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

**Avaliação de aspectos regulatórios da hematopoese em desnutrição
proteico-energética experimental: papel das células endoteliais
derivadas das células tronco mesenquimais medulares**

Araceli Aparecida Hastreiter

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

2014

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

**Avaliação de aspectos regulatórios da hematopoese em desnutrição
proteico-energética experimental: papel das células endoteliais
derivadas das células tronco mesenquimais medulares**

Versão original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Araceli Aparecida Hastreiter

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

2014

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

H358a	<p>Hastreiter, Araceli Aparecida</p> <p>Avaliação de aspectos regulatórios da hematopoese em desnutrição proteico-energética experimental: papel das células endoteliais derivadas das células tronco mesenquimais medulares / Araceli Aparecida Hastreiter. -- São Paulo, 2014. 103p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio</p> <p>1. Hematologia 2. Desnutrição proteico-energética 3. Células-tronco I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.</p> <p>616.15 CDD</p>
-------	--

Araceli Aparecida Hastreiter

Avaliação de aspectos regulatórios da hematopoese em desnutrição proteico-energética
experimental: papel das células endoteliais
derivadas das células tronco mesenquimais medulares

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
orientador/presidente

Prof. Dr. Fernando Luiz Affonso Fonseca
1^o. examinador

Prof. Dr. Pedro Augusto Carlos Magno Fernandes
2^o. examinador

São Paulo, _____ de _____

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de
água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

Madre Teresa de Calcutá

DEDICATÓRIA

“O verdadeiro amor nunca se desgasta. Quanto mais se dá mais se tem.”

Antoine de Saint-Exupéry

Ao meu pai **Guido** (*in memoriam*), que me ensinou a importância do conhecimento.
Por toda a força que você ