, we quantified the cell cycle regulatory proteins by western blot and evaluated the expression of receptors for fibronectin, VLA4 and VLA5. Meanwhile, in ex vivo model, we evaluated the influence of growth factors and a matrix of fibronectin on the proliferation of HSPC. Considering the importance of stromal cells in cell signaling, we performed the CFU-F assay for the quantification of stromal cells and growth factors secreted. Finally, we evaluated the efficacy of nutritional recovery in the face of cell cycle alterations observed in the model of malnutrition. Briefly, we observed an impairment in the cell cycle of HSPC of undernourished mice, with an increase in this cell population in G0/G1 phase. The proteins that induce cell cycle showed a reduced

expression whereas the inhibitory proteins showed increased expression in HPSC of malnourished animals. *Ex vivo*, however, HSPC of malnourished animals responded appropriately to external stimuli provided, since cell proliferation was similar for both groups. Assessing the culture of CFU-F showed a quantitative impairment of stromal cells in malnourished animals and reducing production of cytokines important in controlling hematopoiesis. After refeeding, we observed a normalization of the cell cycle, with recovery of cellularity, an increased population of proliferative phases HSPC (S/G2/M) and normalization of the expression of cell cycle regulatory proteins. We can conclude that malnutrition compromises the HPSC cell cycle, probably due to changes in the bone marrow microenvironment, as proven by the reduction of stromal cells and growth factors. Since the supply of great quantities of growth factors and a matrix of fibronectin, mimicking an intact microenvironment, stimulates the cells of malnourished animals to proliferate, we suggest that the whole mechanism of intracellular cycle control is apparently not been compromised. Regarding the nutritional recovery, we can say that this is effective in reversal of the pancytopenia, and demonstrated an increased proliferation of HSPC.

Keywords: cell cycle, hemopoiesis, malnutrition

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Caracterização fenotípica das diferentes linhagens hemopoéticas de camundongos	31
Figura 2: Modelo de sinalização de indução do ciclo celular	37
Figura 3: Esquema do processo de recuperação nutricional	48
Figura 4: Consumo médio de água, ração e proteínas	69
Figura 5: Variação de peso corpóreo	70
Figura 6: Gráfico da concentração de insulina sérica entre os grupos controle e desnutrido.....	72
Figura 7: Gráfico da concentração de IGF-1 sérico entre os grupos controle e desnutrido.....	72
Figura 8: Gráfico da concentração de corticosterona sérica entre os grupos controle e desnutrido	73
Figura 9: Gráfico da concentração de TGF- β sérica entre os grupos controle e desnutrido	73
Figura 10: Gráficos representativos da expressão de c-kit (FITC) e Sca-1 (PE) de células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea dos grupos controle e desnutrido.....	83
Figura 11: Gráfico da porcentagem de células tronco hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle e desnutrido	84

Figura 12: Gráficos representativos da análise, por citometria de fluxo, das células tronco/progenitoras hemopoéticas marcadas com iodeto de propídeo(PI) dos grupos controle e desnutrido	86
Figura 13: Gráficos representativos da análise, por citometria de fluxo, das células tronco/progenitoras hemopoéticas marcadas com laranja de acridina (LA) dos grupos controle e desnutrido.....	87
Figura 14: Gráficos da expressão de Ciclina D, PCNA e Ciclina E nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle e desnutrido	90
Figura 15: Gráficos da expressão de Cdk2, Cdk4 e Cdc25a nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle e desnutrido	91
Figura 16: Gráficos da expressão de p21, p27 e p53 nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle e desnutrido.....	92
Figura 17: Fotomicrografias de cortes histológicos da medula óssea esternal marcadas, por imunohistoquímica, para fibronectina de animais controle e desnutrido. Aumento de 20X	93
Figura 18: Fotomicrografias de cortes histológicos da medula óssea esternal marcadas, por imunohistoquímica, para fibronectina de animais controle e desnutrido. Aumento de 40X	94
Figura 19: gráficos representativos da análise, por citometria de fluxo, da expressão de VLA4 (FITC) e VLA5 (PE) nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea dos grupos controle e desnutrido.....	96

Figura 20: Gráficos representativos da análise por citometria de fluxo da expressão de VLA-4 (FITC)/CD34 (PE) e CD34 (FITC)/VLA-5 (PE) de células totais da medula óssea dos grupos controle e desnutrido.....	97
Figura 21: Gráficos da expressão de VLA4 e VLA5 nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle e desnutrido	98
Figura 22: Gráficos da expressão de VLA4 e VLA5 nas células CD34 ⁺ da medula óssea entre os grupos controle e desnutrido	98
Figura 23: gráficos representativos da análise, por citometria de fluxo, da expressão de CD117 (FITC), CD123 (FITC) e CD126 (PE) nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea dos grupos controle e desnutrido.....	99
Figura 24: Gráficos da expressão de CD117, CD123 e C126 em células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle e desnutrido	100
Figura 25: Gráfico da cinética de adesão/proliferação da cultura de CFU-F e gráfico da área sob a curva entre os grupos controle e desnutrido	102
Figura 26: Gráfico da cinética de produção de IL6 do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle e desnutrido	103
Figura 27: Gráfico da cinética da produção de IL3 do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle e desnutrido	104
Figura 28: Gráfico da cinética da produção de SCF do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle e desnutrido	105
Figura 29: Gráfico da cinética da produção de GM-CSF do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle e desnutrido	106

Figura 30: Gráfico da cinética da produção de IL10 do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle e desnutrido	107
Figura 31: Gráfico da cinética da produção de IL1 β do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle e desnutrido	108
Figura 32: Gráficos comparativos da expressão de fosfo-ERK1/2 nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle e desnutrido.....	110
Figura 33: Gráficos comparativos da expressão de RhoA, fosfo-Rac/cdc42 e fosfo-FAK nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle e desnutrido.....	111
Figura 34: Fotomicrografias ilustrativas das células tronco/progenitoras hemopoéticas após 3 dias de cultivo em meio líquido e sobre uma matriz de FN	112
Figura 35: Fotomicrografias ilustrativas das células tronco/progenitoras hemopoéticas após 5 dias de cultivo em meio líquido e sobre uma matriz de fibronectina	113
Figura 36: Gráficos da celularidade das células tronco/progenitoras hemopoéticas de animais controle e desnutrido após 3 e 5 dias de cultivo em meio líquido e sobre uma matriz de fibronectina	114
Figura 37: Gráficos da celularidade de células tronco/progenitoras hemopoéticas de animais controle e desnutrido após 3 e 5 dias de cultivo dos animais controle e desnutridos	115
Figura 38: Gráficos da adesão celular das células tronco/progenitoras hemopoéticas de animais controle e desnutrido após 3 e 5 dias de cultivo sobre uma matriz de fibronectina	117

Figura 39: Gráfico da porcentagem de células tronco hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle D, desnutrido, controle R e renutrido.....	120
Figura 40: Gráficos representativos da análise, por citometria de fluxo, das células tronco/progenitoras hemopoéticas marcadas com iodeto de propídeo (PI) dos animais controle R e renutrido	121
Figura 41: Gráficos da porcentagem de células Lin ⁻ em G0/G1 e em S/G2/M entre os grupos controle D, desnutrido, controle R e renutrido	123
Figura 42: Gráfico da expressão de Ciclina D nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle R e renutrido	125
Figura 43: Gráfico da expressão de Ciclina E nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle R e renutrido	125
Figura 44: Gráfico da expressão de p27 nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle R e renutrido	126
Figura 45: Gráfico da expressão de p21 nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle R e renutrido	126
Figura 46: Gráfico da expressão de PCNA nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle R e renutrido	127
Figura 47: Gráfico da expressão de Cdk4 nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle R e renutrido	127
Figura 48: Gráfico da expressão de Cdk2 nas células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea entre os grupos controle R e renutrido	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição das rações utilizadas nos experimentos.....	49
Tabela 2: Composição da mistura salínica	50
Tabela 3: Composição da mistura vitamínica	51
Tabela 4: Painel de anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das células Lin ⁻	58
Tabela 5: Resultados das concentrações plasmáticas de proteínas totais e albumina	71
Tabela 6: Valores da série eritrocitária	75
Tabela 7: Resultados do número total de leucócitos e das diferentes populações leucocitárias	76
Tabela 8: Resultado celularidade da medula óssea	77
Tabela 9: Resultado dos valores absolutos das diferentes populações presentes na medula óssea	78
Tabela 10: Resultado do número total de células do baço	80
Tabela 11: Resultado dos valores absolutos das diferentes populações presentes no baço	81
Tabela 12: Caracterização imunofenotípica das células Lin ⁻	82
Tabela 13: Porcentagem da população de células Lin ⁻ em G0/G1 e S/G2/M	88
Tabela 14: Porcentagem da população de células Lin ⁻ em G0 e G1	88
Tabela 15: Valores comparativos dos parâmetros hematológicos dos animais dos grupos controle e renutrido	118
Tabela 16: Porcentagem da população de células Lin ⁻ em G0/G1 e S/G2/M dos animais dos grupos controle e renutrido	122

LISTA DE SIGLAS

AIN: Instituto Americano de Nutrição

APC: Aloficocianina

BSA: Albumina Bovina

Cdk: Quinase dependente de ciclina

CD: "cluster of differentiation"

CFU-F: Unidade formadora de colônia fibroblastóide

CTH: Célula tronco hemopoética

CTPH: célula tronco/progenitora hemopoética

DNA: Ácido deoxirribonucléico

DP: desnutrição protéica

E2F: Fator de transcrição E2F

EDTA: ácido etileno diaminotetracético

ERK: Quinase regulada por sinal extracelular

FAK: Quinase de adesão focal

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

FN: Fibronectina

G0: Estágio quiescente do ciclo celular

G1: Gap 1

G2: Gap 2

HDAC: Deacetilases de histonas

IFN- γ : Intérferon gama

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL3: Interleucina 3

IL6: Interleucina 6

LA: Laranja de acridina

Lin⁻: Linhagem negativa

LTRC: Células de reconstituição de longo período

M: Mitose

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MEC: Matriz extracelular

MTT: brometo de metiltiazolildifenil-tetrazolium

PBS: solução tampão fosfato

PE: Ficoeritrina

PI: Iodeto de propídeo

PHM: progenitor hemopoético multipotente

PL: Progenitor linfóide

PM: Progenitor mielóide

RNA: Ácido ribonucléico

RTK: Receptor de tirosina quinase

S: Síntese

SBF: Soro bovino fetal

SCF: Fator de célula tronco

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SP: população marginal

STRC: Células de reconstituição de curto período

TBS: Solução tampão Tris

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

VLA: Antígeno de expressão tardia

SUMÁRIO

1. Introdução	25
1.1. Desnutrição	25
1.2. Linhagens celulares hemopoéticas de camundongos	26
1.3. Hemopoese e desnutrição	32
1.4. Microambiente medular e ciclo celular	35
1.5. Recuperação nutricional	42
2. Objetivos	44
3. Material e métodos	46
3.1. Animais	46
3.2. Indução da desnutrição	46
3.3. Indução do processo de recuperação nutricional	47
3.4. Preparo das rações	47
3.4.1. Avaliação das concentrações protéicas das rações	47
3.5. Obtenção de amostras sanguíneas	52
3.6. Avaliação das concentrações de proteínas totais e albumina sérica	52
3.7. Hemograma e contagem de reticulócitos	52
3.8. Avaliação de IGF-4, TGF- β , insulina e corticosterona séricos	53
3.9. Obtenção de células do baço	53
3.9.1. Esplenograma	54
3.10. Obtenção de células da medula óssea	54
3.10.1. Mielograma	54

3.10.2. Separação das células Lin ⁻ (depleção negativa) por método imunomagnético.....	55
3.10.3. Caracterização imunofenotípica das células Lin ⁻	56
3.11. Quantificação de células tronco, Lin ⁻ Sca1 ⁺ ckit ⁺ , da medula óssea por citometria de fluxo	56
3.12. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin ⁻ utilizando iodeto de propídeo (PI) e RNase	57
3.13. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin ⁻ utilizando Laranja de Acridina (LA)	57
3.14. Avaliação da expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular de células Lin ⁻ por western blotting	59
3.15. Avaliação da fibronectina da medula óssea esternal por imunohistoquímica	60
3.16. Avaliação da expressão de receptores para fibronectina, VLA-4 e VLA-5, de células CD34 ⁺ e de células Lin ⁻	61
3.17. Avaliação da expressão de receptores para fatores de crescimento, CD123 (IL3R), CD126 (IL6R) e CD117 (ckit) de células Lin ⁻ da medula óssea	62
3.18. Avaliação das células estromais da medula óssea: ensaio de CFU-F	63
3.18.1. Quantificação de citocinas produzidas por células estromais a partir da cultura de CFU-F	63
3.19. Quantificação de proteínas da via de sinalização de MAPK e FAK de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin ⁻) da medula óssea por western blotting.....	64

3.20. Ensaio de proliferação das células Lin ⁻ frente a fatores de crescimento (cultura líquida) e sobre uma matriz de fibronectina.....	64
3.20.1. Viabilidade celular: ensaio de MTT	65
3.20.2. Adesão celular: ensaio de Cristal Violeta	66
4. Análise estatística	67
5. Resultados	68
5.1. Avaliação das concentrações protéicas das rações	68
5.2. Avaliação do estado nutricional dos animais.....	68
5.3. Avaliação de IGF-1, TGF- β , insulina e corticosterona séricos	68
5.4. Avaliação hematológica	74
5.4.1. Eritrograma	74
5.4.2. Leucograma	74
5.4.3. Mielograma	74
5.4.4. Esplenograma	79
5.5. Caracterização imunofenotípica das células Lin ⁻	79
5.6. Quantificação de células tronco, Lin ⁻ Sca1 ⁺ ckit ⁺ , da medula óssea por citometria de fluxo	79
5.7. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin ⁻ da medula óssea utilizando Iodeto de Propídeo e RNase	85
5.8. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin ⁻ da medula óssea com Laranja de Acridina	85
5.9. Quantificação de proteínas regulatórias das fases G0/G1 do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin ⁻) da medula óssea.....	89

5.10. Avaliação da Fibronectina da medula óssea esternal por imunohistoquímica	89
5.11. Avaliação da expressão de receptores para fibronectina, VLA-4 e VLA-5, de células CD34 ⁺ e de células Lin ⁻	95
5.12. Avaliação da expressão de receptores para fatores de crescimento, CD123 (IL3R), CD126 (IL6R) e CD117 (ckit) de células Lin ⁻ da medula óssea por citometria de fluxo	95
5.13. Avaliação da adesão/proliferação das células estromais por cristal violeta a partir do ensaio de CFU-F	101
5.14. Quantificação de citocinas produzidas a partir da cultura de CFU-F	101
5.15. Quantificação de proteínas da via de sinalização de MAPK e FAK de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin ⁻) da medula óssea por western blotting.....	109
5.16. Avaliação da proliferação das células Lin ⁻ após cultivo sobre uma matriz de fibronectina e sob estimulação por fatores de crescimento: ensaio de MTT.....	109
5.17. Avaliação da adesão das células Lin ⁻ após cultivo sobre uma matriz de fibronectina e sob estimulação por fatores de crescimento: ensaio de Cristal Violeta.....	116
5.18. Recuperação nutricional	116
5.18.1. Avaliação hematológica	116
5.18.1.1. Hemograma	116
5.18.1.2. Mielograma	116

5.18.2. Quantificação de células tronco, Lin ⁻ Sca-1 ⁺ c-kit ⁺ , da medula óssea por citometria de fluxo após recuperação nutricional	119
5.18.3. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin ⁻ da medula óssea após recuperação nutricional, utilizando Iodeto de Propídeo	119
5.18.4. Quantificação de proteínas regulatórias das fases G0/G1 do ciclo celular de células Lin ⁻ da medula óssea após recuperação nutricional	124
6. Discussão	129
6.1. Aspectos nutricionais	129
6.2. Aspectos hematológicos	130
6.3. Ciclo celular	131
6.4. Recuperação nutricional	140
7. Conclusão	143
8. Referências	144

1. INTRODUÇÃO

1.1. Desnutrição

Atualmente, a desnutrição é considerada um dos principais 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; no norte da África 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 considerada desnutrida, ou seja, cerca de 1 bilhão de pessoas (FAO, 2009).

A desnutrição acomete principalmente crianças, idosos e indivíduos hospitalizados sob alimentação parenteral ou que apresentam distúrbios alimentares (WAITZBERG et al., 1999; MARCOS, 2000; BRUNDTLAND et al., 2000; GADDUCCI et al., 2001; AKNER e CEDERHOLM, 2001; NOVA et al., 2002; KEUSCH, 2003 JOOSTEN, 2008, PAWELLEK, 2008; MAIA, 2008). Dentre os indivíduos hospitalizados, a prevalência da desnutrição varia de 20% a 50% (NORMAN, 2007). No Brasil, estima-se que 12 milhões de pessoas, ou seja, 6% da população apresentam algum tipo de desnutrição (FAO, 2004), das quais aproximadamente 60% encontram-se em áreas urbanas (IBGE, 2001).

Clinicamente, as conseqüências da desnutrição dependem da intensidade, da duração e da causa da deficiência e, na dependência dos mesmos, pode-se observar o comprometimento do desenvolvimento psico-motor, no caso de crianças, alterações histológicas e funcionais em diversos órgãos como coração, pulmão, rins, trato gastrointestinal e aumento da susceptibilidade às infecções (DE ANGELIS, 1986; AUGUSTO et al., 1995; COTRAN et al., 2000, GROVER, 2009). Estas alterações, de maneira geral, levam a problemas de saúde, o que contribui para a deterioração do estado nutricional. Esses efeitos são observados principalmente em crianças, sendo que dados de 2001 (WHO) indicam que, aproximadamente, 54% dos casos de mortalidade infantil no mundo foram decorrentes da desnutrição.

Estudos evidenciam que a morbidade causada por diarreia em crianças desnutridas está aumentada em relação às crianças nutridas (CHANDRA, 1991; BERKOWITZ, 1992; CAULFIELD, 2004) uma vez que a desnutrição pode modificar a imunidade mediada por células (GOOD e LORENZ, 1988; CHANDRA, 1991, 1997; SCHAIBLE, 2007). Indivíduos desnutridos são susceptíveis a infecções por patógenos intracelulares que, reconhecidamente, acometem indivíduos com imunidade celular deprimida (REYNOLDS et al, 1992).

Muitos autores reconhecem, na desnutrição, a existência de duas síndromes - *Kwashiorkor* e *Marasmus* (WATERLOW, 1971). Ainda hoje, considera-se que *Kwashiorkor* e *Marasmus* representem dois aspectos do desbalanço e inadequação nutricional mais do que duas entidades separadas com origens em dietas diferentes (WATERLOW, 1971; CHANDRA, 1977). Assim, os quadros clínicos não podem ser definidos como resultantes de carências específicas de proteínas e/ou de calorias (DE ANGELIS, 1977). *Kwashiorkor* e *Marasmus* são os dois extremos da desnutrição, porém muitos estados intermediários são reconhecidos sendo que em todos eles é freqüente a presença de infecções (OLSON, 1975; CHANDRA, 1981). Assim, pode-se dizer que a desnutrição é geralmente composta de deficiências múltiplas de nutrientes em extensões variáveis (CHANDRA, 1981).

1.2. Linhagens celulares hemopoéticas de camundongos

A hemopoese consiste em um processo dinâmico no qual células tronco hemopoéticas (CTH) pluripotentes, através de estímulos específicos, proliferam e se diferenciam para originar as diferentes linhagens celulares que compõem o sistema sanguíneo. O controle desse processo é multimedido por um sistema constituído por citocinas, fatores de crescimento, hormônios, por uma matriz extracelular e por células estromais, constituindo um microambiente indutor, de forma a estabelecer o "pool" celular de acordo com as necessidades, sejam fisiológicas ou patológicas (EVANS et al., 1991; BRACH e HERMANN, 1991; MAYANI et al., 1992; ABOUD e LICHTMAN, 2001). Nesse processo, uma única célula tronco pluripotente é capaz de originar inúmeras

outras células, comprometidas para a linhagem mielóide ou linfóide, segundo uma progressão geométrica e/ou então é capaz de se auto-renovar para manter constante a quantidade de células tronco na medula óssea. Segundo o "modelo de sucessão clonal", primeiramente descrito por KAY em 1965, um pequeno número de células tronco é responsável pela manutenção da quantidade de células sanguíneas maduras, enquanto que o restante encontra-se em quiescência sem contribuir para a hemopoese até que as células tronco em atividade tenham exaurido a sua capacidade proliferativa (EZOE et al. 2004). Porém, nesse caso, deveria haver um controle muito rigoroso capaz de, seletivamente, induzir o ciclo celular das CTH. Por essa razão, outros modelos foram sugeridos, incluindo o modelo estocástico, o qual pressupõe que as CTH entram no ciclo celular e se diferenciam de forma aleatória (BRADFORD et al, 1997; CHESHER et al, 1999), sendo que a proliferação e a sobrevivência dos progenitores aparentemente são controlados por fatores de crescimento (OGAWA, 1989). De fato, estudos demonstraram que o sistema hemopoético de camundongos irradiados pode ser totalmente reconstituído após o transplante de um pequeno número de células tronco, sendo que a manutenção da hemopoese é promovida pela ativação seqüencial de diferentes clones de células tronco (WILLIAM et al. 1984; LAMISCHKA et al, 1986). Outras teorias procuram explicar a ontogenia do sistema: a teoria determinista, em que a definição entre auto-renovação e diferenciação já estaria previamente determinada, e a teoria instrutiva, que propõe que a auto-renovação e/ou diferenciação seria definida por substâncias solúveis, provavelmente fatores de crescimento. Quesenberry et al, (2002, 2005, 2006) propõe que o sistema hemopoético pode, na verdade, contemplar todas as hipóteses ontogênicas, o que a nosso ver é perfeitamente possível e explicaria a plasticidade do tecido hemopoético frente a diferentes situações.

As células tronco hemopoéticas, de origem mesodérmica, originam progenitores multipotentes com pequena ou sem capacidade de auto-renovação que, por sua vez, originam progenitores mais restritos quanto à capacidade de diferenciação, (WEISSMAN, 2000; BRYDER, 2006). Estudos indicam que o comprometimento das células tronco pluripotentes para uma determinada linhagem hemopoética ocorra nos estágios iniciais da divisão celular e de forma assimétrica, ou seja, podendo resultar em

duas células filhas com graus de comprometimento diferentes (SUDA et al, 1984; TAKANO et al, 2004; QUESENBERRY et al., 2005) ou simétrica. Em camundongos, assim como em humanos, as CTH originam um progenitor multipotente (PHM) o qual se diferencia para duas linhagens celulares restritas: a de progenitores linfóides (PL), da qual resultam os linfócitos T, linfócitos B e células "natural killers" (NK) e a de progenitores mielóides (PM) que originam os progenitores granulomonocíticos (PGM) e megacariocítico/eritróide (PME) (KONDO et al, 1997; AKASHI et al, 1999; WEISSMAN e SHIZURU, 2008).

Em relação às CTH, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram uma extensa heterogeneidade de fenótipo e de comportamento, sendo que estas podem diferir quanto a sua capacidade de auto-renovação, ao número de progenitores diferenciados por CTH, a capacidade de diferenciação e o padrão de migração (SPANGRUDE et al, 1988; SIEBURG et al, 2006). Contudo, as principais características que definem as CTH consistem na sua habilidade em manter um equilíbrio entre a auto-renovação e a diferenciação; serem pluripotentes podendo originar de 8 a 10 linhagens distintas de células maduras; apresentarem uma extensa capacidade proliferativa apesar de a maioria da população encontrar-se em G0; serem muito raras, variando em torno de 1 a cada 10.000 a 100.000 células da medula óssea e serem capazes de repovoar o tecido lesado (BONNET, 2002).

As CTH de camundongos podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com a sua habilidade em reconstituir as diferentes linhagens celulares em animais irradiados: as CTH com capacidade de reconstituição por tempo indefinido ("long-term reconstituting cells - LTRC"), que podem manter o sistema hemopoético durante a vida inteira do animal transplantado e as com capacidade de reconstituição por um curto período ("short-term reconstituting cells - STRC"), que podem repovoar as populações de células linfóides e mielóides por algumas semanas (ZHONG, 2005). As LTRC, as mais primitivas e consideradas as verdadeiras células tronco, proliferam mais lentamente que as SLTC acarretando em um "engraftment" (enxertamento) tardio, mas sustentável da medula óssea. Por outro lado, as SLTC apresentam um "engraftment" precoce, porém, não sustentável (JONES, 1990). Dessa forma, para que um animal irradiado sobreviva à

aplasia medular é necessário o transplante concomitante de células com capacidade de "enxertamento" precoce juntamente com as LTRC (ZHAO et al, 2000).

A forma mais utilizada para isolar e caracterizar as diferentes populações de células hemopoéticas é a partir de um conjunto de marcadores de superfície, ou seja, de seu imunofenótipo (WEISSMAN e SHIRUZU, 2008). As células tronco são comumente caracterizadas por não expressarem marcadores de células diferenciadas (linhagem), mas expressarem os marcadores Sca-1 ("stem cell antigen-1"), c-Kit (receptor de "stem cell factor") e, expressar, pelo menos em baixas quantidades, Thy-1 (CD90), logo sendo denominadas $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{Thy-1}^{\text{low}}$ (SPANGRUDE, 1988; USHIDA, 1992; WEISSMAN, 2000, 2008; PEARCE, 2004; BRYDER, 2006). Essa rara população de células engloba, praticamente, toda as LTRC e a maioria das STRC, que podem ser distinguida das primeiras devido à co-expressão de Flt3 (CD135) e Mac-1 (CD11b) (MORRISON, 1997; CHRISTENSEN, 2001). Outros dois marcadores importantes são CD34 e CD38. Em camundongos é aceito que as CTH mais primitivas, ou seja, as LTRC encontram-se na população de células CD34^- (OSAWA, 1996; SATO, 1999); porém, Donnelly et al verificou que células $\text{CD34}^+ \text{Lin}^-$ também contém uma parcela de LTRC, mas provavelmente não na subpopulação $\text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$. ZHAO et al (2000), caracterizou três subpopulações de CTH $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+ : \text{CD38}^+ \text{CD34}^-$, $\text{CD38}^+ \text{CD34}^+$ e $\text{CD38}^- \text{CD34}^+$. Nos estudos competitivos de repopulação, verificou-se que a subpopulação $\text{CD38}^+ \text{CD34}^-$ promoveu a reconstituição por tempo indefinido do sistema hemopoético após três transplantes de medula subseqüentes, ou seja, nessa subpopulação estavam contidas as LTRC (IWASAKI, 2007). Já as subpopulações $\text{CD38}^+ \text{CD34}^+$ e $\text{CD38}^- \text{CD34}^+$ apresentaram baixa capacidade de reconstituição por tempo indefinido, porém, apresentaram uma excelente atividade de reconstituição por um curto período, ou seja, nessas subpopulações estavam contidas as STRC (ZHONG, 2005)

A partir das CTH, diferenciam-se as células progenitoras hemopoéticas multipotentes (CPM) as quais podem se comprometer para as linhagens linfóides (PL) e mielóides (PM). Essa diferenciação irreversível resulta na modificação do fenótipo celular, sendo que a expressão dos marcadores de superfície é alterada devido ao comprometimento gênico. As CPM são definidas como as células $\text{Flt3}^+ \text{Thy1.1}^-$ na

população $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$. A partir destas, os progenitores linfóides podem ser isolados a partir do fenótipo $\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^+ \text{Thy1.1}^- \text{Sca-1}^{\text{lo}} \text{c-Kit}^{\text{lo}}$ (WEISSMAN, 2000, 2008; BRYDER, 2006) e os progenitores mielóides pelo fenótipo $\text{Lin}^- \text{IL-7R}\alpha^- \text{Thy1.1}^- \text{Sca-1}^{\text{lo}} \text{c-Kit}^{\text{lo}}$. Logo, isolando-se a população de células Lin^- , são recuperadas as células tronco, os progenitores multipotentes e os progenitores mielóides e linfóides, de forma que podemos denominá-las como células tronco/progenitoras (**Figura 1**).

Além da marcação de antígenos de superfície, as CTH também podem ser isoladas com base na elevada atividade da aldeído desidrogenase (ARMSTRONG, 2004) e na habilidade em efluir certos corantes fluorescentes, como Rodamina-123 (Rho) e Hoechst 33342 (Ho). O método alternativo mais utilizado envolve a identificação da denominada "side population" (SP), a qual é caracterizada pela capacidade das células tronco em efluir o corante Ho devido a presença seletiva de transportadores ABC/G2 na superfície das CTH (ZHOU, 2001; KIM, 2002). A frequência da subpopulação LTRC dentro da "side population" depende da eficiência com que ocorre o efluxo do corante: quanto mais eficiente for o processo, mais purificada é essa subpopulação. Em relação aos marcadores de superfície, as células SP são $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$, apresentando subpopulações positivas para CD34, CD11b, Thy-1 e CD31 (PECAM-1) e subpopulações negativas para CD34, Thy-1 e CD135 (PEARCE, 2004). Porém, Morita et al (2006) verificou que, dentre a população $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD34}^-$ (CTH), havia tanto células SP quanto não-SP em quantidades quase equivalentes, confirmando outros estudos que identificaram CTH na população não-SP (PEARCE, 2004; BALAZS, 2006). Por essa razão, a identificação de células somente pelo fenótipo SP, não é um recurso confiável para a purificação das CTH presentes na medula óssea, somando-se ao fato de tal corante apresentar uma toxicidade que pode interferir em análises subseqüentes das CTH.

Figura 1: Caracterização fenotípica das diferentes linhagens hemopoéticas de camundongos e humanos. PMM correspondem às células progenitoras multipotentes, PL aos progenitores linfóides, PM aos progenitores mielóides, PGM aos progenitores granulomonocíticos, PME aos progenitores megacariocíticos/eritróides. Modificado de Bryder, 2006.

1.3. Hemopoese e desnutrição

A hemopoese ocorre em regiões histo-anatômicas específicas onde existem localizações denominadas de microambientes e que permitem a formação das diferentes linhagens sanguíneas. Esse microambiente hemopoético foi primeiramente aventado por Schofield (1978) como o principal regulador das CTH, controlando todo o processo de diferenciação, proliferação e auto-renovação. Basicamente, o microambiente é constituído por células sanguíneas em diferentes estágios de maturação, células estromais (células reticulares, macrófagos, fibroblastos, adipócitos), por uma matriz extracelular, formada principalmente por fibronectina, laminina, colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico, e por substâncias solúveis (EVANS et al., 1991; BRACH e HERMANN, 1991; MAYANI et al., 1992; ABBOUD e LICHTMAN, 2001), apresentando-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica que, além de fornecer o parênquima de sustentação para as células hemopoéticas, permite um "ambiente bioquímico" fundamental para a proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (MAYANI et al., 1992; OPAS, 1994; ABBOUD e LICHTMAN, 2001; ARAI, 2005; RENSTRÖM et al. 2010). Dessa maneira, supõe-se a existência de fatores regulatórios que formariam microambientes indutivos (TRENTIN, 1978; TESTA e DEXTER, 1990) controlando a hemopoese pela produção e secreção local de citocinas e/ou hormônios pelas células estromais, pela co-localização de citocinas para as células tronco nos locais de contato célula-célula e/ou célula-MEC ou ainda, por estímulo direto pelo contato celular (RIOS e WILLIAMS, 1990; METCALF, 1992; OPAS, 1994; ABBOUD e LICHTMAN, 2001; ARAI, 2005; RENSTRÖM et al. 2010). Atualmente, está bem estabelecido como nicho das CTH as regiões endosteais dos ossos trabeculares (CALVI, 2003; ZHANG, 2003) porém, mais recentemente, foi descrito um segundo nicho, o vascular. Tal nicho foi primeiramente descrito após a verificação de que tratamento mieloablativo, induz a mobilização das CTH, as quais se soltam do nicho endosteal e migram para o centro da medula óssea, até o nicho vascular, restabelecendo a hemopoese (WILSON, 2006; RENSTRÖM, 2010). Logo, pressupõe-se que os nichos

endosteal e paratrabecular são as regiões que abrigam as CTH em quiescência e que no nicho vascular encontram-se as células em proliferação/diferenciação.

Um dos pré-requisitos para a hemopoese é a fixação da célula em microambientes particulares, possibilitando interações célula-célula e célula-MEC (TAVASSOLI e MINGUELL, 1991). Demonstrou-se que a implantação da célula tronco é dependente de migração intramedular seguida de retenção seletiva em nichos específicos (NILSSON, 2001; WILSON, 2006), sendo que a interação das células primitivas e o estroma depende da presença de proteoglicanos na MEC secretados pelas células estromais (MAYANI, 1992). Proteoglicanos associados à membrana celular podem interagir com outros componentes da MEC como fibronectina, constituindo um sistema de regulação da proliferação celular (TAVASSOLI e MINGUELL, 1991).

Na medula óssea, as células tronco/progenitoras estão em contato estrito com a fibronectina, sendo que integrinas expressas por essas células, VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ integrina) e VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$ integrina), são reconhecidas como mediadoras da interação entre essa população celular e a fibronectina tanto em camundongos quanto em humanos (WILLIAMS, 1991; LOO, 1998). Alguns estudos demonstraram que a expressão dessas integrinas em células progenitoras hemopoéticas é modulada após contínua exposição a citocinas em culturas *ex vivo* (BECKER, 1999; PROSPER, 1998), sendo verificado relação importante entre o ciclo celular e a adesão dessas células, via VLA-4 e VLA-5.

Em culturas *ex vivo*, a população de células progenitoras em S/G2/M estaria predominantemente aderida à fibronectina enquanto que as células em G0 seriam encontradas com mais frequência na população de células não aderidas, sugerindo que a transição de um estado de quiescência para a ativação do ciclo celular esteja associado ao potencial de adesão à fibronectina (GIET et al, 2001 e 2002). Porém, a ativação do ciclo celular não causa a adesão da célula à fibronectina, uma vez que são encontradas células em ciclo na fração não aderente. Giet (2001) verificou também que a adesão das células durante o ciclo é mediada, preferencialmente, por VLA-5, sendo que a estimulação por citocinas permite a superexpressão desse receptor.

Ainda em relação às integrinas, sua porção citoplasmática é capaz de interagir com o citoesqueleto celular, logo, estão intimamente relacionadas à morfologia e à migração celular. Porém, a importância das integrinas não está relacionada somente com a adesão/migração da célula. Verifica-se também que a ativação dessas moléculas induz a transdução de sinal afetando a expressão gênica (HANKS, 1997; DANEN, 2001). A interação entre integrinas e a MEC ativa a via da FAK ("focal adhesion kinase") que se une à via da MAPK ("mitogen-activated protein kinase") promovida por fatores de crescimento. Dessa forma, a interação das células tronco/progenitoras à fibronectina intensifica o crescimento e a sobrevivência das mesmas (EZOE et al, 2004).

Alterações hematológicas quantitativas como anemia (MARTINS et al., 1971; DE ANGELIS, 1986; AUGUSTO, 1995; LEE e 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-hematopoéticos em condições de desnutrição e estão associadas à modificação da resposta imune que se traduz por maior suscetibilidade a infecção (SCRIWSHAW, 1969; GROSS e NEWBERNE, 1980; TOMKINS, 1986; VICTORIA e HERNANDEZ, 1990; SCHAIBEL, 2007).

Em estudos no nosso laboratório temos encontrado em desnutrição protéica, hipoplasia de medula óssea de camundongos (BORELLI et al, 1995, 2001, 2007) com evidências histológicas de alteração da matriz extracelular. VITURI et al. (2000) encontrou alterações na proporção de proteínas, especialmente de fibronectina, trombospondina e laminina, na MEC de camundongos desnutridos, situação que poderia contribuir para a hipoplasia observada. Mais recentemente, a partir da caracterização imuno-histoquímica e ultra-estrutural de tais alterações evidenciou-se aumento na deposição de fibronectina na medula óssea esternal de animais desnutridos especialmente em sítios endosteais/paratrabeculares (regiões de fixação de células tronco hemopoéticas) e aumento na deposição de laminina, particularmente em regiões perisinusais. Tais alterações podem modificar a co-localização de uma série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de

crescimento e diferenciação de células hemopoéticas (BORELLI et al., 1995, 2001, 2007; KLEIN, 1995; VITURI, 2000).

1.4. Microambiente medular e ciclo celular

O ciclo celular é o fenômeno básico de manutenção do número de células de um organismo/tecido e corresponde à série de acontecimentos e alterações compreendidas entre uma mitose e outra. O ciclo da divisão celular é coordenado e regulado por meio de eventos em que as células duplicam seu material genético (DNA) e, posteriormente, entram em divisão. Concluída a mitose, as células neoformadas podem continuar a dividir-se, passando por todas as fases do ciclo, ou podem deixar o ciclo, tornando-se células com baixa atividade metabólica em estado de repouso (G₀). Estas células podem reentrar no ciclo por meio de estímulos apropriados (SCHAFER, 1998).

O ciclo celular divide-se em fases que apresentam funções e tempos de duração distintas. O processo de divisão nuclear e a separação das células filhas ocorrem na mitose (fase M); o período entre uma mitose e outra é denominada Intérfase. A replicação do DNA nuclear ocorre somente na fase S (período de síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de fase G₁, e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é a fase G₂; essas fases propiciam um tempo adicional para o crescimento celular.

A seqüência dos eventos do ciclo é coordenada por um sistema controle, o qual ciclicamente desencadeia os processos essenciais da reprodução celular tais como replicação de DNA e a segregação cromossômica. Este controle é mediado pela ação de quinases dependentes de ciclinas (Cdk) a partir da ativação promovida por suas subunidades, as ciclinas. A formação, ativação e separação dos complexos de ciclina-Cdk são os eventos fundamentais que coordenam o ciclo celular (BLAIN et al., 1997), uma vez que esses complexos induzem processos pela fosforilação de serinas e treoninas, em proteínas selecionadas.

A progressão de G₁ depende da expressão sustentável de ciclina D (EKHOLM e REED, 2000), sendo que a adesão celular mediada por integrinas associada aos estímulos

promovidos por fatores de crescimento acarreta no acúmulo de ciclina D1 (ZHU et al, 1996). O complexo ciclina D/cdk4,6 formado leva a fosforilação inicial de Rb, que em última instância leva a síntese de ciclina E, além de resultar na redistribuição de p21 e p27, impedindo que estas proteínas inibitórias atuem sobre o complexo ciclina E/cdk2. Dessa forma, o complexo ciclina E/cdk2 fica livre para hiperfosforilar Rb e leva a de-repressão do gene para ciclina A (SHERR e ROBERTS, 1999). Logo, na presença de fatores de crescimento, a adesão celular promove a progressão da fase G1 primariamente pelo aumento da expressão de ciclina D e posteriormente pela redução da expressão e pela redistribuição de p21 e p27 (WELSH, 2004).

A proliferação celular é dependente, dentre outros estímulos, da ativação conjunta de receptores tirosina quinase (RTK), induzida por fatores de crescimento, e de integrinas, induzida pela adesão à proteínas da MEC, sendo que esta regulação é restrita à indução da fase G1. Uma vez ativados, a partir da formação de um "cross-talking" entre diferentes cascatas de sinalização inicia-se um programa de expressão gênica e regulação de proteínas requeridas para a progressão da fase G1 e a transição entre G1/S do ciclo celular (SHERR, 1996). Este controle é mediado por um complexo transcricional formado por (i) família E2F de fatores transcricionais; (ii) proteínas da família Rb; (iii) enzimas de remodelagem da cromatina, como as deacetilases de histonas (HARBOUR & DEAN, 2000).

A via clássica da MAPK mediada por Erk1/2 (**Figura 2**) é o componente mais estudado da via regulatória promovida tanto pelos fatores de crescimento quanto pelas integrinas. A atividade de ERK em células aderidas à MEC na ausência de fatores de crescimento rapidamente retorna à linha basal, sendo que esta breve ativação, entretanto, não é suficiente para induzir a síntese de DNA (CHEN, 1994; MORINO, 1995). Mais uma vez, a interação entre células e componentes da MEC mostra-se importante sobre a proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (HANKS e POLTE, 1997; DANEN; YAMADA, 2001; ALAHARI et al., 2002; REENSTRA et al, 2002; JULIANO, 2003).

Erk1/2 consistem em um subgrupo da família da MAPK, a qual regula processos como proliferação, diferenciação e apoptose (PIMIENTA, 2007). Uma das principais

Na sequência da cascata de sinalização, Ras interage diretamente com as quinases da família Raf (a-Raf, b-Raf e c-Raf). A ativação de Raf é um processo dinâmico que envolve desde a localização na membrana até ciclos de fosforilação e desfosforilação, além de interação com outras proteínas. Raf apresenta-se constitutivamente no citosol na forma inativa sendo que seu domínio N-terminal age como um autoinibidor da porção C-terminal, a qual tem a função quinase. Para a estabilização do estado de autoinibição, Dímeros 14-3-3 ligam-se a sítios de fosforilação em ambas as regiões, C-terminal e N-terminal.

Após a ativação de RTK, Raf é recrutado para a membrana plasmática via Ras, que induz a liberação do dímero 14-3-3 da porção N-terminal, promovendo a fosforilação do domínio que apresenta a atividade quinase, estabilizando a conformação ativa de Raf. Recentemente, verificou-se que a ativação de Ras também induz a heterodimerização de B-Raf e C-Raf, o que contribui para a ativação de C-Raf (GARNNETT, 2005; RUSHWORTH, 2006), porém, ainda não se sabe se a heterodimerização influencia na ativação de B-Raf, ou se A-Raf também é capaz de se apresentar nessa conformação. Uma vez ativado, Raf é capaz de dar continuidade a cascata de sinalização a partir da fosforilação em sítios específicos de MEK que consequentemente fosforila Erk (ALESSI, 1994; MANSOUR, 1994, ZHENG, 1994). Existem 3 membros do grupo de MEK: MEK1, MEK 2 e MEK3, cuja ativação envolve a fosforilação de resíduos de serina (ALESSI, 1994). MEKS são proteínas quinases extremamente seletivas que reconhecem a forma nativa de Erk e são capazes de ativá-la a partir da fosforilação de resíduos de tirosina e treonina.

Outra forma de ativação de Erk1,2 é a partir das integrinas (**Figura 2**). Múltiplos mecanismos de ativação de Erk via integrinas foram propostos. Um dos mecanismos depende da ativação de FAK (quinase de adesão focal) a partir de um mecanismo não totalmente esclarecido; outro depende da ativação GTPases da família Rho. A partir de FAK, muitas vias já foram descritas até a ativação de Erk. A autofosforilação de FAK na Tyr³⁹⁷ cria um sítio de ligação para Src que posteriormente pode fosforilar paxilina e p130^{Cas} de forma a recrutar outras proteínas intermediárias e induzir por fim Ras-Raf-MEK-Erk (GUAN, 1997; PARSONS e PARSONS, 1997). Ainda, Src pode fosforilar FAK

na Tyr⁹²⁵, criando um sítio de ligação para Grb2 e Sos, novamente direcionando para a ativação da cascata Ras-Raf-MEK-Erk (SCHLAEPFER et al, 1994). Outra via decorre da ativação de PI(3)K a partir de FAK (TAMURA et al, 1999); PI(3)K pode ativar Erk agindo como uma proteína quinase (BONDEVA et al, 1998) ou através da modulação da atividade de Sos a partir da produção de fosfatidilinositol -3,4,5-trifosfato (RAMEH et al, 1997). Em contrapartida, diversos estudos já demonstraram a ativação de Erk independente de FAK a partir de Shc (WARY et al, 1996; 1998). Certas integrinas, como VLA-5, encontram-se ligadas a quinase da família Src, a proteína Fyn, a partir da associação com a caveolina-1. Com a associação entre a integrina e seu ligante, Fyn é ativada e recruta Shc, formando um "link" com Grb2-Sos-Ras-Raf-Mek-Erk (WARY, 1998) (**Figura 2**).

Adesão celular à fibronectina também leva a ativação das GTPases da família Rho, Rac e Cdc42, a partir das GEF ("guanina exchange factor") Vav1 e Sos (LIU e BURREDGE, 2000; NIMNUAL et al, 1998). Os efetores de Rac e Cdc42, as PAKs (p21-activated protein kinases"), estão envolvidas na ativação de Erk via integrinas, uma vez que são capazes de ativar MEK1 e Raf (FROST et al, 1997; KING et al, 1998; CHAUDHARY et al, 2000). Ainda, as integrinas regulam a atividade de PAK de uma forma alternativa: a adesão mediada por integrinas suprime a atividade de PKA ("cAMP-dependent protein kinase") cuja função de serina/treonina quinase é capaz e inibir PAK (HOWE e JULIANO, 2000). Enquanto Cdc42 e Rac são ativados a partir da adesão celular à fibronectina, a atividade de Rho também aumenta levando a formação de fibras de actina e de "clusters" de integrinas e proteínas acessórias. A ativação de Rho é importante para a progressão do ciclo celular, uma vez que a redução da atividade de ciclina E/cdk2 induzida pela dissociação da ligação entre fibronectina - integrina está associada com a redução de Rho. Ainda, a inibição de Rho, Rac e Cdc42 pode inibir a progressão da fase G1 de células aderentes (OLSON, 1995; DANEN, 2000), a partir da redução dos níveis de ciclina D e do aumento de p21 (OLSON, 1998; DANEN, 2000). Além de modular a expressão de ciclina D e de p21, as estruturas reguladas por Rho (as fibras de actina) permitem a geração de uma tensão mecânica envolvida na regulação do formato celular, o que é de grande importância para a sobrevivência e a proliferação celular (CHEN et al, 1997).

A estimulação promovida pelos fatores de crescimento e pela adesão celular induz a célula a sair do estado de repouso (G0) e entrar no ciclo celular. No início da fase G1, ciclinas-D (D1, D2 e D3) reúnem-se em um complexo de holoenzimas com uma ou duas subunidades catalíticas, as quinases dependentes de ciclinas (Cdk), Cdk4 e Cdk6. Estas seis holoenzimas exibem função bioquímica similar e atuam fosforilando a família de proteínas Rb (retinoblastoma). Persistindo a estimulação mitogênica ocorre uma progressiva acumulação de quinases dependentes de ciclinas-D dentro do núcleo celular. Aqui, o complexo ciclinaE-Cdk2 também colabora para fosforilar os membros da família Rb, p107 e p130, facilitando assim a entrada na fase S (SHERR, 2002).

A proteína Rb é uma molécula abundante no núcleo de células de mamíferos, independente da fase do ciclo em que a célula esteja, ligando-se a muitas outras proteínas, incluindo proteínas regulatórias de genes, mas sua capacidade de ligação depende do seu estado de fosforilação. Quando Rb está desfosforilada, liga-se a uma série de proteínas regulatórias que promovem a ativação de genes relacionados à proliferação celular, mantendo-os isolados e fora de ação. A fosforilação de Rb faz com que haja a liberação destas proteínas, favorecendo a transcrição desses genes promovendo, assim, o ciclo celular. Os complexos de proteínas quinases (cdk-ciclina) impedem a inibição exercida por Rb em proteínas regulatórias, pela fosforilação de múltiplas serinas e treoninas de Rb. Assim, as células, então, ultrapassam o ponto G1 e iniciam a síntese de DNA. Em células que estão proliferando a fosforilação da proteína Rb aumenta e diminui em cada ciclo: aumenta no final de G1, permanece elevada em S e G2 e diminui até um estado desfosforilado assim que a célula entra em mitose (LEWIN, 1996; KEENAN et al., 2003).

As proteínas Rb, p107 e p130 ligam-se a membros da família E2F de fatores de transcrição que são essenciais para a replicação de DNA (DYSON, 1998; NEVINS, 2001; TRIMARCHI; LESS, 2002). Complexos entre membros da família Rb e vários E2Fs ativamente reprimem a expressão gênica de deacetilases de histonas (HDACs) e outros fatores de remodelamento de cromatina em resposta promovida por E2F (HARBOUR; DEAN, 2000; RAYMAN et al., 2002; OGAWA et al., 2002). Entretanto, fosforilação de membros da família Rb mediada por Cdk-ciclina, previne a associação dela com HDACs e

E2F, e capacita a expressão de genes E2F dependente. Portanto, a atividade de membros da família Rb hipofosforilados bloqueiam a passagem da célula de G1 para fase S, por inibir o programa transcricional de E2F (SHERR, 2002). Rb somente é capaz de bloquear a atividade de E2F quando está hipofosforilado e este estado de fosforilação é regulado pelos complexos ciclinas-D/Cdk4, 6 e ciclina-E/Cdk2 em G1 (EWEN et al., 1993; SHERR et al., 1996; LUNDBERG; WEINBERG, 1998). Através da fosforilação de Rb, uma importante função de ciclina-D/Cdk4 é regular o acesso de ciclina-E para o seu sítio de fosforilação em Rb. Esta fosforilação inicial de Rb promovida por ciclina-D/Cdk4 também permite o rompimento da ligação com HDAC, acabando assim com a repressão do gene de ciclina-E e permitindo a progressão para fase S (ZHANG et al., 2000). Após a fosforilação inicial de Rb por ciclina-D/Cdk4,6, o complexo ciclina-E/Cdk2 intensifica esta fosforilação de Rb proporcionando a transição de G1 para S. A atividade das quinases dependentes de ciclina D e ciclina E é controlada por agentes da família "Cip/Kip" de inibidores de Cdk, que incluem p27, p21 e p53 (ROBERTS, 1999). Quinases dependente de ciclinas D também são inibidas por proteínas de outra família, a Ink4, que incluem p15, p16, p18 e p19 (BLAIN et al., 1997; RUAS; PETERS, 1998; SHERR; ROBERTS, 1999; ROUSSEL, 1999; ORTEGA et al., 2002). As proteínas p27 e p21 são inibidoras de complexo ciclina-E/Cdk2 mas, *in vivo*, são pouco efetivas no bloqueio da atividade enzimática de ciclinaD1-Cdk4 (SOOS et al., 1996; BLAIN et al., 1997). Na realidade, a estabilidade e a retenção nuclear de complexo ciclinaD1-Cdk4 é facilitada pela associação física com Cip/Kip p27 (LABAER et al., 1997; CHENG et al., 1999; ALT et al., 2002; MURAOKA et al., 2002).

Em células em estágio quiescentes (G0), a baixa quantidade de ciclina D1 impede a formação do complexo ciclinaD1-Cdk4 e altos níveis de p27 suprime a atividade do complexo ciclinaE-Cdk2. A estimulação mitogênica induz a síntese de ciclina D1 a qual se associa a Cdk4, degradando p27 e ativando ciclinaE-Cdk2. Ambas quinases dependentes de ciclinas da fase G1 podem colaborar fosforilando e inativando Rb aproximando as células da transição G1/S (SHERR, 2002).

1.5. Recuperação nutricional

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde tem desenvolvido protocolos de recuperação de indivíduos, principalmente crianças, em estado severo de desnutrição (WHO, 1999). Tais protocolos instituem três fases de tratamento: estabilização, na qual são tratados os eventuais casos de infecção e realizada a rehidratação do indivíduo; reabilitação nutricional, na qual são restabelecidos os nutrientes em termos qualitativos e quantitativos; acompanhamento e prevenção, de forma a evitar o retorno do quadro de desnutrição. Os parâmetros utilizados para a avaliação do estado nutricional consistem no acompanhamento de valores antropométricos, de dados bioquímicos e hematológicos.

De maneira geral, os relatos na literatura referentes ao processo de renutrição referem-se ao aumento do peso corpóreo, porém, também são descritos relatos de que as lesões anatômicas desaparecem, com a normalização das funções, de que há correção das alterações bioquímicas plasmáticas e acúmulo normal das reservas de nutrientes (OLIVEIRA e MARCHINI, 1998). Contudo, muitos dados da literatura mostram-se controversos, principalmente em relação ao sistema imunológico. É sabido que a desnutrição pode acarretar em um comprometimento da resposta imune inata, principalmente em relação à funcionalidade de macrófagos. Estudos estabeleceram que na desnutrição há redução da produção de citocinas inflamatórias, fato que contribuiria para o aumento da susceptibilidade às infecções (GRIMBLE, 1989; FOCK et al., 2007). Nagata et al. (1999) encontraram um aumento na capacidade de produção de citocinas durante a renutrição. Walrand et al. (2000) relatam um aumento de TNF- α após o processo de recuperação nutricional. Já Nova et al. (2002) mostraram uma diminuição na produção de TNF- α e IL-6 e um aumento na produção de IL-1 β em indivíduos desnutridos, sendo que esta situação não foi revertida após 1 mês de renutrição.

Muitos estudos demonstram que o processo de recuperação nutricional é eficaz na reversão das alterações metabólicas observadas na desnutrição (CAREGARO et al., 2001; NOGUCHI, 2000; PALACIO et al., 2002; SOLIMAN et al., 2000). Em relação ao sistema hematológico, poucos estudos avaliam a recuperação nutricional. VAISMAN

(2004) demonstra que as alterações também são revertidas, sendo observado um aumento nos precursores hemopoéticos e nos níveis de eritropoetina. Contudo, as alterações estruturais observadas nos tecidos hemopoéticos de camundongos desnutridos ainda não foram completamente avaliadas, sendo que novos estudos são necessários para corroborar a reversão das alterações no quadro hematológico.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista as alterações no microambiente medular e a pancitopenia sanguínea encontrada em situação de desnutrição protéica, pretendemos avaliar os efeitos desta sobre o ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoética da medula óssea de camundongos. Ainda, nos propusemos a verificar se as possíveis alterações são revertidas com a recuperação nutricional.

Para atingir estes objetivos realizamos os seguintes ensaios:

- Caracterizar o quadro de pancitopenia dos animais desnutridos, avaliando hemograma, mielograma e esplenograma;
- Quantificar IGF-1, insulina, TGF- β e corticosterona plasmáticos para avaliação do estado nutricional;
- Quantificar células tronco, Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺, por citometria de fluxo;
- Avaliar os efeitos da DP sobre o ciclo celular da população de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea de camundongos utilizando Iodeto de Propídeo (PI) e Laranja de Acridina (LA);
- Avaliar os efeitos da DP na expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular por western blotting;
- Avaliação de fibronectina na medula óssea esternal por imunohistoquímica;
- Avaliar os efeitos da DP na expressão de receptores para a Fibronectina, VLA-4 e VLA-5, em células CD34⁺ e em células Lin⁻ por citometria de fluxo;
- Avaliar os efeitos da DP na expressão dos receptores para fatores de crescimento, CD117, CD123 e CD126, em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) por citometria de fluxo;
- Avaliar, quantitativamente, as células estromais a partir do ensaio de CFU-F e quantificar as citocinas produzidas;
- Avaliar o efeito, *ex vivo*, de fatores de crescimento hemopoéticos sobre a atividade proliferativa da população de células tronco/progenitoras, em sistema de cultura de células em meio líquido;

- Avaliar, *ex vivo*, a interação de células tronco/progenitoras hemopoéticas com as proteínas da matriz extracelular e o seu efeito sobre a proliferação em sistemas de cultura sobre superfície recoberta com fibronectina;
- Avaliar a via de sinalização de ERK1/2, induzida por fatores de crescimento e integrinas;
- Avaliar os parâmetros hematológicos após a recuperação nutricional;
- Quantificar células tronco, Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺, por citometria de fluxo após a recuperação nutricional;
- Avaliar o ciclo celular da população de células tronco/progenitoras hemopoéticas da medula óssea em um modelo de recuperação nutricional;
- Avaliar os efeitos da recuperação nutricional na expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular por western blotting.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem **C57Bl/6J**, machos, de dois a três meses de idade, oriundos de colônias do biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Este projeto foi submetido e aprovado, pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEEA nº 92 e 242)

3.2. Indução da desnutrição

Os animais, previamente pesados, foram separados em gaioleiros metabólicos (ZUCAS *et al.*, 1969), sendo mantidos sob temperatura ambiente de 22 a 25 °C, ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luzes acesas as 7:00 horas da manhã), umidade de 55 ± 10%. Durante período de adaptação às condições do gaioleiro metabólico, todos os animais receberam ração controle contendo 12% de proteínas, para em seguida serem separados em dois grupos: **nutrido ou controle (C)**, que permaneceram recebendo a ração controle; e **desnutrido (D)**, que passaram a receber ração contendo 2% de proteínas (Du *et al.*, 2000). Os animais de ambos os grupos tiveram livre acesso à água e as rações.

Ambos os grupos permaneceram sob as mesmas condições ambientais, sendo avaliado o estado nutricional dos animais pela determinação do peso corporal e do consumo de água e de ração a cada 48 horas e pela determinação das concentrações séricas de proteínas totais e albumina. Após 5 semanas de indução do processo de desnutrição, os animais de ambos os grupos foram sacrificados para a obtenção das amostras biológicas.

3.3. Indução do processo de recuperação nutricional

Paralelamente, um segundo grupo de animais utilizado para a avaliação da recuperação nutricional. Após o período de desnutrição os animais do grupo desnutrido passaram a receber ração normoprotéica por um período de 4 semanas, sendo denominado grupo **renutrido (R)**, após o qual foram sacrificados juntamente com seu respectivo grupo **controle (CR)** para a realização das análises (**figura 3**)

3.4. Preparo das rações

As rações, na forma granulada, foram preparadas em nosso laboratório, utilizando a caseína comercial (LABSYNTH®) como fonte de proteína. As rações eram isocalóricas, diferindo apenas na concentração protéica, definida pela quantidade de caseína adicionada (**Tabela 1**). Pelo fato de, aproximadamente, 80% do fosfato provir da caseína, a adição de menor quantidade de caseína na ração hipoprotéica diminuiria a quantidade disponível do mesmo. Portanto, foram feitas correções na composição da mistura salínica para corrigir essa deficiência (**Tabela 2**). Como base para a preparação das rações foi utilizada a AIN-93M (REEVES *et al.*, 1993).

3.4.1. Avaliação das concentrações protéicas das rações

A concentração protéica das rações foi determinada pelo método de micro-Kjedahl, segundo normas do Instituto Adolfo Lutz, 1967 e realizadas no Laboratório de Bioquímica da Nutrição (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), pela sra Ivanir Pires e sob responsabilidade do Prof. Dr. Júlio Tirapegui.

¹ Grupo I: grupo controle

² Grupo II: grupo desnutrido

³ Coleta de material biológico para a realização das análises

Figura 3: esquema do processo de recuperação nutricional. Por Amanda Rabello Crisma.

Tabela 1: Composição das Rações experimentais

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

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

* Vide Tabela 2

** Vide Tabela 3

Tabela 2: Composição da mistura salínica

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

Composição salínica das misturas para as rações controle e hipoprotéica. Foram utilizados 350g da mistura salínica para cada 10kg de ração preparada. Mix=Mistura

Tabela 3: Composição da mistura vitamínica

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

Composição vitamínica das misturas para as rações controle e hipoprotéica. Foram utilizados 100g da mistura vitamínica para cada 10kg de ração preparada. Mix=Mistura

3.5. Obtenção de amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção do plexo axilar, em camundongos previamente anestesiados com 10mg/Kg de peso de cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer) e 100mg/Kg de peso de cloridrato de cetamida (Ketamina®, Cristália).

Amostras sanguíneas, coletadas sem anticoagulante, de animais de ambos os grupos foram utilizadas para obtenção do soro e utilizadas para as dosagens de proteínas totais e albumina sérica. O soro foi separado por centrifugação (2000xg por 15 minutos) a 4°C, congelado em alíquotas a -40°C e, posteriormente, utilizado para a dosagem das proteínas totais e albumina sérica.

Amostras sanguíneas coletadas com o anticoagulante EDTA 10% foram utilizadas para a realização do hemograma e contagem de reticulócitos.

3.6. Avaliação das concentrações de proteínas totais e albumina séricas

A determinação de proteínas totais foi feita pelo método do Biureto (GORNALL, 1949) e a determinação de albumina realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (RODKEY, 1965; DOUMAS, *et al.*, 1971), sendo utilizado "kit" s comerciais da Labtest®, a partir de amostras de soro. As amostras foram processadas em duplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader - Bio-Tek Instrumentals, Inc).

3.7. Hemograma e contagem de reticulócitos

A partir de sangue total foram realizados o hemograma e contagem de reticulócitos, de acordo com as técnicas utilizadas no Laboratório de Hematologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (DACIE, 1995). A dosagem de hemoglobina foi realizada pelo método da cianometahemoglobina e a determinação do volume hematócrito pelo método de Strumia. A contagem de eritrócitos e de leucócitos foi realizada em hemocitômetro de Neubauer, utilizando

como diluentes os líquidos de Gower e Turk, respectivamente. Para a contagem dos reticulócitos o sangue foi imediatamente processado, sendo corado com corante supravital azul de Cresil Brilhante e os reticulócitos contados nas extensões preparadas. A contagem diferencial dos leucócitos foi feita em extensões sanguíneas preparadas imediatamente após a coleta e coradas pelo corante de May-Grunwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947). As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, contando-se no mínimo, 100 leucócitos.

3.8. Avaliação de IGF-1, TGF- β , insulina e corticosterona séricos

Para a obtenção de amostra para as determinações de insulina, TGF- β , corticosterona e IGF-I, os animais foram mantidos em jejum por 8 horas. Após este período, foram sacrificados por decapitação no período da manhã (8 horas da manhã) para coleta do sangue. Este foi coletado sem anticoagulante e deixado em repouso por 2 horas à temperatura ambiente para retração do coágulo. Passado este período de tempo o sangue foi centrifugado (2000xg durante 20 minutos, a 4°C) para a obtenção do soro. Este foi armazenado em "freezer" a -80°C, onde permaneceu até a realização das análises.

Os ensaios foram realizados por imunoensaio tipo ELISA sendo que para a quantificação de IGF-1 utilizou-se o "kit" Mouse IGF-1 Quantikine ELISA (R&D SYSTEM); para insulina utilizou-se o "kit" Rat/Mouse Insulin ELISA (LINCO); para TGF- β utilizou-se o "kit" Mouse TGF- β Quantikine ELISA (R&D SYSTEM). Para corticosterona realizou-se o ensaio do tipo ELISA indireto utilizando-se o "kit" Corticosterone EIA (IDS). Em um leitor de placas (EL800 Universal Microplate Reader - Bio-Tek Instrumentals, Inc) foram obtidas as absorbâncias a 450 e 570nm.

3.9. Obtenção de células do baço

Após o processo de desnutrição os animais dos grupos controle e desnutrido foram anestesiados conforme descrito no item 3.5, exsanguinados, sacrificados e executado o deslocamento cervical. O baço, mantido em meio de cultura Iscove's (Sigma®, Chemical

Company, USA) gelado contendo EDTA 10 %, teve sua cápsula rompida em uma de suas extremidades com o auxílio de duas agulhas dobradas em "L" e fixadas em seringas. As células esplênicas foram retiradas pelo método de dissociação mecânica.

3.9.1. Esplenograma

A partir das amostras da suspensão total de células do baço e imediatamente após a coleta, foram preparadas lâminas por citocentrifugação (Incibrás®, Brasil). As lâminas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947), e para a análise diferencial foram contadas no mínimo 300 células ao microscópio óptico. A contagem total de células foi realizada em hemocitômetro de Neubauer após diluição das amostras da suspensão celular com líquido de Turk.

3.10. Obtenção de células da medula óssea

Após o processo de desnutrição os animais dos grupos controle e desnutrido foram anestesiados conforme descrito no item 3.5, exsanguinados, sacrificados e executado o deslocamento cervical. As células da medula óssea foram obtidas por meio de lavagem da cavidade medular de ambos os fêmures e tíbias com meio Iscove's (SIGMA®, CHEMICAL COMPANY, USA). A suspensão celular foi cuidadosamente homogeneizada e mantida imersa em gelo até a realização do mielograma e para a obtenção das células tronco/progenitoras hemopoética (Lin⁻) tempo que não ultrapassou 1 hora após a coleta.

3.10.1. Mielograma

A partir das amostras da suspensão total de células da medula óssea e imediatamente após a coleta, foram preparadas lâminas por citocentrifugação (Incibrás®, Brasil). As lâminas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa, modificado (ROSENFELD, 1947), e para a análise diferencial foram contadas no mínimo 300 células ao microscópio óptico. A contagem total de células foi realizada em

hemocitômetro de Neubauer após diluição das amostras da suspensão celular com líquido de Turk.

3.10.2. Separação das células Lin⁻ (depleção negativa) por método imunomagnético

As células tronco/progenitoras hemopoéticas foram obtidas por depleção negativa utilizando método imunomagnético (Lineage cell depletion "kit", Milteny Biotec®). Após coleta das células da medula óssea com meio Iscove's sem soro bovino e contagem em hemocitômetro de Neubauer, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 300xg à 4°C e as células foram ressuspensas em 1mL de meio. Adicionou-se 2mL de tampão de lise (NH₄Cl 150mM, NaHCO₃ 10mM e EDTA 0,1mM, pH 7,4) e após 5 minutos de incubação no gelo, foram adicionados 5mL de meio. A suspensão foi novamente centrifugada por 10 minutos a 300xg à 4°C e as células ressuspensas em 40μL de PBS, pH 7,2 (Solução tampão fosfato contendo 2mM de EDTA; 0,5 % de BSA; 0,01 % de azida sódica). A essa suspensão foi adicionado 10μL do "coquetel" de anticorpos (anticorpos monoclonais biotina-conjugado, anti-CD5, CD45R (B220), CD11b, Anti-Gr-1 (Ly-6G/C) e Ter-119), seguido de incubação a 4 - 8°C e sob o abrigo da luz, por 20 minutos. Após esse período foram adicionados 30μL de PBS, pH 7,2 e 20μL de "microbeads" anti-biotina, sendo a suspensão novamente incubada por 20 minutos, a 4 - 8°C e sob o abrigo da luz. As células foram lavadas com a adição de 2mL de PBS, pH 7,2, sendo a suspensão centrifugada a 300xg por 10 minutos. As células foram, então, ressuspensas em 500μL de PBS, pH 7,2 e a seguir, a suspensão de células marcadas foi colocada sobre a coluna de separação tipo LS MACS Columns (Milteny Biotec®), previamente tratada com PBS, pH 7,2 e mantida em campo magnético, e, apenas sob ação da gravidade, colheu-se o eluente. A coluna foi lavada três vezes com 3mL de PBS pH 7,2, recolhendo-se o eluente de todas as lavagens. Na suspensão assim obtida estavam contidas as células hemopoéticas Lin⁻, sendo que a contagem e a viabilidade celular foi avaliada com o azul de tripan 1% em hemocitômetro de Neubauer.

3.10.3. Caracterização imunofenotípica das células Lin⁻

As suspensões de células obtidas conforme descrito no item 3.10.2 foram centrifugadas por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspense em 400µL de PBS, pH 7,2 e 2 a 5µL de anticorpo para cada 1×10^6 células/mL (**Tabela 4**) sendo incubado por 20 minutos, em temperatura de 20-25°C. Também foi feito como controle, a marcação para o isotipo de cada cadeia do anticorpo. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspense em 500µL de PBS e centrifugado por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. Repetiu-se a lavagem. Adicionou-se 400µL de PBS pH 7,2 e realizaram-se as aquisições em citômetro de fluxo. A fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo FACSCalibur® (BECTON DICKSON, San Jose, CA) em 488nm de excitação com íon argônio, utilizando-se o sistema CELLQuest® para análise.

3.11. Quantificação de células tronco, Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺, da medula óssea por citometria de fluxo

Após a separação das células Lin⁻ foram separadas 1×10^6 células as quais adicionou-se de 2 a 5µL de anticorpos anti-ckit (FITC) e anti-Sca1 (PE) (BD Biosciences) sendo a suspensão incubada por 20 minutos, em temperatura de 20-25°C. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspense em 500µL de PBS pH 7,2 e centrifugado por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. Também foi feito, como controle, a marcação para o controle isotópico de cada cadeia do anticorpo. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C, o sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspense em 500µL de PBS e centrifugado por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. Repetiu-se a lavagem. Adicionou-se 400µL de PBS pH 7,2 e realizou-se as aquisições em citômetro de fluxo. A fluorescência celular foi medida em

citômetro de fluxo FACSCalibur® (BECTON DICKSON, San Jose, CA) em de 488nm e excitação com íon argônio, utilizando-se o sistema CELLQuest® para análise.

3.12. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin⁻ utilizando iodeto de propídeo (PI) e RNase

Após a obtenção das células Lin⁻ foram separadas 1×10^6 células para a marcação com Iodeto de Propídeo (BD Biosciences Pharmigem). As células foram lavadas com PBS (solução de tampão fosfato pH 7,4) e posteriormente centrifugadas a 300xg por 10 minutos à 4°C. O sedimento celular foi ressuspenso em 400uL de uma solução contendo Iodeto de Propídeo, RNase e Triton-X100 (Solução tampão fosfato com 0,5µg/mL de Iodeto de Propídeo, 100µg/mL de RNase e 0,1% de Triton-X100) e analisadas por citometria de fluxo utilizando FACSCalibur® (BECTON DICKSON, San Jose, CA) em 488nm de excitação com íon argônio, utilizando-se o sistema CELLQuest® para análise.

3.13. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin⁻ utilizando Laranja de Acridina (LA)

Para 500µL de suspensão de células Lin⁻ contendo 2×10^6 células/mL, foram adicionados 0,4mL de solução ácida detergente (0,1% Triton X-100; 0,08N HCl; 1,5M NaCl). Após 15 segundos foi adicionado 1,2mL da solução de Laranja de Acridina 20 µM, pH 6,0. A avaliação do DNA e do RNA foi realizada no prazo de duas horas. A fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo utilizando FACSCalibur® (BECTON DICKSON, San Jose, CA) em 488nm e excitação com íon argônio e detecção em fluorescente verde ($530 \pm 20\text{nm}$) e vermelha ($>620\text{nm}$), utilizando-se o sistema CELLQuest® para análise. A intensidade da fluorescência verde é proporcional ao conteúdo de DNA, enquanto que a intensidade da fluorescência vermelha corresponde ao conteúdo de RNA (HSIEH *et al.*, 2002).

Tabela 4: Pannel de anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica das células Lin⁻

População Celular de Medula Óssea Murina	Anticorpos¹	Clone	Isotipo¹ (K de rato)	Fluorocromo
Célula Tronco	Anti-Sca-1	D7	IgG 2a	FITC ou PE
Células Progenitoras	Anti-CD34	8G12	IgG 1a	FITC ou PE
Linhagem Granulocítica	Anti-Gr-1	RB6- 8C5	IgG 2b	APC
Linhagem Linfóide B	Anti-B220	RA3- 6B2	IgG 2a	FITC
Linhagem Linfóide T	Anti-CD5	53 - 7.3	IgG 2a	APC
Linhagem Eritróide	Anti-Ter-119	Ter-119	IgG 2b	FITC
Progenitores multipotentes	Anti- CD11b	M1/70	IgG 2b	FITC

¹ BD Biosciences Pharmigem

3.14. Avaliação da expressão de proteínas regulatórias do ciclo celular de células Lin⁻ por western blotting

Após a separação, as células tronco/progenitoras hemopoéticas foram lisadas para a extração das proteínas totais. Cada 1×10^6 células tronco foi ressuspensa em 150 μ L de tampão RIPA[®] (25mM de TrisHCl pH 7,6, 150mM de NaCl, 1% de NP-40, 1% de deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, Pierce) gelado contendo inibidores de fosfatase e proteases (0,5mM de PMSF, 50mM de NaF, 10 μ g/mL de leupeptina e 10 μ g/mL de aprotinina) e mantida sob agitação vigorosa por 15 minutos a 4°C. A amostra foi, então, centrifugada a 14000xg por 15 minutos e ao sobrenadante, contendo as proteínas totais, foi adicionado tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 1M pH 6,8, 0,01% de azul de bromofenol, 10% de SDS, 50% de glicerol e 10% de mercaptoetanol) na proporção de 4 partes de amostra para 1 parte de tampão. A solução foi, então, aquecida em banho de água à 95°C por 5 minutos para desnaturar as proteínas e armazenada a -40°C até o uso. Uma pequena alíquota do sobrenadante foi separada antes da adição do tampão Laemmli para a quantificação de proteínas utilizando kit comercial (BCA[™] protein assay "kit", Pierce).

Após a quantificação das proteínas totais foi realizada eletroforese em SDS-PAGE, utilizando mini gel de poliacrilamida a 12%, sendo que 30 μ g de proteínas das amostras foram aplicadas em cada poço, juntamente com o padrão de peso molecular. A eletroforese foi executada a 100V em tampão de corrida (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 0,1% de SDS e pH 8,3) até que as amostras percorressem todo o gel. Imediatamente após a separação procedeu-se a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF (Millipore). A transferência foi realizada no sistema semi-seco (Amershan) com tampão de transferência (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 20% de metanol e pH 8,3) a 65mA por 60 minutos. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos e depois lavada com TBS (tampão Tris com 0,1% de Tween 20).

A membrana foi previamente tratada com tampão de bloqueio, solução de leite a 5% (TBS e leite em pó desnatado (Molico) a 5%), "overnight" a 4°C. A membrana foi, então,

lavada 3 vezes com TBS por 10 minutos e sob agitação a temperatura ambiente para depois ser incubada com o anticorpo primário anti-ciclina D1, anti-PCNA, anti-Cdk2, anti-Cdk4, anti-Cdc25a, anti-p27, anti-p21 e anti-p53 (BD Biosciences Pharmingen) em solução de leite a 1% (TBS e leite em pó desnatado (Molico)) por 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi novamente lavada da forma descrita anteriormente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase, BD Biosciences Pharmingen) em solução de leite 1% por 1 hora, a temperatura ambiente e sob agitação. Novamente a membrana foi submetida ao processo de lavagem e prosseguiu-se com a detecção por quimioluminescência utilizando o "kit" de revelação ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences) no equipamento ImageQuant 400 (GE, Healthcare). A análise foi realizada utilizando o programa ImageQuant TL.

3.15. Avaliação de fibronectina na medula óssea esternal por imunohistoquímica

Após os animais serem sacrificados, os esternos foram coletados e fixados em solução de formalina 10% pH 7,2, preparada imediatamente antes do uso, por 1 hora a temperatura ambiente e sob constante agitação. Após esse período, o material foi transferido para solução de ácido nítrico 10% por 3 horas, a temperatura ambiente e sob constante agitação, para a descalcificação. Por fim, os esternos foram lavados em água corrente por 1 hora e mantidos em álcool 95% por no máximo 24 horas até serem emblocados em parafina. Após a parafinização dos esternos, foram feitos cortes de aproximadamente 5µm. Os cortes foram, então, tratados para a desparafinização com xilol por 20 minutos, seguido de solução de xilol/álcool absoluto por mais 5 minutos. Os cortes foram progressivamente hidratados, primeiramente com álcool absoluto por 5 minutos, seguido de álcool 95% por 5 minutos e por fim, com álcool 70% por mais 5 minutos. Após a hidratação, os cortes foram lavados duas vezes com PBS (0,02M e pH7,2) por 5 minutos para serem incubados com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3% para o bloqueio da peroxidase endógena das células da medula óssea por 30

minutos em câmara escura. Novamente os cortes foram lavados 2 vezes com PBS por 5 minutos e incubados com solução de PBS contendo soro de cavalo (VECTASTAIN UNIVERSAL ABC KIT, Vector Laboratories) na diluição de 1:100 para bloquear as ligações inespecíficas. Após 45 minutos de incubação em câmara escura e úmida, foi retirado o excesso da solução de bloqueio e os cortes foram incubados com anticorpo primário anti-Fibronectina (DAKO) na diluição 1:400 em diluente para anticorpo (solução de PBS 0,02M pH 7,2, azida sódica 1%, albumina bovina 1%), sendo incubado overnight em câmara escura e a 4°C. Após esse período, os cortes foram lavados 2 vezes com PBS por 5 minutos para serem incubados com o anticorpo secundário biotinilado (VECTASTAIN UNIVERSAL ABC KIT, Vector Laboratories) na diluição 1:100 por 30 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. Novamente os cortes foram lavados 2 vezes com PBS por 5 minutos para serem incubados com estreptavidina-peroxidase (VECTASTAIN UNIVERSAL ABC KIT, Vector Laboratories) por 30 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. A reação foi revelada com DAB (0,05% de DAB) por 5 minutos sendo os cortes lavados 2 vezes com PBS por 5 minutos e contra-corados com hematoxilina de Harris. Por fim, os cortes foram desidratados (incubações subsequentes com álcool 70%, álcool 95% e álcool absoluto).

3.16. Avaliação da expressão de receptores de fibronectina, VLA-4 e VLA-5, em células CD34⁺ e em células Lin⁻ da medula óssea

A suspensão de células totais, obtida conforme descrito no item 3.10, foi centrifugada por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. Adicionou-se 2mL de tampão de lise (NH₄Cl 150mM, NaHCO₃ 10mM e EDTA 0,1mM, pH 7,4) e após 5 minutos de incubação no gelo, foram adicionados 5mL de meio. A suspensão foi novamente centrifugada por 10 minutos a 300xg em temperatura de 20-25°C. Foram separadas 1x10⁶ células totais ou de células Lin⁻ obtidas conforme o item 3.10.2 e adicionou-se de 2 a 5µL de anticorpos anti-VLA-4 e anti-CD34 ou anti-VLA-5 e anti-CD34 (BD Biosciences) sendo a suspensão incubada por 20 minutos, em temperatura de 20-25°C. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-

25°C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 500µL de PBS pH 7,2 e centrifugado por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. Também foi feito, como controle, a marcação para o controle isotópico de cada cadeia do anticorpo. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C, o sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 500µL de PBS e centrifugado por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. Repetiu-se a lavagem. Adicionou-se 400µL de PBS pH 7,2 e realizaram-se as aquisições em citômetro de fluxo. A fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo FACSCalibur® (BECTON DICKSON, San Jose, CA) em de 488nm e excitação com íon argônio, utilizando-se o sistema CELLQuest® para análise.

3.17. Avaliação da expressão de receptores para fatores de crescimento, CD123 (IL3R), CD126 (IL6R) e CD117 (c-kit) de células Lin⁻ da medula óssea por citometria de fluxo

Após a obtenção das células Lin⁻ conforme o item 3.10.2, foram separadas 1×10^6 células sendo estas marcadas para c-kit (FITC) e IL3R (FITC)/IL6R (PE), utilizando de 2 a 5µL de anticorpos (EBiosciences). A suspensão foi mantida sob incubação a temperatura ambiente por 20 minutos ao abrigo da luz. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 500µL de PBS pH 7,2 e centrifugado por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. Também foi feito, como controle, a marcação para o controle isotópico de cada cadeia do anticorpo. Após esse período, a suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C, o sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 500µL de PBS e centrifugado por 10 minutos a 300xg, em temperatura de 20-25°C. Repetiu-se a lavagem. Adicionou-se 400µL de PBS pH 7,2 e realizaram-se as aquisições em citômetro de fluxo. A fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo FACSCalibur® (BECTON DICKSON, San Jose, CA) em de 488nm e excitação com íon argônio, utilizando-se o sistema CELLQuest® para análise.

3.18. Avaliação das células estromais da medula óssea: ensaio de CFU-F

As células da medula óssea dos camundongos foram obtidas por lavagem da cavidade femural utilizando meio DMEM contendo baixa concentração de glicose (Cultilab, Brasil) com 10% de soro bovino fetal em ambiente asséptico. Após a coleta, foi realizada a contagem da viabilidade celular com Azul de Tripán (0,1%), sendo que as amostras apresentaram mais de 95% de viabilidade. As células foram cultivadas em placas de 24 ou 96 poços, na concentração, respectivamente, de 1×10^5 e 1×10^4 células totais da medula óssea por poço, utilizando meio DMEM contendo baixa concentração de glicose (Cultilab, Brasil) com 10% de soro bovino fetal. Após 3 dias de cultivo a 37°C e a 5% de CO₂, os poços foram lavados para a retirada das células não aderentes. Na sequência foi realizada a troca de 50% do meio de cultura a cada 5 dias. Para as células cultivadas em placas de 96 poços foi realizado o ensaio de Cristal Violeta (conforme item 3.19.2) nos dias 3, 9, 15 e 21 após o plaqueamento. Para as células cultivadas em placas de 24 poços, foi realizada a coleta do sobrenadante para a quantificação de citocinas nos dias 3, 9, 15, 21, 27 e 35 após o plaqueamento das células.

3.18.1. Quantificação de citocinas produzidas por células estromais a partir da cultura de CFU-F

As citocinas foram quantificadas por ensaio tipo ELISA, utilizando "kits" comerciais da R&D Systems. Foram quantificadas as seguintes citocinas: IL6, IL3, SCF, GM-CSF, IL10, IL1- β , TNF- α , IFN- γ . Todas as amostras foram analisadas em duplicatas, sendo as concentrações obtidas a partir de uma curva padrão. Em um leitor de placas (EL800 Universal Microplate Reader - Bio-Tek Instrumentals, Inc) foram obtidas as absorbâncias a 570 e 450nm.

3.19. Quantificação de proteínas da via de sinalização de MAPK e FAK de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea por western blotting

A obtenção e o processamento das amostras foram realizados conforme o item 3.13. A marcação foi realizada utilizando anti-fosfoERK1 (p42)/anti-fosfoERK2 (p44), anti-Rho A, anti-fosfoRac/cdc42 e anti-fosfoFAK (Cell Signaling) sendo que para a marcação do anticorpo secundário foi utilizado anti-IgG de coelho ou camundongo conjugado com peroxidase (Cell Signaling). A aquisição e a análise dos resultados foram realizadas conforme o item 3.14.

3.20. Ensaio de proliferação das células Lin⁻ frente a fatores de crescimento (cultura líquida) e sobre uma matriz de fibronectina

Após a coleta, a suspensão de células totais da medula óssea foi centrifugada por 10 minutos a 300xg a 4°C e o sedimento ressuspensão em 1mL de meio Iscove's. Foram adicionados 2mL de tampão de lise (NH₄Cl 150mM, NaHCO₃ 10mM e EDTA 0,1mM) para lise das hemácias e após 5 minutos de incubação no gelo, foram adicionados 5mL de meio. A suspensão foi novamente centrifugada por 10 minutos a 300xg à 4°C e o sedimento ressuspensão em meio Iscove's. Após determinação da viabilidade celular com azul de tripan 1%, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços (SARTDEST®, EUA) - 5x10⁶ células/poço - em meio Iscove's suplementado com 0,5% de soro bovino fetal por 24 horas (para a adesão das células estromais e sincronização das células em G0) a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após essa incubação, procedeu-se a separação das células Lin⁻, conforme item 3.10.2. Previamente, placas de 96 poços (SARTDEST®, EUA) foram sensibilizadas com fibronectina (FN) obtida de plasma bovino (GIBCO®) na concentração de 1μg/poço (concentração definida em padronizações prévias) ou albumina bovina (BSA, Sigma® Chemical Company, USA), e incubadas por 3 horas a 37°C, em atmosfera úmida e contendo 5% CO₂ e posteriormente mantidas, "overnight" a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS e incubadas com albumina bovina na

concentração de 1mg/poço, por 2 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% CO₂. As placas foram lavadas com PBS e mantidas a temperatura ambiente para a secagem. Foram plaqueadas, em triplicata, 1x10⁴ células Lin⁻/poço em meio Iscove's suplementado com 10% de soro bovino fetal e fatores de crescimento (IL3 - 10ng/mL; IL6 - 10ng/mL; SCF - 50ng/mL; Sigma® Chemical Company, USA), em poços recobertos com fibronectina ou BSA, por 3 e 5 dias a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Como controle negativo, foram plaqueadas, em triplicata, 1x10⁴ células Lin⁻/poço em meio Iscove's suplementado com 10% de soro bovino fetal, porém sem fatores de crescimento, em poços sensibilizados somente com BSA. Após esse período, realizou-se o ensaio de viabilidade celular e de adesão celular. O ensaio de cultura líquida foi considerado aquele em que as células foram cultivadas sobre o poço sensibilizado com BSA (superfície não aderente) na presença de fatores de crescimento.

3.20.1. Viabilidade celular: ensaio de MTT

Utilizando células da medula óssea, foi feita uma curva padrão utilizando as seguintes concentrações de células, em triplicata:

- 0 cél/poço (branco)
- 32 x 10³ cél/poço
- 64 x 10³ cél/poço
- 128 x 10³ cél/poço
- 256 x 10³ cél/poço
- 512 x 10³ cél/poço
- 1024 x 10³ cél/poço

Posteriormente, tanto nas amostras quanto na a curva padrão foram adicionados 10µL da solução de MTT (brometo de metiltiazolildifenil-tetrazolium) em cada poço (Sigma® Chemical Company, USA) na concentração de 5mg/mL, sendo as placas novamente incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, por 4 horas. Após esse período de incubação, foram adicionados 100µL de solução de SDS 10% em HCl 0,01M em cada poço, seguido de nova incubação por 12-48 horas a 37°C em atmosfera

úmida contendo 5% de CO_2 . Em um leitor de placas, (EL800 Universal Microplate Reader - Bio-Tek Instrumentals, Inc) foram obtidas as absorbâncias a 550nm.

3.20.2. Adesão celular: ensaio de Cristal Violeta

Após 3 e 5 dias de cultivo das células Lin- sobre uma matriz de FN, as placas foram lavadas durante 10 minutos sob agitação com PBS por 4 vezes. As células aderidas sobre a matriz de fibronectina foram fixadas com solução de paraformaldeído 1%, por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse período, foi acrescentado 50 μ L de Cristal Violeta 0,5% (MERCK DO BRASIL) e as células foram mantidas por mais 10 minutos. As placas foram novamente lavadas durante 10 minutos sob agitação com PBS, por 4 vezes e, após a secagem dos poços, foi adicionado 50 μ L de solução de citrato de sódio 0,1M pH 4,2. Em um leitor de placas (EL800 Universal Microplate Reader - Bio-Tek Instrumentals, Inc) foram obtidas as absorbâncias a 550nm.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cada conjunto de dados, foi realizado o teste de normalidade. Após a verificação de que os dados seguiam uma distribuição normal, todos os resultados foram analisados por teste "t" sendo considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism 4.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação das concentrações protéicas das rações

As rações controle e hipoprotéica utilizadas neste trabalho foram avaliadas quanto à concentração de proteínas pelo método de micro-Kjedahl, apresentando resultados dentro do esperado: $12,89\% \pm 0,39$ (n=7); $2,58\% \pm 0,10$ (n=8), respectivamente.

5.2. Avaliação do estado nutricional

Verificou-se que os animais do grupo desnutrido tiveram aumento significativo do consumo de água e de ração, com consumo reduzido de proteínas (**Figura 4A, 4B e 4C**), mas não houve um ganho de massa corpórea quando comparado aos animais do grupo controle (**Figura 5A e 5B**). Em média, a perda de peso dos animais desnutridos ao final do período de indução foi de $2,1\% \pm 1,0$ (média + SEM) enquanto que o ganho de peso dos animais controle durante o mesmo período foi de $27,4\% \pm 1,5$ (média + SEM).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, os animais desnutridos apresentaram valores séricos de proteínas totais e de albumina significativamente menores que os animais do grupo controle (**Tabela 5**), indicando o quadro de desnutrição protéica.

5.3. Avaliação de IGF-1, insulina, TGF- β e corticosterona séricos

Após o período de desnutrição, a insulina sérica dos animais desnutridos foi significativamente menor em relação aos animais controles devido à baixa ingestão de proteínas (**Figura 6**). Da mesma forma, a concentração sérica de IGF-1 dos animais desnutridos foi significativamente menor em relação aos animais controles (**Figura 7**). Em relação à corticosterona sérica, observou-se que os animais desnutridos apresentaram um aumento significativo quando comparado com os animais controles (**Figura 8**). Por fim, a concentração sérica de TGF- β não diferiu entre os animais dos grupos controle e desnutrido (**Figura 9**).

Figura 4: Gráficos do consumo médio de água e ração por dia durante as 5 semanas de indução da desnutrição. Em **A**, média do consumo de ração por dia dos animais dos grupos controle (n= 17) e desnutrido (n= 20). Em **B**, média do consumo de proteínas por dia dos animais dos grupos controle (n= 17) e desnutrido (n= 20). Em **C**, média do consumo de água por dia dos animais dos grupos controle (n= 18) e desnutrido (n= 22). Resultados em média $\pm$ SEM. Avaliação estatística por teste t (***) $p < 0,0001$; n indica o número de animais utilizados no experimento.

A **B**

Figura 5: Em **A**, variação de peso (em valores médios) dos animais dos grupos controle (n= 27) e desnutrido (n= 38) a cada 48 horas, durante as 5 semanas de indução da desnutrição. Em **B**, porcentagem de variação do peso corporal após o processo de indução da desnutrição dos animais dos grupos controle (n=19) e desnutrido (n= 24), Avaliação estatística por teste t (***) $p < 0,0001$; n indica o número de animais utilizados no experimento.

Tabela 5: Resultados das concentrações séricas de proteínas totais (g/dL) e albumina (g/dL).

Parâmetros	Controle (N=14)	Desnutrido (N=16)
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	5,10 ± 0,35	4,16 ± 0,28 *
Albumina plasmática (g/dL)	2,00 ± 0,11	1,69 ± 0,13 *

Valores das concentrações séricas de proteínas totais (g/dL) e albumina (g/dL) nos animais dos grupos controle (n=14) e desnutrido (n=16) Resultados em média ± SEM. Avaliação estatística por teste t (* p< 0,05); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 6: gráfico da concentração de insulina sérica, em ng/mL, entre os animais dos grupos controle (n= 3) e desnutrido (n=7). Valores dados em média $\pm$ SEM. Avaliação estatística por teste t (**p< 0,001); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 7: gráfico da concentração de IGF-1 sérico, em ng/mL, entre os animais dos grupos controle (n= 3) e desnutrido (n=5). Valores dados em média $\pm$ SEM. Avaliação estatística por teste t (**p< 0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 8: gráfico da concentração de corticosterona sérica, em ng/mL, entre os animais dos grupos controle (n= 3) e desnutrido (n=3). Valores dados em média $\pm$ SEM. Avaliação estatística por teste t (* $p < 0,05$); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 9: gráfico da concentração de TGF- β sérico, em ng/mL, dos animais dos grupos controle (n= 3) e desnutrido (n=7). Avaliação estatística por teste t. Dados não significativos entre si; n indica o número de animais utilizados no experimento.

5.4. Avaliação hematológica

5.4.1. Eritrograma

A avaliação do quadro eritrocitário revelou que os animais desnutridos apresentaram redução significativa no número de hemácias, nos valores de hematócrito e na concentração de hemoglobina quando comparado aos animais do grupo controle, caracterizando um quadro de anemia (**Tabela 6**). A porcentagem de reticulócitos também foi significativamente menor nos animais desnutridos, indicando uma cinética de produção alterada. Os valores hematimétricos não apresentaram diferença entre os animais controles e desnutridos indicando que a anemia não era microcítica e nem hipocrômica, fato comprovado pela análise morfológica.

5.4.2. Leucograma

A análise da série leucocitária revelou que os animais desnutridos, quando comparados aos animais do grupo controle, apresentaram leucopenia significativa, com conseqüente redução nos valores absolutos de neutrófilos e monócitos, sendo verificada uma linfocitopenia significativa (**Tabela 7**). Eosinófilos e basófilos foram raramente encontrados nos animais de ambos os grupos.

5.4.3. Mielograma

Em relação à celularidade da medula óssea, os animais desnutrido apresentaram redução significativa, indicando um quadro de hipoplasia medular. Em relação ao número de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) obtidas após a separação por método imunomagnético, houve uma diferença significativa nos valores percentuais, verificando-se uma redução nos animais desnutridos (**Tabela 8**). A análise diferencial demonstrou uma redução significativa de células das linhagens granulocítica e eritróide e um aumento da proporção G/E em camundongos desnutridos (**Tabela 9**).

Tabela 6: Valores da série eritrocitária

Parâmetros	Controle (n=14)	Desnutrido (n=14)
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	9,32 $\pm$ 0,47	7,76 $\pm$ 0,28**
Hemoglobina (g/dL)	13,34 $\pm$ 0,39	11,96 $\pm$ 0,30**
Hematócrito (%)	38,57 $\pm$ 0,94	33,57 $\pm$ 1,20**
VCM (fL)	42,40 $\pm$ 2,16	41,75 $\pm$ 2,75
CHCM (%)	34,80 $\pm$ 1,17	36,11 $\pm$ 1,42
HCM (pg)	14,71 $\pm$ 0,74	15,57 $\pm$ 0,47
Reticulócitos (%)	4,03 $\pm$ 0,18	3,24 $\pm$ 0,18**

Valores comparativos, entre os animais dos grupos controle (n=14) e desnutrido (n=14), dos parâmetros hematológicos da série eritróide. Resultados em média $\pm$ SEM. Avaliação estatística por teste t (** $p < 0,01$); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Tabela 7: Resultados do número total de leucócitos e das diferentes populações leucocitárias (neutrófilos segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos)

Parâmetros	Controle (n=14)	Desnutrido (n=14)
Leucócitos (/mm³)	2532 ± 251,2	1338 ± 211,1**
Neutrófilos		
Segmentados (/mm³)	296,2 ± 49,8	158,5 ± 114,4*
Linfócitos (/mm³)	2448,3 ± 919,5	1409,1 ± 1080,2*
Eosinófilos (/mm³)	3,1 ± 9,2	0,0 ± 0,0
Monócitos (/mm³)	81,9 ± 21,4	30,2 ± 10,1*

Média ± SEM dos valores totais de leucócitos e dos valores absolutos de segmentados, linfócitos, eosinófilos e monócitos, em células/mm³, dos animais dos grupos controle (n=14) e desnutrido (n=14). Avaliação estatística por teste t (*p< 0,05; **p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Tabela 8: Resultado celularidade da medula óssea

Parâmetros	Controle	Desnutrido
Celularidade da medula óssea ($\times 10^6/\text{mL}$)	$40,76 \pm 1,4$ n=17	$28,00 \pm 1,23^{***}$ n=20
% de células tronco/progenitoras (Lin⁻)	$3,57 \pm 0,39$ n=12	$2,47 \pm 0,17^{**}$ n=17

Média $\pm$ SEM do total de células na medula óssea dos animais dos grupos controle (n=17) e desnutrido (n=20), em $\times 10^6/\text{mL}$ e da porcentagem de células tronco/progenitoras hemopoéticas na medula óssea dos animais dos grupos controle (n=12) e desnutrido (n=17) obtidas após a separação por método imunomagnético. Avaliação estatística por teste ($^{**}p<0,01$; $^{***}p<0,001$); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Tabela 9: Resultado dos valores absolutos das diferentes populações presentes na medula óssea

Parâmetros		Controle (n=3) (10 ⁶ /mm ³)	Desnutrido (n=3) (10 ⁶ /mm ³)
Granulócitos	Mieloblastos	0,54 ± 0,11	0,67 ± 0,12
	Formas jovens	0,84 ± 0,11	0,43 ± 0,04 *
	Formas em Anel	1,91 ± 0,22	1,13 ± 0,09 *
	Neutrófilos Segmentados	17,83 ± 0,57	12,60 ± 0,87 **
	Eosinófilos	0,55 ± 0,07	0,17 ± 0,06 *
	Linfócitos	8,38 ± 1,24	6,97 ± 0,69*
	Monócitos/macrófagos	0,09 ± 0,04	0,04 ± 0,04
	Eritroblatos basófilos	0,69 ± 0,07	0,35 ± 0,04 *
	Eritroblasto policromático	3,44 ± 0,34	1,81 ± 0,39 *
	Eritroblasto ortocromático	5,18 ± 0,96	3,21 ± 0,22*
	Plasmócitos	0,14 ± 0,08	0,09 ± 0,04
	Linhagem Megacariocítica	1,17 ± 0,36	0,51 ± 0,16*
	Relação Granulo/Eritróide	2,26 ± 0,09	2,80 ± 0,11 *
	Relação Linfo/Eritróide	0,90 ± 0,17	1,33 ± 0,17

Média ± SEM dos valores absolutos de blastos, formas jovens, formas em anel, neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos, eritroblastos totais, plasmócitos e megacariócitos, em células/mm³, e a relação G/E e L/E dos animais dos grupos controle (n=3) e desnutrido (n=3). Avaliação estatística por teste t (*p< 0,05; **p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

5.4.4. Esplenograma

A avaliação da celularidade do baço não indicou diferença significativa entre os animais dos grupos controle e desnutrido, apesar de os animais desnutridos apresentarem uma pequena redução no número total de células hemopoéticas (**Tabela 10**). Da mesma forma, o peso do baço dos animais desnutridos não apresentou diferença significativa, porém, foi menor que dos animais controles. A análise diferencial indicou uma redução significativa somente no número de linfócitos em camundongos desnutridos (**Tabela 11**).

5.5. Caracterização imunofenotípica das células Lin⁻

Para a validação da técnica de separação das células Lin⁻ por método imunomagnético, realizou-se a caracterização imunofenotípica. Verificou-se que mais de 80% das células recuperadas não apresentavam nenhum marcador de linhagem (**Tabela 12**), caracterizando, portanto, células tronco/progenitoras hemopoéticas.

5.6. Quantificação de células tronco, Lin⁻Sca-1⁺c-Kit⁺ da medula óssea por citometria de fluxo

Dentre a população de células Lin⁻ dos animais do grupo desnutrido havia uma porcentagem significativamente menor de células duplamente positiva para Sca-1 e c-Kit, ou seja, os animais deste grupo apresentaram uma quantidade de células tronco menor em relação ao grupo controle (**Figuras 10 e 11**).

Tabela 10: Resultado do número total de células do baço

Parâmetros	Controle (n=14)	Desnutrido (n=14)
Celularidade do baço ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$84,29 \pm 6,57$	$72,35 \pm 5,77$
Peso do baço (g)	$0,08 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$

Média $\pm$ SEM do total de células totais baço, em $10^6/\text{mm}^3$, e o peso do baço, em grama, dos animais dos grupos controle (n=14) e desnutrido (n=14). Para nenhum dos parâmetros houve diferença estatística. Avaliação estatística por teste t. Dados não significativos; n indica o número de animais utilizados no experimento.

Tabela 11: Resultado dos valores absolutos das diferentes populações presentes no baço

Parâmetros		Controle (n=3) (10 ⁶ /mm ³)	Desnutrido (n=3) (10 ⁶ /mm ³)
Granulócitos	Mieloblastos	0 ± 0	0 ± 0
	Formas jovens	0 ± 0	0 ± 0
	Formas em Anel	0 ± 0	0 ± 0
	Neutrófilos Segmentados	0,57 ± 0,31	0,65 ± 0,22
	Eosinófilos	0 ± 0	0 ± 0
	Linfócitos	64,17 ± 2,60	51,53 ± 2,80*
	Monócitos	0 ± 0	0 ± 0
	Eritroblatos basófilos	0,84 ± 0,11	0,43 ± 0,26
	Eritroblasto policromático	6,58 ± 0,49	6,56 ± 0,52
	Eritroblasto ortocromático	12,12 ± 1,84	13,17 ± 2,23
	Plasmócitos	0 ± 0	0 ± 0
	Linhagem Megacariocítica	0 ± 0	0 ± 0
	Relação Granulo/Eritróide	0,026 ± 0,013	0,035 ± 0,014
	Relação Linfo/Eritróide	3,40 ± 0,50	2,82 ± 0,63

Média ± SEM dos valores absolutos de blastos, formas jovens, formas em anel, neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos, monócitos, eritroblastos totais, plasmócitos e megacariócitos, em células/mm³, e a relação G/E e L/E dos animais dos grupos controle (n=3) e desnutrido (n=4). Avaliação estatística por teste t (*p< 0,05; **p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Tabela 12: Caracterização imunofenotípica das células Lin⁻

Marcadores	% de células negativas	% de células positivas
Sca-1	33,8	66,2
CD34	2,2	97,8
Gr-1	94,9	5,1
B220	80,2	19,8
Ter-119	97,6	2,4
CD11b	86,6	13,4
CD5	81,5	18,5

Tabela com as porcentagens de células negativas e positivas para a expressão de marcadores de linhagem hemopoética. Validação da separação de células Lin⁻ por método imunomagnético a partir de células da medula óssea de camundongos C57Bl/6J (n=2).

Figura 10: Gráficos representativos da expressão de c-Kit (FITC) e Sca-1 (PE) de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin^-) da medula óssea de animais controle e desnutrido. Em **a**, análise da população de células Lin^- obtida após separação por método imunomagnético ; em **b**, controle isotípico IgG_{2b}-FITC e IgG_{2a}-PE; em **c**, expressão de c-Kit e Sca-1 da população de células Lin^-). Gráficos representativos de um único experimento no qual foram utilizados 4 animais controles e 4 desnutridos. Análises realizadas no citômetro FACSCalibur e analisadas no programa CELLQuest®.

Figura 11: Gráfico da porcentagem de células tronco hemopoéticas, Lin⁻Sca-1⁺c-Ki⁺, em relação à celularidade total da medula óssea dos camundongos dos grupos controle (n=4) e desnutrido (n=4). Avaliação estatística por teste t (*p< 0,05); n indica o número de animais utilizados no experimento.

5.7. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin⁻ da medula óssea utilizando Iodeto de Propídeo e RNase, por citometria de fluxo

Em animais desnutridos encontramos aumento significativo da população de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) em G0/G1 quando comparado com os animais do grupo controle. Conseqüentemente, essa população celular apresentou uma redução nas fases mais tardias do ciclo celular (S/G2/M), fases em que se observam o aumento da ploidia da célula (Tabela 13, Figura 12).

5.8. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin⁻ da medula óssea utilizando Laranja de Acridina, por citometria de fluxo

A partir da marcação com Laranja de Acridina é possível separar a população de células em G0 e G1, uma vez que este corante marca simultaneamente, o DNA e o RNA. Portanto, é possível distinguir estas duas fases do ciclo celular uma vez que em G1 o conteúdo de RNA é maior.

Os animais desnutridos apresentaram diferença significativa quanto à população de células tronco/progenitoras (Lin⁻) em estado de quiescência (G0). A marcação com Laranja de Acridina não mostrou nenhuma porcentagem de células em S, G2 ou M (Tabela 14, Figura 13), talvez porque a maioria da população Lin⁻ estivesse em G0/G1, como foi verificado com a marcação com Iodeto de Propídeo.

Figura 12: Dados de um experimento representativo (de um $n=4$ para animais controle e $n=6$ para animais desnutridos) da análise por citometria de fluxo das células tronco/progenitoras marcadas com Iodeto de Propídeo. Em **A**, dados de uma amostra do grupo controle; em **B** dados de uma amostra do grupo desnutrido. Em **a**, R1 corresponde à população de células tronco/progenitoras. Em **b**, M1 corresponde à população de células tronco/progenitoras em $G0/G1$ e M2 corresponde à população de células tronco/progenitoras em $S/G2/M$. Análises realizadas no citômetro FACSCalibur e analisadas no programa CELLQuest®.

Figura 13: Dados de um experimento representativos (de um $n=4$ para animais controle e $n=5$ para animais desnutridos) da análise por citometria de fluxo das células tronco/progenitoras marcadas com Laranja de Acridina. Em **A**, dados de uma amostra do grupo controle; em **B** dados de uma amostra do grupo desnutrido. Em **a**, R1 corresponde à população de células tronco/progenitoras. Em **b**, R2 corresponde à população de células tronco/progenitoras em G0 e R3 corresponde à população de células tronco/progenitoras em G1. Análises realizadas no citômetro FACSCalibur e analisadas no programa CELLQuest®.

Tabela 13: Porcentagem da população de células Lin⁻ em G0/G1 e S/G2/M

Parâmetros	Controle (n=4)	Desnutrido (n=6)
População de células Lin ⁻ em G0/G1 (%)	73,34 ± 2,18	81,17 ± 1,41*
População de células Lin ⁻ em S/G2/M (%)	26,78 ± 2,20	18,92 ± 1,40*

Média ± SEM da porcentagem da população de células Lin⁻ em G0/G1 e em S/G2/M dos animais dos grupos controle (n=4) e desnutrido (n=6). Avaliação estatística por teste t (*p<0,05); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Tabela 14: Porcentagem da população de células Lin⁻ em G0 e G1

Parâmetro	Controle (n=4)	Desnutrido (n=5)
G0 (%)	82,37 ± 0,40	86,41 ± 1,28*
G1 (%)	17,22 ± 0,42	13,00 ± 1,17*

Média ± SEM da porcentagem da população de células Lin⁻ em G0 e em G1 dos animais dos grupos controle (n=4) e desnutrido (n=5). Avaliação estatística por teste t (*p<0,05); n indica o número de animais utilizados no experimento.

5.9. Quantificação de proteínas regulatórias das fases G1/S do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea por western blotting

Em relação às proteínas regulatórias do ciclo celular podemos separá-las em dois grandes grupos: proteínas que regulam positivamente o ciclo celular (ciclina D1, Cdk4, Cdk2, Cdc25a, PCNA e ciclina E) e proteínas que regulam negativamente o ciclo celular (p21, p27 e p53). Em relação às proteínas que regulam positivamente o ciclo celular as células Lin⁻ dos animais desnutridos apresentaram redução significativa na expressão de ciclina D1, PCNA, Cdk2, cdc25a e ciclina E, contudo, não diferiu em relação à Cdk4 (**Figuras 14 e 15**). Em contrapartida, as células dos animais desnutridos apresentaram aumento significativo na expressão das proteínas inibitórias p21 e p27 quando comparado com as células dos animais controle (**Figura 16**). Em relação a expressão de p53, proteína que interrompe o ciclo celular em caso de dano no DNA, não foi observada diferença entre animais desnutridos e controle (**Figura 16**).

5.10. Avaliação de fibronectina da medula óssea esternal por imunohistoquímica

A avaliação imunohistoquímica da medula óssea esternal indicou aumento no depósito de fibronectina nos animais desnutridos quando comparado com os animais controle (**Figuras 17 e 18**). Em especial observamos esse aumento em regiões subendosteais e perivascular (**Figura 18B, setas**), consideradas nicho de células tronco hemopoéticas. Porém, também observamos uma distribuição de fibronectina aumentada, dispersa em todas as regiões da medula óssea (**Figura 17**). Observamos também, que a medula óssea de camundongos desnutridos apresenta uma estrutura mais desorganizada em relação à medula óssea de camundongos controles, evidenciando estruturas com aspecto de adipócitos.

Figura 14: gráficos da expressão de ciclina D1 entre os animais dos grupos controle (n=4) e desnutrido (n=4); da expressão de PCNA entre os grupos controle (n=6) e desnutrido (n=8); e da expressão de Ciclina E entre os grupos controle (n=3) e desnutrido (n=3) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Valores dados em média $\pm$ SEM; resultados em unidades arbitrárias. Análise estatística por teste t (* $p < 0,05$); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 15: gráficos da expressão de cdk4 entre os animais dos grupos controle (n=3) e desnutrido (n=3); da expressão de cdk2 entre os grupos controle (n=5) e desnutrido (n=7); e da expressão de Cdc25a entre os animais dos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=6) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Valores dados em média ± SEM; resultados em unidades arbitrárias. Análise estatística por teste t (**p<0,01; ***p<0,001); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 16: gráficos da expressão de p21 entre os animais dos grupos controle (n=3) e desnutrido (n=5); da expressão de p27 entre os grupos controle (n=7) e desnutrido (n=9); e da expressão de p53 entre os grupos controle (n=3) e desnutrido (n=3) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Valores dados em média $\pm$ SEM; resultados em unidades arbitrárias. Análise estatística por teste t (*p<0,05); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 17: Fotomicrografias de cortes histológicos da medula óssea esternal marcadas, por imunohistoquímica, para fibronectina. Em **A**, controle negativo; em **B**, marcação de fibronectina de camundongo controle; em **C**, marcação de fibronectina de camundongo desnutrido. Aumento 20X.

Figura 18: Fotomicrografias de cortes histológicos da medula óssea esternal marcadas, por imunohistoquímica, para fibronectina. Em **A**, marcação de fibronectina de camundongo controle; em **B**, marcação de fibronectina de camundongo desnutrido aumentada em regiões subendosteais e perivascular (setas). Aumento 40X.

5.11. Avaliação da expressão de receptores para fibronectina, VLA-4 e VLA-5, de células CD34⁺ e de células Lin⁻ da medula óssea por citometria de fluxo

Em relação à expressão dos receptores para a fibronectina verificou-se que a população de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) dos animais desnutridos apresentaram aumento significativo da população de células Lin⁻ expressando o receptor VLA-5 porém, não houve diferença na porcentagem da população expressando receptor VLA-4 (**Figuras 19 e 21**). Quando avaliamos uma população mais comprometida, ou seja, para uma população de células hemopoéticas CD34⁺, há redução significativa da população de células expressando tanto de VLA-4 quanto VLA-5 nos animais do grupo desnutridos quando comparados aos animais do grupo controle (**Figuras 20 e 22**).

5.12. Avaliação da expressão de receptores para fatores de crescimento, CD123 (IL3R), CD126 (IL6R) e CD117 (ckit) de células Lin⁻ da medula óssea por citometria de fluxo

Ao se avaliar a expressão dos receptores para fatores de crescimento, verificamos que nos animais desnutridos há, significativamente, menos células tronco/progenitoras hemopoéticas expressando os receptores CD117 e CD123, receptores para SCF e IL3, respectivamente (**Figuras 23 e 24**). Em relação ao receptor para o fator de crescimento IL6, CD126, não foi observada alteração na porcentagem de células tronco/progenitoras hemopoéticas positivas, quando comparado os dois grupos experimentais .

Figura 19: Gráficos representativos da expressão de VLA-4 (FITC) e VLA-5 (PE) de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea de animais controle e desnutrido. Em **a**, análise da população de células Lin⁻ obtida após separação por método imunomagnético ; em **b**, controle isotípico IgG_{2b}-FITC e IgG_{2a}-PE; em **c**, expressão de c-Kit e Sca-1 da população de células Lin⁻). Gráficos representativos de dois experimentos nos quais foram utilizados um total de 7 animais controles e 10 desnutridos. Análises realizadas no citômetro FACSCalibur e analisadas no programa CELLQuest®.

Figura 20: Gráficos representativos da expressão de VLA-4 (FITC) e CD34 (PE) e de VLA-5 (PE) e CD34 (FITC) de células totais da medula óssea de animais controle e desnutrido. Em **a**, R1 corresponde às células mononucleares de baixa complexidade; em **b**, controle isotípico IgG_{2b}-FITC e IgG_{2a}-PE; em **c**, expressão de CD34/VLA-4 e CD34/VLA-5 da população R1. Gráficos representativos de um único experimento no qual foram utilizados 4 animais controles e 4 desnutridos. Análises realizadas no citômetro FACSCalibur e analisadas no programa CELLQuest®.

Figura 21: Gráficos da porcentagem de células Lin^- que expressam os receptores VLA-4 e VLA-5 dos animais dos grupos controle ($n=7$) e desnutrido ($n=10$) após 5 semanas de indução da desnutrição. Valores dados em média $\pm$ SEM. Análise estatística por teste t ($*p<0,05$); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 22: Gráficos da porcentagem de células CD34^+ que expressam os receptores VLA-4 e VLA-5 dos animais dos grupos controle ($n=4$) e desnutrido ($n=4$) após 5 semanas de indução da desnutrição. Valores dados em média $\pm$ SEM. Análise estatística por teste t ($*p<0,05$); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 23: Gráficos representativos da expressão de CD117 (FITC), CD123 (FITC) e CD126 (PE) de células totais da medula óssea de animais controle e desnutrido. Em **a**, R1 corresponde à população de células tronco/progenitoras hemopoéticas; em **b**, controle isotípico IgG_{2b}-FITC e IgG_{2a}-PE; em **c**, expressão de CD117, CD123 e CD126 da população R1. Gráficos representativos de um único experimento no qual foram utilizados 4 animais controles e 5 desnutridos. Análises realizadas no citômetro FACSCalibur e analisadas no programa CELLQuest®.

Figura 24: Gráficos da porcentagem de células Lin⁻ que expressa o receptor CD117 **(A)**, CD123 **(B)** e CD126 **(C)** entre os animais dos grupos controle (n=4) e desnutrido (n=5). Valores dados em média $\pm$ SEM. Análise estatística por teste t (*p<0,05), n indica o número de animais utilizados no experimento.

5.13. Avaliação da adesão/proliferação das células estromais por cristal violeta a partir do ensaio de CFU-F

A avaliação do 3º dia de cultivo demonstrou que as células estromais dos animais desnutridos aderem, significativamente, mais em relação às células dos animais controle. Contudo, ao se avaliar os dias subsequentes, ou seja, avaliando-se a proliferação das células estromais, observamos que há uma inversão na quantidade de células aderidas: é significativamente maior, no 15º dia, nos animais controle em relação aos animais desnutrido. Ao final do período avaliado, no 21º dia, verificamos que a quantidade de células aderidas dos animais desnutridos e controles se igualaram, sugerindo que as células estromais dos animais desnutridos apresentam um crescimento mais tardio (**Figura 25A**). Considerando a área sob a curva, verificamos que esta é significativamente menor no grupo desnutrido em relação ao grupo controle (**Figura 25B**).

5.14. Quantificação de citocinas produzidas a partir da cultura de CFU-F

A partir da cultura de CFU-F, foi coletado o sobrenadante para a quantificação de citocinas que participam da regulação da hemopoese. Contudo, não foi possível avaliar TNF- α e IFN- γ uma vez que os valores apresentaram-se abaixo dos valores de detecção do método. Para as outras citocinas observamos um comportamento variado. Comparando-se os dois grupos, obtivemos uma quantidade menor de IL6 nos animais desnutridos, sendo que em relação à cinética, a área sob a curva foi significativamente menor neste grupo em relação ao grupo controle (**figuras 26A e 26B**). A produção de IL3 foi significativamente menor no grupo desnutrido somente no 35º dia, não havendo diferença em relação à cinética de produção (**figuras 27A e 27B**). A produção de SCF não apresentou diferença estatística em nenhum dos dias avaliados (**figuras 28A e 28B**). Para GM-CSF, ambos os grupos apresentaram uma produção tardia, sendo significativamente menor no grupo desnutrido (**figuras 29A e 29B**). Para IL10 observamos um aumento gradativo na produção para ambos os grupos, sendo significativamente maior no grupo controle, inclusive na média das áreas sob a curva (**figuras 30A e 30B**). Para IL1- β , porém, não foi observada nenhuma diferença quantitativa entre os grupos, sendo que ao observarmos o gráfico da cinética de secreção, as curvas praticamente se sobrepõem (**figuras 31A e 31B**).

A

Cinética CFU-F

B

área sob a curva - CFU-F

Figura 25: em **A**, gráfico da cinética de adesão/proliferação da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=5) após 3, 9, 15 e 21 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Em **B**, gráfico da média das áreas sob a curva entre os animais dos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=5). Análise estatística por teste t (*p<0,05; **p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 26: em **A**, gráfico da cinética da quantidade de IL6 do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=5) após 3, 9, 15, 21, 27 e 35 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Em **B**, gráfico da média das áreas sob a curva entre os animais dos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=5). Análise estatística por teste t (*p<0,05; **p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 27: em **A**, gráfico da cinética da quantidade de IL3 do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle (n=6) e desnutrido (n=5) após 3, 9, 15, 21, 27 e 35 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Em **B**, gráfico comparativo da média das áreas sob a curva entre os animais dos grupos controle (n=6) e desnutrido (n=5). Análise estatística por teste t (*p<0,05); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 28: em **A**, gráfico da cinética da quantidade de SCF do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle (n=6) e desnutrido (n=5) após 3, 9, 15, 21, 27 e 35 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Em **B**, gráfico comparativo da média das áreas sob a curva entre os animais dos grupos controle (n=6) e desnutrido (n=5). Análise estatística por teste t. Não houve diferença estatística entre os grupos; n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 29: em **A**, gráfico da cinética da quantidade de GM-CSF do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle (n=6) e desnutrido (n=5) após 3, 9, 15, 21, 27 e 35 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Em **B**, gráfico da média das áreas sob a curva entre os animais dos grupos controle (n=6) e desnutrido (n=5). Análise estatística por teste t (**p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 30: em **A**, gráfico da cinética da quantidade de IL10 do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=5) após 3, 9, 15, 21 e 27 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Em **B**, gráfico da média das áreas sob a curva entre os animais dos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=5). Análise estatística por teste t (**p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 31: em **A**, gráfico da cinética da quantidade de IL1- β do sobrenadante da cultura de CFU-F entre os animais dos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=5) após 9, 15, 21, 27 e 35 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Em **B**, gráfico comparativo da média das áreas sob a curva entre os animais dos grupos controle (n=5) e desnutrido (n=5). Análise estatística por teste t. Não houve diferença estatística entre os grupos; n indica o número de animais utilizados no experimento.

5.15. Quantificação de proteínas da via de sinalização de MAPK e FAK de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea por western blot

Análise inicial da sinalização da via da MAPK demonstrou que, em relação à expressão das proteínas fosforiladas ERK1 (p42) e ERK2 (p44), há redução significativa nas células Lin⁻ da medula óssea de camundongos desnutridos em relação aos animais controle (**Figura 32**). A marcação para β -actina foi realizada após a marcação para ERK uma vez que o peso molecular da β -actina é similar ao do fosfo-ERK (42kDa). Para a expressão de RhoA e para as proteínas fosforiladas Rac/cdc42 e FAK, as principais proteínas sinalizadoras da via FAK, observamos expressão significativamente menor nas células Lin⁻ de animais desnutridos quando comparados com animais controle (**Figura 33**).

5.16. Avaliação da proliferação das células Lin⁻ após cultivo sobre uma matriz de fibronectina e sob estimulação por fatores de crescimento: ensaio de MTT

Após o cultivo das células Lin⁻ por 3 e 5 dias, verificamos que na ausência dos fatores de crescimento IL3, IL6 e SCF, tanto as células dos animais controle quanto dos animais desnutridos não proliferaram (**Figura 34, 35 e 36**). Em relação à celularidade, ao compararmos o crescimento das células Lin⁻ após suplementação com concentrações ótimas desses fatores de crescimento verificamos que, em ambos os grupos, o crescimento foi gradativo, tanto sobre uma matriz de fibronectina quanto sobre uma superfície não aderente de BSA (cultura líquida) (**Figura 36**). Após 3 e 5 dias de cultivo as células dos animais desnutridos proliferaram mais que as células dos animais controle, mas não de forma significativa, seja sobre uma matriz de fibronectina ou de BSA (cultura líquida) (**Figura 36**). Porém, somente para o grupo desnutrido a celularidade foi significativamente maior após o cultivo sobre a matriz de fibronectina quando comparada com a matriz de BSA (cultura líquida) (**figura 37**).

Figura 32: gráficos da expressão de fosfo-ERK1 (p42) e fosfo-ERK2 (p44) entre os animais dos grupos controle (n=3) e desnutrido (n=3) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Valores dados em média $\pm$ SEM; resultados em unidades arbitrárias. Análise estatística por teste t (**p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 33: gráficos da expressão de RhoA, p-FAK e p-Rac/cdc42 entre os animais dos grupos controle (n=3) e desnutrido (n=3) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Valores dados em média $\pm$ SEM; resultados em unidades arbitrárias. Análise estatística por teste t (* $p < 0,05$); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 34: fotos ilustrativas de células Lin^- após 3 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 sobre uma matriz de fibronectina ou BSA, suplementadas ou não com fatores de crescimento IL3 (10ng/mL), IL6 (10ng/mL) e SCF (50ng/mL). Em **A**, C-CN e D-CN: células do grupo controle e desnutrido, respectivamente, cultivadas na ausência de fatores de crescimento; em **B**, C-BSA e D-BSA: células do grupo controle e desnutrido, respectivamente, cultivadas sobre uma matriz de BSA e suplementadas com fatores de crescimento; em **C**, C-FN e D-FN: células do grupo controle e desnutrido, respectivamente, cultivadas sobre uma matriz de fibronectina e suplementadas com fatores de crescimento. Aumento 100x.

Figura 35: fotos ilustrativas de células Lin^- após 5 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 sobre uma matriz de fibronectina ou BSA, suplementadas ou não com fatores de crescimento IL3 (10ng/mL), IL6 (10ng/mL) e SCF (50ng/mL). Em **A**, C-CN e D-CN: células do grupo controle e desnutrido, respectivamente, cultivadas na ausência de fatores de crescimento; em **B**, C-BSA e D-BSA: células do grupo controle e desnutrido, respectivamente, cultivadas sobre uma matriz de BSA e suplementadas com fatores de crescimento; em **C**, C-FN e D-FN: células do grupo controle e desnutrido, respectivamente, cultivadas sobre uma matriz de fibronectina e suplementadas com fatores de crescimento. Aumento 100x.

Figura 36: gráficos da celularidade, células/poço, após 3 e 5 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. **C-FN:** grupo controle (n=3) cultivado sobre uma matriz de fibronectina e suplementado com IL3 (10ng/mL), IL6 (10ng/mL) e SCF (50ng/mL); **C-BSA:** grupo controle (n=3) cultivado sobre uma matriz de BSA e suplementado com IL3 (10ng/mL), IL6 (10ng/mL) e SCF (50ng/mL); **C-CN:** grupo controle (n=3) cultivado sobre uma matriz de BSA sem fatores de crescimento; **D-FN** grupo desnutrido (n=4) cultivado sobre uma matriz de fibronectina e suplementado com IL3 (10ng/mL), IL6 (10ng/mL) e SCF (50ng/mL); **D-BSA:** grupo desnutrido (n=4) cultivado sobre uma matriz de BSA e suplementado com IL3 (10ng/mL), IL6 (10ng/mL) e SCF (50ng/mL); **D-CN:** grupo desnutrido (n=4) cultivado sobre uma matriz de BSA sem fatores de crescimento. Não houve diferença estatística entre os grupos; n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 37: Em **A**, gráficos da celularidade dos animais do grupo controle (n=3) após 3 e 5 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ sobre a matriz de fibronectina (C-FN) e sobre a matriz de BSA (C-BSA), ambas suplementadas com fatores de crescimento IL3 (10ng/mL), IL6 (10ng/mL) e SCF (50ng/mL); em **B**, gráficos comparativo da celularidade dos animais do grupo desnutrido (n=4) após 3 e 5 dias de cultivo a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ sobre a matriz de fibronectina (D-FN) e sobre a matriz de BSA (D-BSA), ambas suplementadas com fatores de crescimento IL3 (10ng/mL), IL6 (10ng/mL) e SCF (50ng/mL). Para A e B, avaliação estatística por teste t (**p<0,01 e ***p<0,001); n indica o número de animais utilizados no experimento.

5.17. Avaliação da adesão das células Lin⁻ após cultivo sobre uma matriz de fibronectina e sob estimulação por fatores de crescimento: ensaio de Cristal Violeta

A adesão celular foi avaliada considerando a celularidade das amostras; logo, os resultados foram discriminados como absorbância/celularidade (células/poço). Comparando a adesão das células Lin⁻, verificamos que no terceiro e no quinto dia de cultivo a adesão das células dos animais desnutridos não diferiu em relação às células dos animais controle (**Figura 38**).

5.18. Recuperação nutricional

5.18.1. Avaliação hematológica

5.18.1.1. Hemograma

Após a recuperação nutricional, verificamos reversão do quadro de pancitopenia periférica observada na condição de desnutrição. A anemia foi revertida, com aumento no número de hemácias e nos valores de hemoglobina e hematócrito; a leucopenia também foi revertida com aumento no número de leucócitos (**tabela 15**). Os índices hematimétricos, assim como para os animais desnutridos, não apresentaram diferença entre os grupos controle R e renutrido.

5.18.1.2. Mielograma

O quadro de hipoplasia medular também foi revertido com o processo de renutrição. A celularidade normalizou-se e a quantidade de células Lin⁻ recuperadas após separação imunomagnética igualou-se entre os animais controle R e renutrido (**tabela 15**).

Figura 38: Gráficos da adesão celular, em absorbância/celularidade, após 3 e 5 dias de cultivo das células Lin⁻ sobre uma matriz de fibronectina, suplementadas com IL3 (10ng/mL), IL6 (10ng/mL) e SCF (50ng/mL). Em **A**, C-FN 3 dias: grupo controle (n=3) cultivado sobre uma matriz de fibronectina por 3 dias; D-FN 3 dias: grupo desnutrido (n=3) cultivado sobre uma matriz de fibronectina por 3 dias. Em **B**, C-FN 5 dias: grupo controle (n=3) cultivado sobre uma matriz de fibronectina por 5 dias; D-FN: grupo desnutrido (n=3) cultivado sobre uma matriz de fibronectina por 5 dias. Para A e B, avaliação estatística por teste t (valores não significativos); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Tabela 15: parâmetros hematológicos

Parâmetros	Grupo controle	Grupo renutrido
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	$8,57 \pm 0,18$ (n=3)	$8,52 \pm 0,19$ (n=10)
Hemoglobina (g/dL)	$12,17 \pm 0,28$ (n=3)	$12,40 \pm 0,12$ (n=7)
Hematócrito (%)	$39,38 \pm 0,44$ (n=4)	$39,30 \pm 0,32$ (n=6)
VCM (fL)	$44,67 \pm 0,33$ (n=3)	$44,50 \pm 0,19$ (n=8)
CHCM (%)	$31,90 \pm 0,25$ (n=3)	$31,61 \pm 0,16$ (n=12)
HCM (pg)	$14,20 \pm 0,15$ (n=3)	$13,94 \pm 0,13$ (n=13)
Leucócitos ($/\text{mm}^3$)	$2733 \pm 484,2$ (n=3)	$2950 \pm 306,3$ (n=14)
Celularidade da MO ($\times 10^6/\text{mL}$)	$38,14 \pm 2,06$ (n=9)	$42,15 \pm 1,89$ (n=11)
% de células tronco/progenitoras (Lin^-)	$4,05 \pm 0,52$ (n=7)	$4,52 \pm 0,40$ (n=13)

Valores comparativos, entre os animais dos grupos controle e renutrido, dos parâmetros hematológicos. Resultados em média $\pm$ SEM. Avaliação estatística por teste t (não houve diferença estatística entre os grupos). N indica o número de animais utilizados no experimento.

5.18.2. Quantificação de células tronco, Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺, da medula óssea por citometria de fluxo após recuperação nutricional

Após o período de 30 dias de recuperação nutricional, observamos que apesar do aumento do número de células tronco hemopoéticas na medula óssea de animais recuperados nutricionalmente, esse aumento não foi significativo estatisticamente em relação ao grupo desnutrido (**figura 39**).

5.18.3. Avaliação do perfil proliferativo das células Lin⁻ da medula óssea após recuperação nutricional, utilizando Iodeto de Propídeo

Após o processo de recuperação nutricional, observou-se que a porcentagem de células tronco/progenitoras em G0/G1 dos animais renutridos igualou-se a dos animais controle, demonstrando que o ciclo celular voltou a normalidade (**tabela 16**). Quando comparamos o ciclo celular de animais renutridos e desnutridos, verificamos que o primeiro apresentou uma porcentagem de células tronco/progenitoras nos estágios proliferativos (S/G2/M) significativamente maior em relação ao segundo (**figuras 40 e 41**).

Figura 39: Gráfico da porcentagem de células tronco hemopoéticas, $\text{Lin}^- \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$, em relação à celularidade total da medula óssea dos camundongos dos grupos controle D (n=4), desnutrido (n=4), controle R (n=3) e renutrido (n=3). Avaliação estatística por teste t (*p< 0,05; ***p<0,001); n indica o número de animais utilizados no experimento.

A **B****a** **b**

Figura 40: Dados de um experimento representativo (de um $n=4$ para animais controle, e $n=5$ para animais renutrídos) da análise por citometria de fluxo das células tronco/progenitoras marcadas com Iodeto de Propídeo. Em **A**, dados de uma amostra do grupo controle; em **B** dados de uma amostra do grupo renutrído. Em **a**, R1 corresponde à população de células tronco/progenitoras. Em **b**, M1 corresponde à população de células tronco/progenitoras em G0/G1 e M2 corresponde à população de células tronco/progenitoras em S/G2/M.

Tabela 16: Porcentagem da população de células Lin⁻ em G0/G1 e S/G2/M dos animais dos grupos controle e renutrido

Parâmetros	Controle	Renutrido
	(n=4)	(n=5)
População de células Lin ⁻ em	68.32 ± 2.37	60.95 ± 3.47
G0/G1 (%)		
População de células Lin ⁻ em	31.59 ± 2.34	38.29 ± 3.27
S/G2/M (%)		

Média ± SEM da porcentagem da população de células Lin⁻ em G0/G1 e em S/G2/M dos animais dos grupos controle (n=4) e renutrido (n=5). Avaliação estatística por teste t. Não houve diferença estatística; n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 41: Em **A**, gráficos da porcentagem de células Lin^- em G0/G1 entre os grupos controle D (n=4), desnutrido (n=6), controle R (n=4) e renutrido (n=5); em **B**, gráficos comparativos da porcentagem de células Lin^- em S/G2/M entre os grupos controle D (n=4), desnutrido (n=6), controle R (n=4) e renutrido (n=5). Para **A** e **B**, avaliação estatística por teste t (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$); n indica o número de animais utilizados no experimento.

5.18.4. Quantificação de proteínas regulatórias das fases G0/G1 do ciclo celular de células Lin⁻ da medula óssea após recuperação nutricional

Após a recuperação nutricional verificamos que há uma certa tendência para a normalização das proteínas regulatórias do ciclo celular. Duas proteínas importantes para a progressão do ciclo, as ciclinas D e E, apresentaram uma reversão completa, ou seja, a expressão de ambas as proteínas foi igual entre os grupos controle R e renutrido e significativamente maior em relação ao grupo desnutrido (**figuras 42 e 43**); da mesma forma, podemos afirmar que a expressão de p27 também foi revertida (**figura 44**). Para a proteína p21, verificamos que os animais do grupo renutrido apresentaram uma pequena redução (não significativa) na expressão quando comparado com os animais do grupo desnutrido, porém, normalizaram-se em relação ao grupo controle R (**figura 45**). Quanto a expressão de PCNA, apesar das diferenças, não houve significância estatística entre os grupos desnutrido e renutrido, porém, este grupo normalizou em relação ao grupo controle R (**Figuras 46**). Em relação à expressão de cdk4, assim como no grupo desnutrido, não foi observada nenhuma diferença entre os grupos controle R e renutrido (**figura 47**). Para a proteína constitutiva cdk2, não foi observada a reversão na expressão por parte dos animais renutridos quando comparados com os animais desnutridos, sendo que a expressão dessa proteína continuou menor em relação ao respectivo grupo controle R (**figura 48**).

Figura 42: gráfico da expressão de ciclina D entre os grupos controle D (n=4), desnutrido (n=4), controle R (n=3) e renutrido (n=5) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Análise estatística por teste t (*p<0,05); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 43: gráfico da expressão de ciclina E entre os grupos controle D (n=4), desnutrido (n=5), controle R (n=3) e renutrido (n=3) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Análise estatística por teste t (*p<0,05; **p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 44: gráfico da expressão de p27 entre os grupos controle D (n=6), desnutrido (n=9), controle R (n=4) e renutrido (n=3) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Análise estatística por teste t (*p<0,05; **p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 45: gráfico da expressão de p21 entre os grupos controle D (n=3), desnutrido (n=5), controle R (n=2) e renutrido (n=3) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Análise estatística por teste t (*p<0,05); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 46: gráfico da expressão de PCNA entre os grupos controle D (n=6), desnutrido (n=7), controle R (n=4) e renutrido (n=4) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Análise estatística por teste t (**p<0,01); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 47: gráfico comparativo da expressão de cdk4 entre os grupos controle D (n=3), desnutrido (n=3), controle R (n=4) e renutrido (n=7) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Análise estatística por teste (não houve diferença estatística entre os grupos); n indica o número de animais utilizados no experimento.

Figura 48: gráfico comparativo da expressão de cdk2 entre os grupos controle D (n=5), desnutrido (n=7), controle R (n=2) e renutrido (n=4) em células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) da medula óssea. Análise estatística por teste t (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001); n indica o número de animais utilizados no experimento.

6. DISCUSSÃO

6.1. Aspectos nutricionais

No modelo experimental utilizado os animais foram induzidos a uma desnutrição crônica moderada, a partir de uma restrição protéica severa. De maneira geral, os animais responderam a desnutrição, sendo observadas alterações nutricionais e hematológicas. Em relação ao *status* nutricional, dados da literatura mostram-se conflitantes sobre os efeitos de dietas hipoprotéicas e o consumo de ração, sendo verificado tanto aumento (COLOMBO *et al*, 1992; DESCHEPPER e DEGROOTE, 1995; WHITE *et al*, 1998) quanto diminuição do consumo (BECK *et al*, 1989; MERCER *et al*, 1994). Nos experimentos executados o que se verificou nos animais pertencentes ao grupo desnutrido, foi aumento significativo do consumo de ração e de água logo no início do processo de indução da desnutrição. No geral, o peso corpóreo dos animais desnutridos não se modificou durante o período de desnutrição, sendo verificada apenas pequena perda de peso ao final do período, mas com comportamento significativamente diferente dos animais do grupo controle, que apresentaram aumento gradativo e significativo do peso corporal. De acordo com Huang & Fraker (2003), camundongos adultos submetidos à desnutrição crônica induzida por uma restrição protéica moderada e que apresentam discreta alteração do peso corpóreo aparentemente se adaptam à dieta, talvez aumentando a absorção e reabsorção de aminoácidos e aumentando o catabolismo protéico, situação esta que também poderia estar acontecendo com esse modelo de desnutrição. Por outro lado, o aumento do consumo de ração poderia compensar a falta de proteínas, provendo aos animais desnutridos energia e outros nutrientes, que não a proteína, suficientes para estabilizar a massa corpórea. Ainda, alguns estudos (WEBSTER, 1993; WHITE, 1998) sugerem que esse aumento de consumo de ração como tentativa de compensar a falta de proteínas poderia levar a um depósito do excesso de energia na forma de gordura, fato observado por nós em todos os animais desnutridos, o que contribuiria para a pouca perda de peso. Outra observação nutricional importante foi a diminuição significativa na concentração das proteínas totais e albumina séricas dos animais desnutridos. Este dado é coerente com o fato de haver uma redução

severa da ingestão de proteínas e sugere que, apesar de todo um possível mecanismo de adaptação, o organismo dos animais desnutridos não foi capaz de manter normal o metabolismo protéico.

Verificamos também alterações de alguns hormônios importantes na regulação do metabolismo, comprovando o comprometimento do *status* nutricional após a restrição protéica. É sabido que em processos de desnutrição, seja protéica ou protéico-energética, há redução da secreção de insulina devido à baixa glicemia (CRACE, 1991). Considerando que este hormônio estimula a síntese protéica e reduz a proteólise muscular, baixas concentrações de insulina podem contribuir para o catabolismo protéico num mecanismo de adaptação à desnutrição. Da mesma forma, o aumento de corticosterona, hormônio essencialmente catabólico e diretamente ligado à condição de estresse, também pode estar associado a esse processo de adaptação. Já a redução de IGF-1 em animais desnutridos está totalmente de acordo com o esperado em modelo de desnutrição, uma vez que a concentração plasmática desse hormônio correlaciona-se à quantidade e à qualidade nutricional da proteína da dieta (AMMANN, 2000; NOGUCHI, 2000).

6.2. Aspectos hematológicos

Em relação aos dados hematológicos, observamos um quadro de citopenia periférica, com redução significativa no número de hemácias e leucócitos no sangue de camundongos desnutridos. A redução no número de hemácias se refletiu na porcentagem do volume do hematócrito, que se mostrou reduzida no grupo experimental. A anemia dos animais desnutridos apresentou-se normocítica e normocrômica e foi evidenciada pela redução significativa da concentração de hemoglobina, porém, não é possível avaliar se essa redução é decorrente somente da menor quantidade de hemácias ou se há um comprometimento na síntese de hemoglobina. Considerando a porcentagem reduzida de reticulócitos nos animais desnutridos em relação aos animais controle, podemos afirmar que há comprometimento da eritropoese medular, o que justifica a anemia observada.

A leucopenia evidente nos animais desnutridos, além das alterações funcionais de macrófagos já estabelecidas em dados da literatura e em trabalhos anteriores do nosso grupo, poderia estar correlacionada ao aumento da susceptibilidade às infecções resultante dessa condição (SCHAIBLE, 2007; FOCK, 2007). No presente estudo, observamos redução significativa no número de linfócitos, neutrófilos segmentados e de monócitos, o que pode comprometer tanto a resposta imune inata quanto a adquirida.

Avaliando os compartimentos centrais de produção, medula óssea e baço, não observamos diferença significativa na celularidade do baço em camundongos desnutridos (na espécie murina o baço é um tecido hemopoético), porém, observamos redução significativa no número de linfócitos. A medula óssea, no entanto, apresentou-se hipoplásica, com redução significativa, de todas as linhagens hemopoéticas. Considerando a porcentagem de células tronco/progenitoras hemopoéticas (Lin⁻) obtidas após depleção imunomagnética, observamos redução significativa em camundongos desnutridos; da mesma forma, uma população ainda mais primitiva, as células tronco, ou seja, as Lin⁻ Sca1⁺c-Kit⁺, apresentou-se significativamente reduzida após a desnutrição. Esses resultados corroboram dados anteriores que demonstraram que a desnutrição protéica causa uma redução de progenitores hemopoéticos na medula e no baço, em especial, dos progenitores eritróides (BORELLI, 2007). Em suma, essa redução no número de células tronco hemopoéticas pode ser extremamente relevante se consideramos que esta é o ponto chave que regula a hemopoese, ou seja, é a partir dos processos de auto-renovação, diferenciação e proliferação desta célula que é mantida, em condições fisiológicas, a integridade do sistema hematológico.

6.3. Ciclo celular

Ao se avaliar perfil proliferativo das células tronco/progenitoras dos camundongos isogênicos, verificou-se que essa população celular, nos animais desnutridos, apresentou aumento na quiescência e no estágio inicial do ciclo celular (G1). Em outras palavras, aparentemente, a desnutrição acarretou em uma redução na proliferação das células Lin⁻

uma vez que a porcentagem de células em S/G2/M foi menor. Diversos estudos indicam que, em condições fisiológicas, as CTH entram no ciclo celular muito raramente e, portanto, encontram-se principalmente em G0 (BRADFORD, 1997; CHESHER, 1999; PASSEGUE, 2003); essas células mais primitivas apresentam ciclo celular mais prolongado quando comparado com seus progenitores mais comprometidos (NYGRERN, 2006). Em suma, as células mais comprometidas apresentam uma cinética de proliferação maior quando comparadas com as CTH mais primitivas, ou seja, proliferam mais, característica esta que, inclusive, as diferencia das células tronco (BONNET, 2002). Por essa razão, o aumento da população Lin⁻ em G0/G1 pode ser significativo para o quadro de hipoplasia medular se considerarmos que ao longo da hemopoese as células mais comprometidas/diferenciadas apresentam uma cinética de proliferação maior sendo, portanto, mais susceptíveis aos efeitos da desnutrição. De fato, Borelli et al. (2009) demonstrou a retenção da população de células totais da medula óssea em G0/G1 nos animais desnutridos e que, após tratamento mieloablativo com 5-Fluorouracil, a reconstituição do tecido hemopoético foi mais tardia.

Corroborando os dados da avaliação do perfil proliferativo, a análise de proteínas chaves na regulação do ciclo celular também indicou um comprometimento. As principais proteínas que regulam a transição entre as fases G1 e S, ou seja, ciclina D1, Cdk4, Cdk2, Cdc25a e ciclina E, apresentaram baixa expressão nas células tronco/progenitoras hemopoéticas dos animais desnutridos quando comparadas com as células dos animais controle. Essas proteínas são essenciais para a transição de G1 para S, uma vez que é o complexo ciclina D1/cdk4 que fosforila as proteínas da família do retinoblastoma (Rb) sendo que o Cdc25a é um dos ativadores desse complexo (a partir da desfosforilação dos sítios inibitórios da atividade quinase). A fosforilação das proteínas do retinoblastoma acarreta na ativação dos genes da família E2F, sendo que um dos principais produtos da transcrição é a ciclina E. Esta por sua vez dá início a fase S, formando o complexo ciclina E/cdk2 responsável pela hiperfosforilação das proteínas do retinoblastoma, resultando na transcrição de genes importantes para a duplicação do DNA. Portanto, com a redução de ciclina D1 e Cdk4 o complexo não é formado o que impede a fosforilação de Rb e mantém os genes da família E2F reprimidos, fato

coerente com os resultados observados, uma vez que a expressão de ciclina E está reduzida em camundongos desnutridos. Sem o complexo ciclina E/cdk2 as células ficariam retidas em G1 ou retornariam ao estado quiescente. Em contrapartida, as proteínas que inibem a progressão no ciclo, p21 e p27, apresentaram uma alta expressão nas células dos animais desnutridos. Tais dados indicam que há um comprometimento do controle molecular do ciclo celular e, se considerarmos que a regulação do ciclo se baseia em uma cascata de sinalização, a ativação mediada pela interação entre a célula e o microambiente medular é a primeira a ser afetada.

De fato, o marco inicial do ciclo celular é o balanço entre a proteína indutória ciclina D e a proteína inibitória p21, sendo que ambas são ativadas via MAPK ("Mitogen-activated protein kinase"), ou seja, a partir de estimulação externa mediada por fatores de crescimento e pela ativação de integrinas. Diversos estudos já demonstraram que a ativação da via de ERK1/2 é necessária para a transcrição do gene da ciclina D1 e a que a ativação sustentável é imprescindível para a transição de G1 para S (ALBANESE, 1995; LAVOIE, 1996; MELOCHE, 2007). Paradoxalmente, a ativação de ERK também é necessária para a ativação de p21 (BOTTAZZI, 1999; LIU, 1996), porém, ROOVERS (2000), demonstrou que a indução de ciclina D1 é mediada por uma ativação sustentável de ERK, enquanto que a indução de p21 é mediada por uma ativação transiente. Logo, estímulos parciais decorrentes de um comprometimento do microambiente medular podem não estar sendo suficiente para a total ativação da cascata de indução do ciclo, prejudicando a transição entre as fases G1 e S.

O microambiente medular é estritamente estruturado para regular a hemopoese, sendo que o controle da proliferação, diferenciação e auto-renovação das CTH é mediado pelo contato com células estromais, em especial osteoblastos, por fatores de crescimento e hormônios e pela adesão à matriz extracelular, principalmente a fibronectina. Nas células tronco/progenitoras hemopoéticas, os principais ligantes da fibronectina são as integrinas VLA-4 e VLA-5, as quais são constitutivamente expressas. Estas apresentam uma baixa afinidade pelo ligante, porém, essa ligação pode ser modulada a partir da formação de "clustering" das integrinas (favorecendo a avidez ao ligante) ou pela ativação das integrinas a partir de alterações conformacionais nos

domínios de ligação extracelular (favorecendo a afinidade pelo ligante) (SHATILL, 2010; CALDERWOOD, 2004; TAGAKI e SPRINGER, 2002), o que permite a ativação da via da MAPK e, em última instância de Erk1,2. Dessa forma, nos propusémos a avaliar a expressão de VLA-4 e VLA-5 nas células tronco/progenitoras hemopoéticas e verificamos que nos animais desnutridos houve maior população de células expressando tais receptores, principalmente, VLA-5. Curiosamente, quando avaliamos a expressão de VLA-4 e VLA-5 em células mais comprometidas, as CD34⁺, observamos um fenômeno inverso: os animais desnutridos apresentaram menor população celular expressando tais receptores quando comparado com os animais controle. É sabido que ao longo do processo de diferenciação e maturação das células hemopoéticas há uma modulação da expressão dessas integrinas, com a redução de sua expressão, principalmente de VLA-5. Ainda assim, VLA-4 é um importante receptor expresso na linhagem grânulo-monocítica e está envolvida no processo de mobilização dessas células para o sangue periférico. Portanto, o que podemos inferir é que em animais desnutridos a perda desses receptores é mais precoce em relação aos animais controle e, ainda, a perda de VLA-4 pode prejudicar o processo de mobilização celular. Paralelamente, a avaliação imunohistoquímica da medula óssea esternal de camundongos desnutridos demonstrou aumento no depósito de fibronectina em toda matriz extracelular, em especial, no subendósteo e na região perivascular, o que corrobora dados da literatura (VITURI, 2001).

Dessa maneira, em animais desnutridos temos uma maior quantidade do ligante (fibronectina) e mais células expressando o receptor - VLA-5 - porém, temos um comprometimento do ciclo celular. Há uma alteração da expressão de proteínas que controlam o ciclo celular, mas e a indução do ciclo? Como vimos, a indução do ciclo celular é mediada por estímulos externos à célula, seja via integrinas ou RTK's (receptores tirosina quinase), ativando a via da MAPK, sendo que a ativação de Erk1,2 leva à transcrição de ciclina D. Uma das formas de ativação de Erk1,2 é dependente da via FAK ("Focal adhesion kinase"), mediada pelas integrinas (GIANCOT, 1999). Em nosso modelo experimental observamos que em animais desnutridos há redução da expressão de FAK no forma fosforilada, ou seja, ativada, em células tronco/progenitoras hemopoéticas.

Avaliando-se uma segunda via de ativação integrina dependente, a partir das Rho GTPases, também foi observado um comprometimento de ativação nessa mesma população celular, sendo reduzida a expressão de Rac/cdc42 fosforilado e de RhoA em animais desnutridos. A ativação de Rho é importante para a progressão do ciclo celular, uma vez que a redução da atividade de ciclina E/cdk2 induzida pela dissociação da ligação entre fibronectina - integrina está associada com a redução de Rho. Ainda, a inibição de Rho, Rac e Cdc42 pode inibir a progressão da fase G1 de células aderentes (OLSON, 1995; DANEN, 2000), a partir da redução dos níveis de ciclina D e do aumento de p21 (OLSON, 1998; DANEN, 2000). Em outras palavras, aparentemente a sinalização mediada pela interação integrina-FN não está sendo eficaz para induzir o ciclo celular nas células tronco/progenitoras hemopoéticas. Isso é comprovado a partir da verificação de que essa população celular dos animais desnutridos apresentaram redução da expressão de Erk 1 (p42) e Erk 2 (p44) na forma fosforilada, ou seja, na forma ativa. Podemos supor, então, que a menor expressão de ciclina D em células de animais desnutridos é resultante de uma menor ativação da via da MAPK decorrente de alterações no microambiente medular. Ainda assim, como a maior expressão do receptor (as integrinas) e do ligante pode resultar em uma menor ativação das vias integrina dependentes (FAK e Rho GTPases) e, em última instância, de Erk1,2? Existem diversas hipóteses: (i) quantitativamente há uma aumento de fibronectina, porém, esta pode ser não funcional, com alterações estruturais que impeçam a interação ligante-receptor; (ii) o que determina a interação ao ligante é a afinidade do receptor, ou seja, numericamente as integrinas estão mais expressas, porém, podem apresentar uma baixa afinidade; (iii) a ativação de Erk1,2 também pode ser mediada por outros parâmetros como fatores de crescimento e hormônios.

A FN consiste em dímeros de, aproximadamente 250kDa, ligados entre si por pontes dissulfeto na porção C-terminal. Cada monômero consiste em três domínios de repetição - tipo I, II e III - sendo que cada um apresenta uma sequência de repetição específica. Apesar de as moléculas de FN serem produto de um único gene, a proteína resultante pode existir em diversas formas devido a "splincing" alternativos; em humanos há mais de 20 isoformas e em camundongos 12 (FRENCH-CONSTANT, 1995; WHITE et al,

2008). As isoformas de FN levam a diferenças funcionais, tendo sido observadas alterações na afinidade com as integrinas (FRENCH_CONSTANT, 1995). Além de possíveis alterações estruturais na molécula de FN, a deposição desta proteína na matriz também poderia influenciar a sinalização integrina-dependente. Isso porque, assim que os dímeros solúveis de FN são secretados, a estruturação em uma matriz fibrilar é essencial para a deposição da proteína, sendo que esse processo é mediado pela interação FN-integrina (MAO, 2005; LEISS, 2008). Essa estruturação da matriz de FN é regulada por vias de sinalização intracelular, principalmente mediada pelas Rho GTPases e FAK (SECHLER, 1997; GEIGER, 2001). Ou seja, a fibrilogênese da FN necessita da contractilidade do citoesqueleto de actina-miosina, o qual é estimulado pelas Rho GTPases. Essa contractilidade celular cria tensão suficiente para esticar os dímeros de FN solúveis (que são compactos), expondo, assim, sítios de ligação na molécula de FN (ZHONG, 1998; WIERZBICKA-PATYNOWSKI, 2003; HUVEENEERS, 2008; LEMMON, 2009). Se considerarmos que temos uma baixa expressão de RhoA, fosfo-Rac/cdc42 e fosfo-FAK em células de camundongos desnutridos, podemos inferir que talvez o processo de fibrilogênese não esteja ocorrendo de maneira adequada, prejudicando assim, a exposição dos sítios de ligação da molécula. Ainda, podemos acrescentar o fato de que dependendo do tipo de integrina que interage com a FN há a formação de uma matriz fibrilar diferente com propriedades funcionais diferentes: a integrina $\alpha 5 \beta 1$ (VLA-5) resulta em uma matriz fina e delgada enquanto que as integrinas αv resultam em uma matriz espessa e grosseira (LEISS, 2008). Essas diferenças decorrem do fato de que cada integrina (ou outro ligante como colágeno, que também colabora para o processo de fibrilogênese) apresenta um sítio de ligação específico na molécula de FN, induzindo a um processo de polimerização peculiar (MAO, 2005). De maneira geral, essa estruturação da matriz de FN é essencial para a exposição de sítios de ligação da molécula de forma a permitir a ancoragem celular à matriz, mediando processos como migração e proliferação (HYNES e ZHAO, 2000).

Esses processos de migração e proliferação celular decorrem de uma sinalização bidirecional mediada pelas integrinas, apresentando diferentes funções biológicas: "inside-out" e "outside-in". Na primeira, ativadores intracelulares ligam-se à porção

citoplasmática β -integrina, acarretando em alterações conformacionais resultando no aumento da afinidade pelo ligante ("ativação" da integrina). Basicamente, o que modula a sinalização "inside-out" é a interação entre a proteína talina e o domínio citoplasmático β -integrina. Diversos efetores que medeiam essa interação foram estudados, entre eles as Ras GTPases, as quais são ativadas a partir da interação entre fatores de crescimento e as RTK's (MARSHAL 1996; KINBARA, 2003). De fato, fatores de crescimento como IL3, SCF e GM-CSF já foram descritos como moduladores da afinidade (bem como da expressão) de VLA-4 e VLA-5 em células hemopoéticas (LEVESQUE, 1995; KOVACH, 1995; GIET, 2001). A sinalização "inside-out" controla a força da adesão e possibilita uma interação forte suficiente entre célula-matriz extra celular capaz de regular os processos de migração celular e estruturação da matriz (a exemplo da fibronectina). A sinalização "outside-in" ocorre a partir da ligação da integrina ao seu ligante, o que também acarreta em alterações conformacionais no receptor, porém, neste caso, aumentado a interação entre os heterodímeros de FN levando à formação de "clusters". Com isso, inicia-se o processo de sinalização intracelular que controla a expressão gênica e, consequentemente, a proliferação celular. Apesar de serem conceitos opostos, esses dois mecanismos estão intimamente correlacionados, uma vez que a sinalização "inside-out" pode favorecer a sinalização "outside-in" e vice-versa. Em suma, podemos afirmar que, ainda que haja FN e seu receptor - VLA-5 - em camundongos desnutridos, a interação está comprometida, seja devido a alterações conformacionais da molécula de FN, ou até mesmo de estruturação da matriz fibrilar, seja pela falta de afinidade do receptor, devido a ausência das sinalizações "inside-out" e "outside-in". Isso pode ser comprovado pela redução da expressão de proteínas sinalizadoras das vias integrina-dependentes observado em células tronco/progenitoras hemopoéticas de camundongos desnutridos.

Além da interação entre célula-MEC, as interações entre célula-fatores de crescimento e célula-estroma celular também são imprescindíveis para a regulação da hemopoese. Por essa razão, outro objetivo do nosso trabalho foi a avaliação quantitativa de células estromais e a produção de citocinas a partir destas. Para isso, utilizamos o modelo de CFU-U (unidade formadora de colônia de fibroblasto). Em 1968, Friedenstien

e colaboradores reportou a presença de células não hemopoéticas na medula óssea, capazes de aderirem a uma superfície plástica e que apresentavam uma morfologia típica de fibroblastos. Descreveu, portanto, uma população multipotente capaz de se diferenciar em adipócitos, condrócitos e osteócitos - as células tronco mesenquimais. Além de fornecer uma estrutura celular de suporte e de sinalização, a partir dessa população celular são produzidos fatores de crescimento que modulam a hemopoese sendo, portanto, um excelente modelo para se avaliar a integração entre estroma e células tronco/progenitoras hemopoéticas. No presente estudo, observou-se que em camundongos desnutridos a proliferação de células estromais é mais tardia, o que poderia prejudicar sua interação com as células hemopoéticas. Ainda, verificamos que a produção de algumas citocinas, a partir das CFU-F, importantes para a proliferação de células tronco/progenitoras estava comprometida, ou seja, encontramos menor concentração de IL3, IL6, IL10, GM-CSF. Também observamos menor porcentagem de células tronco/progenitoras hemopoéticas expressando os receptores para IL3 (CD123) e SCF (CD117) em animais desnutridos. Essa redução de citocinas e da expressão de CD123 e CD117 poderia, juntamente com as alterações previamente descritas relativas à sinalização das integrinas, comprometer a sinalização de indução do ciclo celular, resultando em uma baixa expressão de ERK1,2 na forma ativa. Ainda, integrando as vias de sinalizações, a redução de IL3 e GM-CSF poderia comprometer a afinidade das integrinas via uma cascata "inside-out", prejudicando ainda mais a indução do ciclo.

Em vista da redução, *in vivo*, da proliferação das células tronco/progenitoras hemopoéticas dos animais desnutridos, nossos estudos *ex vivo* demonstraram que sob estímulos adequados, promovidos por fatores de crescimento e uma matriz de fibronectina, essas mesmas células dos animais desnutridos respondem de forma similar às células dos animais controle. Na cultura suplementada com os fatores de crescimento IL3, IL6 e SCF, os quais são importantes para induzir a proliferação dessa população celular (BONNET, 2002; KEIL et al, 2002; EMA et al, 2000), verificou-se que a celularidade após 3 e 5 dias de cultivo foi similar entre os grupos controle e desnutrido seja sobre uma matriz de fibronectina ou de BSA e, como o esperado, na ausência de fatores de crescimento as células de ambos os grupos não proliferaram. Os resultados

também indicam que, tanto para o grupo controle quanto para o grupo desnutrido, a proliferação das células é intensificada quando se compara o cultivo sobre uma matriz de fibronectina com o cultivo sobre uma superfície de BSA. A maior proliferação sobre uma matriz de fibronectina em relação a de BSA corrobora estudos anteriores nos quais sugerem que a presença de fatores de crescimento, como IL3 e SCF, aumentam a afinidade de VLA-4 e VLA5 pela fibronectina (apesar de não alterar a expressão dos mesmos) e que a adesão da célula a essa proteína está intimamente ligada aos estágios finais do ciclo celular, S/G2/M (GIET, 2001, 2002). Em outras palavras, aparentemente, a adesão das células à fibronectina intensifica a estimulação promovida pelos fatores de crescimento, uma vez que permite uma ativação mais eficiente do complexo ciclina D/Cdk4,6 e ciclina E/Cdk2 induzindo a célula a passar da fase G1 para a fase S (BOONSTRA, 2003). Também verificamos que as células dos animais desnutridos aderiram à matriz de fibronectina no terceiro dia de cultura tanto quanto as células dos animais controle, porém, a adesão celular foi reduzida para ambos os grupos possivelmente porque no quinto dia de cultivo as condições ótimas não foram mantidas e as células podem ter se soltado precocemente devido a falta de nutrientes.

Em resumo, avaliando-se as células tronco/progenitoras hemopoéticas de camundongos desnutridos observamos redução do perfil proliferativo, com redução da expressão de proteínas reguladoras (ciclina D, ciclina E, cdk2, cdk4, Cdc25a e PCNA) e aumento da expressão de proteínas inibitórias (p21 e p27) do ciclo celular. Já a sinalização de indução do ciclo celular, mediado por estímulos externos, também se apresentou comprometida em células de animais desnutridos, com uma baixa expressão de fosfo-FAK, fosfo-Rac/cdc42, RhoA e, principalmente, de fosfo-ERK1/2. Avaliando-se, então, o microambiente medular, observamos um aumento no depósito de FN, que ainda assim não resultou na ativação da cascata de sinalização integrina-dependente, e uma redução da produção de citocinas (IL3, IL6, IL10 e GM-CSF) que regulam a proliferação celular. Dessa forma, podemos inferir que as alterações no microambiente estão comprometendo a sinalização celular, resultando em uma parada no ciclo celular, levando à hipoplasia medular e à citopenia periférica. No entanto, sob condições ótimas, fornecendo-se uma matriz de FN e fatores de crescimento, as células retornam a

proliferação de maneira satisfatória, sugerindo que o controle molecular de indução e de regulação do ciclo celular permanecem responsivos, ou seja, aparentemente não há um comprometimento intrínseco à célula.

A partir de tais achados, podemos traçar um paralelo em relação à clínica em humanos: a questão de transplantes medulares. Em casos clínicos em que há a necessidade de transplantes medulares, os indivíduos geralmente apresentam algum grau de comprometimento nutricional (RZEPECKI, 2007; MURRAY, 2009), o que poderia levar a alterações no microambiente medular, como a que observamos em nosso modelo. Podemos sugerir, então, que a desnutrição é um indicativo de mal prognóstico em casos de transplantes medulares, uma vez que, há a possibilidade de não haver o enxertamento das células doadas devido às interações entre um microambiente alterado do indivíduo transplantado e as células hemopoéticas do doador. Considerando que é o microambiente que sinaliza à célula a promover os processos de proliferação e diferenciação, a presença de uma célula saudável não garantiria o sucesso do transplante. Por essa razão, nessas condições o status nutricional do indivíduo também seria um fator de risco.

6.4. Recuperação nutricional

No presente estudo, avaliamos o processo de recuperação nutricional com o intuito de verificar se as alterações hematológicas em camundongos desnutridos são revertidas. Aparentemente, o compartimento periférico é normalizado, sendo que verificamos aumento quantitativo no número de hemácias e leucócitos e na concentração de hemoglobina, confirmando que o quadro de anemia e leucopenia é revertido após a renutrição. No principal compartimento central, a medula óssea, observamos um retorno na celularidade, e a normalização do número de células Lin⁻. Porém, a porcentagem de células tronco, ou seja, as Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺, embora tenha aumentado não diferiu estatisticamente em relação ao grupo desnutrido no período estudado, sugerindo que a auto-renovação seja um processo mais lento. Em outras palavras, possivelmente o organismo prioriza o restabelecimento do "pool" de células mais maduras em detrimento das células tronco, de forma a manter as condições fisiológicas do sistema.

Se a celularidade retorna à normalidade, é de se esperar que o ciclo celular das células tronco/progenitoras hemopoéticas esteja aumentado em relação ao grupo desnutrido. De fato, a porcentagem de células Lin⁻ em G0/G1 de camundongos renutridos igualou-se ao seu respectivo grupo controle, sendo significativamente menor em relação ao grupo desnutrido. Ou seja, a porcentagem de células nas fases proliferativas, S/G2/M, foi significativamente maior no grupo renutrido quando comparado com o grupo desnutrido. Logo, entende-se que o aumento da proliferação das células tronco/progenitoras refletiu-se no restabelecimento numérico das células hemopoéticas, tanto no compartimento central quanto no periférico. Ainda, corroborando os dados do perfil proliferativo, a expressão das proteínas regulatórias do ciclo celular nas células tronco/progenitoras de camundongos renutridos também se igualou ao seu respectivo grupo controle, sendo que verificamos um aumento na expressão de ciclina D e ciclina E em relação ao grupo desnutrido. Curiosamente, a expressão de cdk2 e cdk4 permaneceu baixa, não sendo revertida após a recuperação nutricional. Podemos inferir, portanto, que tais proteínas não são fatores limitantes para a progressão do ciclo celular sendo que concentrações mínimas são capazes de levar a formação do complexo com as respectivas ciclinas e, enfim, causar a fosforilação das proteínas do retinoblastoma. Em relação à expressão da proteína inibitória p27, observamos que após a recuperação nutricional há uma redução significativa em relação ao grupo desnutrido, fato que não se repetiu com a proteína p21, uma vez que esta permaneceu similar ao grupo desnutrido.

Considerando os dados preliminares em relação a recuperação nutricional podemos afirmar que esta é eficaz para a normalização das alterações hematológicas, se considerarmos em termos quantitativos. Porém, existem alguns pontos que a recuperação nutricional não conseguiu reverter, pelo menos não no período estudado: o número de células tronco e a expressão de algumas proteínas que regulam o ciclo celular. Tais parâmetros, contudo, não foram limitantes para o restabelecimento do sistema hematológico como um todo, então, podemos afirmar que a recuperação nutricional é um protocolo importante e relevante no contexto de saúde pública. Por outro lado, outras avaliações terão de ser realizadas para a completa elucidação da reversão do

comprometimento do microambiente medular decorrentes da desnutrição. Em especial, a avaliação estrutural da MEC, principalmente em relação à FN, a produção de citocinas e a expressão de integrinas e RTK's após a recuperação nutricional.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nos mostram um dos possíveis mecanismos pelo qual a desnutrição protéica afeta, em termos quantitativos, o sistema hemopoético. As células tronco/progenitoras hemopoéticas de animais desnutridos apresentam um comprometimento do ciclo celular, *in vivo*, quando comparado com animais saudáveis. Não só há alterações no controle molecular do ciclo celular, como também há um comprometimento da principal via de indução do ciclo: a via da MAPK. Com isso, podemos inferir que esse comprometimento da proliferação de células tronco/progenitoras hemopoéticas pode ser um dos grandes responsáveis pela hipoplasia medular e conseqüente citopenia periférica observada em modelos de desnutrição.

Podemos sugerir que tal controle está alterado devido ao comprometimento do microambiente medular de camundongos desnutridos observado no presente estudo. Esse comprometimento afeta a sinalização celular, reduzindo os estímulos necessários para o controle de proliferação e talvez, de diferenciação e auto-renovação das células tronco/progenitoras. Além disso, as células de animais desnutridos respondem de forma adequada quando estimuladas para a indução do ciclo celular. Logo, o fornecimento de quantidades adequadas de fatores de crescimento e de uma matriz de fibronectina, mimetizando *ex vivo* um microambiente íntegro, estimula as células de animais desnutrido a entrarem em ciclo, de forma que todo o mecanismo intracelular de controle do ciclo, aparentemente, não foi comprometido.

Já em relação à recuperação nutricional os resultados preliminares demonstraram que, pelo menos para os parâmetros avaliados, tal procedimento é eficaz na reversão das alterações causadas pela desnutrição. Contudo, estudos estruturais mais detalhados em relação ao microambiente medular são necessários para a confirmação dos dados aqui apresentados.

8. REFERÊNCIAS

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

AKASHI K; KONDO M; CHESHER S; SHIZURO J; GANDY K; DOMEN J; MEBIOS R; TRAVER D; WEISSMAN IL. Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1999;64:1-12.

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

ALAHARI, S. K.; REDDIG, P. J.; JULIANO RL. Biological aspects of signal transduction by cell adhesion receptors. *Int Rev Cytol*. 2002;220:145-84.

ALESSI DR; SAITOY; CAMPBELL DG; COHEN P; SITHANANDAM G; RAPP U; et al. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J* 13: 1610-1619, 1994.

ALT JR, GLADDEN AB, DIEHL JA. p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export. *J Biol Chem*. 2002 Mar 8;277(10):8517-23.

AMMANN, P; BOURRIN, S; BONJOUR, JP; MEYER, JM; RIZZOLI, R. Protein undernutrition-induced bone loss is associated with decreased IGF-I levels and estrogen deficiency. *J Bone Miner Res* 2000; 15(4): 683-90.

ARAI, F. Regulation of Hematopoietic Stem by the niche . *TCM*. V.15(2), 2005

ARMSTRONG, L; STOJKOVIC, M; DIMMICK, I; AHMAD, S; STOJKOVIC, P; HOLE, N; LAKO, M. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor

cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem cells* 22: 1142-1151, 2004.

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

AUMAILLEY, M; GAYRAUD, B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* 76 (3-4): 253-265. 1998.

BALAZS, AB.; FABIAN, AJ.; ESMON, CT.; MULLIGAN, RC. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood* 107(6): 2317-2321. 2006.

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, 1997. p. 1273-1277

BECK, B; DOLLET, J-M, MAX, JP (1989). Refeeding afther various times of ingestion of a low protein diet: effects on food intake and body weigth in rats. *Physiol. Behav.* 45: 761-765.

BECKER PS; NILSSON SK; LI Z; BERRIOS V; DOONER MS; COOPER CL; HSIEH CC; QUESEMBERRY PJ, 1999. Adhesion receptor by hematopoietic cell lines and murine progenitors: modulation by cytokines and cell cycle status. *Experimentaol Hematology*, 27: 533-541.

BERKOWITZ, F. E. Infections in children with severe protein-eenergy malnutrition. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Baltimore, v.11, p.750-9, 1992.

BLAIN, S. W.; MONTALVO, E.; MASSAUGLE, J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p27^{Kip1} with cyclinA-CDK2 and cyclinD2-CDK4. *J. Biol. Chem.* v.25863-25872, 1997.

BONNET, D. Haematopoietic stem cells. *J. Pathol.* 197: 430-440, 2002.

BONDEVA T; BULGARELLI-LEVA G. Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinase PKB and MAPK. *Sciences* 282: 293-296, 1998.

BOONSTRA J. Progression through the G1-phase of the on-going cell cycle. *J. Cel. Biochem.* 90: 244-252 (2003).

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

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

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

BORELLI, P.; FOCK, R. A.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; BEUTLER, B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G. Reduction do erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *British Journal Nutrition*, v 97: 307-314, 2007.

BORELLI, P; BARROS, FEV; NAKAJIMA K; BLATT SL; BEUTLER B; PEREIRA, J; TSUJITA M; FAVERO, GM; FOCK, RA. Protein energy malnutrition halts hemopoietic

progenitors cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Braz. J. Med. Biol. Res.* V42: 523-530, 2009

BORSATO, E. Desnutrição protéica: avaliação *in vitro* da capacidade proliferativa de progenitores grânulo-monocíticos da medula óssea de camundongos. 1999 (Tese de mestrado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo.

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

BRADFORD, GB.; WILLIAMS, B.; ROSSI, R.; BERTONCELLO, I. Quiescence, cycling and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp. Hematol.* 25:445-453, 1997

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

BRYDER, D; ROSSI, DJ; WEISSMAN, IL. Hematopoietic stem cell. Paradigmatic tissue-specific stem cell. *The Am. J. of Pathology.* V 169(2), p338-346, 2006.

BURKE P; SCHOOLER K; WILEY HS. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol Biol Cell* 12: 1897-1910, 2001.

CALDERWOOD, DA. Integrin activation. *J. Cell Sci.* v117: 657-666, 2004

CALVI, LM; ADAMS, GB; WEIBRECHER, KW; WEBER, JM; OLSON, DP; KNIGHT, MC; MARTIN, RP; SCHIPANI, E; DIVIETI, P. Osteoblastic cells regulate the hematopoietic stem cell niche. *Nature.* V425(6960) p 841-846, 2003.

CAREGARO, L; FAVARO, A; SANTONASTASO, P; ALBERINO, F; DI PASCOLI, L; NARDI, M; FAVARO, S; GATTA, A. Insulin-like growth factor I (IGF-I), a nutritional marker in patients with eating disorders. *Clin Nutr* 2001; 20(3): 251-57.

CAULFIELD LE, DE ONIS M, BLÖSSNER M. Undernutrition as an underlying cause of child deaths associated with diarrhea, pneumonia, malaria, and measles. *Am J. Clin Nutr* 2004;80:193-8.

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

CHANDRA, RK. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am. J. Clin. Nutri.*, Bethesda, v.53, p.1087-101, 1991.

CHANDRA, RK. Nutritional regulation of immunity: an introduction. *Nutrition and immunology*. Alan R Liss, Inc, 1988. p. 1-8.

CHAUDHARY A; KING WG; MATTALIANO MD; et al. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates Raf1 through Pak phosphorylation of serine 338. *Curr Biol* 10: 551-554, 2000.

CHENG M, OLIVIER P, DIEHL JA, FERO M, ROUSSEL MF, ROBERTS JM, SHERR CJ. The p21(Cip1) and p27(Kip1) CDK 'inhibitors' are essential activators of cyclin D-dependent kinases in murine fibroblasts. *EMBO J*. 1999 Mar 15;18(6):1571-83.

CHEN, Q; KINCH, MS; LIN, TH, BURRIDGE, K; JULIANO, RL. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J. Biol Chem* 1994, 269: 26602-26605.

CHESHIER, SH.; MORRISON SJ.; LIAO, X.; WEISSMAN IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96: 3120-3125, 1999.

CHIU VK; BIVONA T; HACH A; SAJOUS JB; SILLETTI J; WIERNER H, et al. Ras signaling on the endoplasmatic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* 4: 343-350, 2002.

CHRISTENSEN, JL; WEISSMAN, IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:14541-14546, 2001.

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

COTRAN, RS *et al.* Red cells and bleeding disorders. In: Robbins, pathologic basis of disease, 6^a ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1999, p. 403-457.

CRACE, CJ; SWEENE, I; MILNER, RD. Long-term effects on glucose tolerance and insulin secretory response to glucose following a limited period of severe protein or energy malnutrition in young rats. *Ups J Med Sci* 1991; 96(3): 177-83.

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

DANEN EH, SONNEVELDP; SONNEMBERG A. Dual stimulation of Ras/mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell cdhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression. *J Cell Biol* 151: 1413-1422, 2000.

DE ANGELIS, RC. Desnutrição calórico-protéica (Má nutrição calórico-protéica). Fisiologia da nutrição. v. 2. 3ª ed. São Paulo: Editora Nobel, 1986. p. 38-56.

DACIE, J.V. LEWIS, S.M. Practical Haematology 8 ed. New York, p.57-58, 1995.

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

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

DU, F; HIGGINBOTHAM, A; WHITE, BD. Food intake, energy balance and serum leptin concentrations in rats fed low-protein diets. *J. Nutr.* 130: 514-521. 2000

DYSON N. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998 Aug 1;12(15):2245-62. Review

EKHOM SV; REE, SI. Regulation of G1 cyclin dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:676-684, 2000.

EMA H; TAKANO H; SUDO K; NAKAUCHI H. (2000) In vitro self renewal division of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192(9): 1281-1288.

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

EWEN ME, SLUSS HK; WHITEHOUSE LL; LINVINGSTON DM. TGF beta inhibition of Cdk4 synthesis is linked to cell cycle arrest. *Cell*. 1993 Sep 24;74(6):1009-20.

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

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, 2009

FOCK, RA; VINOLO, MAR; ROCHA, VMS; ROCHA, LCS; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition decreases expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF- α in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine* 2007; 40: 105-14.

FRIEDENSTEIN AJ. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* v6: 230-247, 1968

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

FROST JA; STEEN H; SHAPIRO P; et al. Cross-cascade activation of ERKs and ternary complex factors by Rho family proteins. *EMBO J* 16: 6426-6438, 1997.

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

GARCIA, P. B. Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica: análise da mobilidade celular e da hemopoese. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1992.

GARNETT MJ; RANA S; PATERSON H; BARFORD D; MARAIS R. Wild-type and mutant B-RAF activate C-RAF through distinct mechanism involving heterodimerization. *Mol Cell* 20: 963-969, 2005.

GEIGER, B; BERSHADSKY, A; PANKOV, R; YMADA, KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V2: 793-805, 2001

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

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

GIANCOTTI, FG; RUOSLAHTI. Integrin signaling. *Sciences* v285, 1999.

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

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

GRIMBLE, KF. Cytokines: their relevance to nutrition. *Eur J Clin Nutr* 1989; 43: 14564-8.

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

GROVER Z; EE LC. Protein energy malnutrition. *Pediatric Clin North Am.* 2009;56(5):1055-58.

GUAN JL. Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol* 16:195-200, 1997.

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

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. Chromatin remodeling and Rb activity. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Dec;12(6):685-9.

HARBOUR, J. W.; DEAN, D. C. Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat Cell Biol.* 2000 Apr;2(4):E65-7.

HOWE AK; JULIANO RL. Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol* 2: 593-600, 2000.

HSIEH, T.; HALICKA, D.; LU, X.; KUNICKI, J.; GUO, J.; DARZYNKIEWICZ, Z; WU, J. M. Effects of resveratrol on the G0-G1 transition and cell cycle progression of mitogenically stimulated human lymphocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 297:1311-1317, 2002

HUANG LZ; FRAKER PJ. Chronic consumption of a moderately low protein diet does not alter hematopoietic processes in young adult mice. *J. Nutr.* 133:1403-1408. 2003

HULLEMANN, E.; BOONSTRA, J. Regulation of G1 phase progression by growth factors and the extracellular matrix. *Cell. Mol. Life Sci.* v.58, p.80-93, 2001.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA

HUVENEERS, S; FASSIER, R; DANEN, EHJ. Binding of soluble fibronectin to integrin $\alpha 5 \beta 1$ -link to focal adhesion redistribution and contractile shape. *J. Cell Sci.* v121: 2452-2462, 2008

HYNES, RO; ZHAO,Q. The evolution of cell adhesion. *J. Cell. Biol.* V150: f89-f96, 2000.

IWASAKI, H; AKASHI, K. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene.* V26, p 6687-6696, 2007

JIANG X; SORKIN A. Coordinating traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor endocytosis visualized in living cell. *Mol Biol Cell* 13: 1522-1535, 2002.

JONES, R.J.; WAGNER, JE; CELANO, P; ZICHA, MS; SHARKIS, SJ. Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature* 347: 188-189, 1990.

JOOSTEN KFM, HULST JM. Prevalence of malnutrition in paediatric hospital patients. *Curr Opin Pediatr* 2008;20:590-6.

JULIANO, R. Movin' on through with Cdc2. *Nat Cell Biol.* 2003 Jul;5(7):589-90.

KAY, HE. How many cell-generations? *Lancet.* 418-9, 1965.

KEENAN SM; LENTS NH; BALDASSARE JJ. Expression of cyclin E renders cyclin D-CDK4 dispensable for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor protein, activation of E2F, and G1-S phase progression. *J Biol Chem.* 2004 Feb 13;279(7):5387-96.

KEIL F; ELAIHI F; GREINIX HT; FRITSCH G; LOUDA N; PETZER AL; PRINZ E; WAGNER T; KALHS P; LECHNER K; GEISSLER K. (2002) Ex vivo expansion of long term culture initiating marrow cellsby IL10, SCF, and IL3. *Transfusion* 42: 581-587.

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

KIM, M; TUMQUIST, H; JACKSON, J *et al*. The multi-drug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is over expressed in hematopoietic stem cells. *Clin. Cancer Res.* 8: 22-28, 2002.

KINBARA, K; HENSEN, LE; CHOU, FL; GISBERG, MH. Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat. Rev. Mol Cell Biol.* V4: 767-776. 2003

KING AJ; SUN H; DIAZ B; *et al*. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396: 180-183.

KLEIN, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia.* 1995 Sep 29;51(9-10):914-26.

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

KOVACH, NL; LIN N; BROUDY, VC. Stem cell factor modulates avidity of VLA-4 and VLA-5 integrins expressed on hematopoietic cell lines. *Blood.* V85: 159, 1995.

LABAER J, GARRETT MD, STEVENSON LF, SLINGERLAND JM, SANDHU C, CHOU HS, FATTAEY A, HARLOW E. New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors. *Genes Dev.* 1997 Apr 1;11(7):847-62.

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

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

LEMISCHKA, I.R.; RAULET, D.H.; MULLIGAN, R.C. Developmental potential and dynamic behavior of hematopoietic stem cells. *Cell* 45: 917-927 (1986)

LEMMON, CA; CHEN, CS; ROMER, LH. Cell traction forces direct fibronectin matrix assembly. *Biophys. J.* V 96: 729-738, 2009.

LEVESQUE, JP; LEVESQUE, DI; SIMMONS PJ. Cytokines increase human hematopoietic cell adhesiveness by activation of VLA-4 and VLA-5 integrins. *J. Exp. Med.* V181: 1805, 1995.

LIU B. P; BURRIDGE K. Vav2 activates Rac1, cdc42, and RhoA downstream from growth factor receptors but not beta 1 integrins. *Mol Cell Biol* 20: 7160-7169, 2000.

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

LUNDBERG AS; WEINBERG RA. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Mol Cell Biol.* 1998 Feb;18(2):753-61.

MAIA MM, FAUSTO MA, VIEIRA EL. The prevalence of malnutrition and its risk factors in children attending outpatient clinics in the city of Manaus, Amazonas, Brazil. *Arch Latinoam Nutr* 2008;58:234-40.

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

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

MARSHALL, CJ. Ras effectors. *Curr. Opin. Cell Biol.* V8: 197-204, 1996

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

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

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

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

MOR A; PHILIPS MR. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol*. 24: 771-800, 2006

MORINO, N; MIMURA T; HAMASAKI K; TOBE K; UEKI K; KIKUCHI K; TAKEHARA K; KADOWAKI T; YAZAKI Y; NOJIMA Y; Matrix/integrin interaction activates the mitogen activated protein kinase p44erk-1 and p42erk-2. J Biol Chem 1995, 270:269-273.

MORITA Y; EMA, H; YAMAZAKI, S; NAKAUCHI, H. Non-side population hematopoietic stem cells in mouse bone marrow. Blood 108: 2850-2856, 2006.

MORRISON SJ; WANDYCH, AM; HEMMATI, HD; WRIGHT, DE; WEISSMAN, IL. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. Development. 124: 1929-1939, 1997.

MURAOKA RS, LENFERINK AE, LAW B, HAMILTON E, BRANTLEY DM, ROEBUCK LR, ARTEAGA CL. ErbB2/Neu-induced, cyclin D1-dependent transformation is accelerated in p27-haploinsufficient mammary epithelial cells but impaired in p27-null cells. Mol Cell Biol. 2002 Apr;22(7):2204-19.

MURRAY, SM; PINDORA, S. Nutrition support for bone marrow transplant patients. Cochrane Database Syst. Rev. v21(1), 2009

NAGATA, T; TOBITANI, W; KIRIIE, N; IKETANI, T; YAMAGAMI, S. Capacity to produce cytokines during weight restoration in patients with anorexia nervosa. Psychosom Med 1999; 61: 371-7.

NAKORN, TN; TRAVER, D; WEISSMAN, IL; AKASHI, K. Myeloid-restricted progenitors are sufficient to confer radioprotection and provide the majority of day 8 CFU-S. J. Clin Invest. 109 (12): 1579-1585, 2002.

NEVINS JR. The Rb/E2F pathway and cancer. Hum Mol Genet. 2001 Apr;10(7):699-703

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

NIMNUAL AS; YATSULA BA; BAR-SAGI D. Coupling of Ras and Rac guanosine triphosphatases through the ras exchanger Sos. *Science* 279: 560-536, 1998.

NOGUCHI, T. Protein nutrition and insulin-like growth factor system. *Br J Nutr* 2000; 84 (Suppl 2): S241-44.

NORMAN, K; PICHARD, C; LOCHS, H; PIRLICH, M. prognostic impact of disease-related malnutrition. *Clinical Nutrition* v27, p5-15, 2008.

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

NYGREN, JM.; BRYDER, D; JACOBSEN, SEW. Prolonged cell cycle transit is a defining and developmentally conserved hemopoietic stem cell property. *J. Immunol.* 177:201-208, 2006.

OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood.* v.84, p.2844-53, 1993.

OGAWA, M. Hematopoietic stem cells: Stochastic differentiation and humoral control of proliferation. *Env. Health Perspc.* 80:199-207, 1989.

OLIVEIRA, JED; MARCHINI, JS. Ciências Nutricionais. 1ed. Sarvier; 1998. p.41-70.

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

OLSON MF; ASWORTH A; HALL A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* 269: 1270-1272, 1995.

OLSON MF; PATERSON HF; MARSHALL CJ. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* 394: 295-299, 1998.

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

ORTEGA S, MALUMBRES M, BARBACID M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Mar 14;1602(1):73-87.

OSAWA, M; HANADA, K; HAMADA, H; NAKAUCHI, H. Long term lymphohematopoietic reconstituting by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273:242-245, 1996.

PALACIO, A; LOPEZ, M; PEREZ-BRAVO, F; MONKEBERG, F; SCHLESINGER, L. Leptin levels are associated with immune response in malnourished infants. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(7): 3040-6.

PARSONS JT; PARSONS SJ. Scr family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factors and adhesion signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 187-192, 1997.

PASSEGUE, E; JAMIELSON, CH; AILLES, LE; WEISSMAN, IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100(1): 11842-11849, 2003

PAWELLEK I, DOKOUPIL K, KOLETZKO B. Prevalence of malnutrition in paediatric hospital patients. *Clin Nutr* 2008;27:72-6.

PEARCE, DJ.; RIDLER, CM.; SIMPSON, C.; BONNET, D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. *Blood* 103: 2541-2546, 2004.

PIMIENTA G; PASCUAL J. Canonical and alternative MAPK signaling. *Cell Cycle* 2007, 6:21; 2628-2632.

PLOWMAN SJ; HANCOCK JF. Ras signaling from plasma membrane and endomembrane microdomains. *Biochim Biophys Acta* 1746: 274-283, 2005.

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

QUESENBERRY,P.J.; COLVIN, GA; LAMBERT, JF. The chiaroscuro stem cell: a unified stem cell theory., *Blood* 100(13):4266-271,2002

QUESEMBERRY, PJ; ABEDI, M; DOONER, M; COLVIN, G; SANCHES-GUIJO, FM; ALIOTTA, J; PIMENTEL, J; DOONER, G; GREER, D; DEMERS, D; KEANEY, P; PETERSON, A; LUO, L; FOSTER, B. The marrow cell continuum: stochastic determinism. *Flia Histochem et cytobiol.* V43 (4), p187-190, 2005

QUESENBERRY PJ, COLVIN GA, ABEDI M, DOONER G, DOONER M, ALIOTTA J, KEANEY P, LUO L, DEMERS D, PETERSON A, FOSTER B, GREER D. [The stem cell continuum](#). *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Jun;1044:228-35.

QUESENBERRY, PJ. The continuum model of marrow stem cell regulation. *Cur. Opin. Hematol.* v13: 216-221, 2006.

RAMEH LE; ARVIDSSON A; CARRAWAY KL; et al. A comparative analyses of the phosphoinositide binding specificity of pleckstrin homology domains. *J Biol Chem* 272: 22059-22066, 1997.

RAYMAN JB; TAKAHASHI Y; INDJEIAN VW; DANNENBERG JH; CATCHPOLE S; WATSON RJ; RIELE H; DYNLACHT BD. E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* 2002 Apr 15;16(8):933-47.

REENSTRA, W. R.; ORLOW, D. L.; SVOBODA, K. K. ECM-stimulated signaling and actin reorganization in embryonic corneal epithelia are Rho dependent. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002 Oct;43(10):3181-9.

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

RENSTRÖM, J; How the niche regulates hsc - *Chemico-Biological Interactions.* v184, p 7 15, 2010.

REYNOLDS, JV; REDMOND HP; UENO N; STEIGMAN C; ZIEGLER MM; DALY JM; JONHSTON RB Jr. Impairment of macrophage activation and granuloma formation by protein deprivation in mice. *Cell Immunol.* 1992 Feb;139(2):493-504

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

ROBERTS, A. W.; METCALF, D. Noncycling state of peripheral blood progenitor cells mobilized by granulocyte colony-stimulating factor and other cytokines. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1600-5.

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

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

ROUSSEL MF. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. *Oncogene.* 1999 Sep 20;18(38):5311-7.

RUAS M; PETERS G. The p16INK4a/CDKN2A tumor suppressor and its relatives. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Oct 14;1378(2):F115-77.

RUSHWORTH LK; HINDLEY AD; O'NEIL E; KOLCH W. Regulation and role of Raf-1/B-Raf heteroimerization. *Mol Cell Biol* 26: 2262-2272, 2006.

RZEPECKI, P; BARZAL, J; SZCYLIK, C. Which parameters of nutritional status should we choose for nutritional assessment during hematopoietic stem cell transplantation? *Transp. Proceed.* V39: 2902-2904, 2007

SATO, T; LAVER, JH; OGAWA, M. Reversible expression of CD34 by murine hematopoietic stem cells. *Bood* 94:2548-2554, 1999

SCHAFER, K, A. The Cell Cycle: A Review. *Vet. Pathol.* v. 35, p.461-478, 1998.

SCHAIBLE, UE; KAUFMANN, SHE. Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts. *PLOS medicine*. v4 (5) p806-812, 2007.

SCHLAEPFER DD; HANKS SK; HUNTER T; et al. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binning to focal adhesion kinase. *Nature* 372: 786-791, 1994.

SCHOFIELD R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978;4:7-25

SCHWARTZ MA; ASSOIAN RK. Integrins and cell proliferation: regulation of cyclin-dependent kinases via cytoplasmic signaling pathways. *J Cell Sci*. 2001 Jul;114 (Pt 14):2553-60.

SCRIMSHAW, N. S. Nature of protein requirements. *J. Am. Assoc.* v.54, p.94-102, 1969.

SECHLER, JL; SCHWARZBAUER, JE. Coordinated regulation of fibronectin fibril assembly and actin stress fiber formation. *Cell Adhes. Commun.* V4: 413-424, 1997

SHATILL, SJ; KIM, C; GINSBERG, MH. The final steps of integrin activation: the end game. *Nat. Rev.* v 11: 288-300, 2010

SHERR, C. J. Cancer cell cycle. *Science*. v. 274, p.1672-1677, 1996.

SHERR, C. J.; McCORMICK, F. The Rb and p53 pathway in cancer: Review. *Cancer Cell*. v.2, p.103-111, 2002.

SHERR CJ, ROBERTS JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 13:1501-1512, 1999.

SIEBURG, H.B.; CHO, R.H.; DYKSTRA, B.; UCHIDA, N.; EAVES, C.J.; MULLER-SIEBURG, C.E. The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cells subsets. *Blood* 107:2311-2316, 2006.

SOLIMAN, AT; ELZALABANY, MM; SALAMA, M; ANSARI BM. Serum leptin concentrations during severe protein-energy malnutrition: correlation with growth parameters and endocrine function. *Metab.* 2000; 49(7): 819-25.

SOOS TJ, KIYOKAWA H, YAN JS, RUBIN MS, GIORDANO A, DEBLASIO A, BOTTEGA S, WONG B, MENDELSON J, KOFF A. Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth Differ.* 1996 Feb;7(2):135-46.

SORKIN A; VON ZASTROW M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 600-614, 2002

SPANGRUDE, G.J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I.L.. Purification and characterization off mouse hematopoietic stem cells. *Sciences*, 241: 58-62. 1988.

SUDA, T.; SUDA, J.; OGAWA, M. Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2520-2524, 1984.

SUDA, T.; SUDA, J.; OGAWA, M. Analysis of differentiation of mouse hemopoietic stem cells in culture by sequential replating of pair progenitors. *Blood* 64:393-399, 1984.

TAKAGI, J; SPRINGER, TA. Integrin activation and structural rearrangement. *Immunol Rev.* v 189: 141-163, 2002.

TAKANO, H; EMA, H.; SUDO, H.; NAKAUCHI, H. Assymetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: interference from differentiation in daughter and granddaughter cells pair. *J. Exp. Med* 199(3):295-302, 2004.

TAMURA M; GUY; DANEN EH; et al. PTNE interactions with focal adhesion kinase and suppression of the extracellular matrix-dependent phosphatidylinositol 3-kinase/Akt cell survival pathway. *J Biol Chem* 274: 20693-20703.

TAVASSOLI, M.; MIGUELL, J. J. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1991 Apr;196(4):367-73.

TESTA, N. G.; DEXTER, T. M. Haemopoietic growth factors and haematological malignancies . *Bailliers Clin. Endocrinol. Metab.* v.4, p.177-89, 1990.

TOMKINS, A. Malnutrition, morbidity and mortality in children and their mothers. *Proc. Nutr. Soc.* v.59, p.135-46, 2000.

TRENTIN JJ. Hemopoietic microenvironments. *Transplant Proc.* 1978 Mar;10(1):77-82.

TRIMARCHI JM; LESS JA. Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Jan;3(1):11-20.

UCHIDA, N; WEISSMAN, IL. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1^{low} Lin⁻ Sca-1⁺ cells are the only stem cells in C57Bl/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J. Exp. Med.* 175: 175-184, 1992.

VAISMAN, N; HAHN, T; KAROV, Y; SIGLER, E; BARAK, Y; BARAK, V. Changes in cytokine production and impaired hematopoiesis in patients with anorexia nervosa: the effect of refeeding. *Cytokine* 2004; 26: 255-61.

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

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

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

WALRAND, S; MOREAU, K; CALDEFIE, F; TRIDON, A; CHASSAGNE, J; PORTEFAIX, G; CYNOBER, L; BEAUFRÈRE, B; VASSON, MP; BOIRIE, Y. Specific and nonspecific immune responses to fasting and refeeding differ in healthy young adult and elderly persons. *Am J Clin Nutr* 2000; 74: 670-8.

WATERLOW, R.; ALLYENE, G. A. O. Protein malnutritiomn in children: advances in Knowledge in last ten years. *Adv. Protein Chem.*, v.25, p.117-241, 1996.

WARY KK; MAINIERO F; ISAKOFF SJ; et al. The adaptor protein Sh couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cee* 87: 733-743, 1996.

WARY KK; MARIOTTI A; ZURZOLOC; et al. A requirement for caveolin-1 ad associated kinase Fyn in integrin signaling ans anchorage-dependent cell growth. *Cell* 94:625-634, 1998.

WEBSTER AJF. Energy partitioning, tissue growth and appetite control. *Proc. Nutr. Soc.* 52: 69-76. 1993.

WEISSMAN, IL. Stem cells: units of development, units of regulation, and units in evolution. *Cell* 100: 157-168, 2000.

WEISSMAN, IL; SHIZURU, JA. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune disease. *Blood*, v112, p3543-3553, 2008.

WELSH, CF. Rho GTPases as key transducers of proliferative signals in G1 cell cycle regulation. *Breast Cancer Res Treat.* Mar; 84(1):33-42, 2004.

WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I; SCHWARZBAUER, JE. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. *J. Cell. Sci.* v116: 3269-3276, 2003

WHITE, BD, DEAN RG; MARTIN RJ. An association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in basomedial hypothalamus and increased food intake. *Nutr. Neurosci.* 1: 173-182. 1998

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2004.

World Health Organization. Management of severe malnutrition: a manual for Physicians and other senior health workers. Geneva (Switzerland):World Health Organization;1999

WILLIAM, D.A.; LAMISCHKA, I.R; NATHAN, D.G.; MULLIGAN, R.C. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature* 310: 476-480. (1984)

XAVIER, JG; FAVERO, ME; VINOLO, MAR; ROGERO, MM; DAGLI, MLZ, ARANA-CHAVEZ, VE; BOROJEVIC, R; BORELLI, P. Protein malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases hematopoiesis in adult mice. *HistolHistopathol.* 2007 jun, 22(6): 651-60.

WILLIAMS DA; RIOS M; STEPHENS C; PATEL VP (1991). Fibronectin and VLA-4 in haematopoietic stem cell microenvironment interactions. *Nature* 352: 438.

WILSON, A; TRUMPP, A. Bone marrow haematopoietic stem cell niches. *Nature reviews immunology.* V6, p93-106, 2006

ZHANG, J; NIU, C; YE, L; HUANG, H; MISHINA, Y. Identification of the hematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* V426 (6960), p836-841, 2003.

ZHANG HS, GAVIN M, DAHIYA A, POSTIGO AA, MA D, LUO RX, HARBOUR JW, DEAN DC. Exit from G1 and S phase of the cell cycle is regulated by repressor complexes containing HDAC-Rb-hSWI/SNF and Rb-hSWI/SNF. *Cell.* 2000 Mar 31;101(1):79-89.

ZHAO, Y; LIN, Y; ZHAN, Y; YANG, G; LOUI, J; HARRISON, DE; ANDERSON, WF. Murine hematopoietic stem cells characterization and its regulation in BM transplantation. *Blood* 96: 3016-3022, 2000.

ZHONG, J.F.; ZHAO, Y.; SUTTON, S.; SU,A.; ZHAN, Y.; ZHU, L.; YAN,C.; GALLAHER, T.; JOHNSTON, P.B.; ANDERSON, W.F.; COOKE, M. Gene expression profile of murine

long-term reconstituting vs. short-term reconstituting hematopoietic stem cells. PNAS, 102(7): 2448-2453, 2005.

ZHOU, S; SCHUETZ JD; BUNTING, KD; *et al*. The ABC transporter Bcrp 1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side population phenotype. Nat. Med. 7:1028-1034, 2001.

ZHU, X; OHTSUBO M; BOHMER RM *et al*. Adhesion-dependent cell cycle progression linked to the expression of cyclin D1, activation of cyclin E-cdk2, and phosphorylation of the retinoblastoma protein. J. Cell Biol 133:391-403.

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

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.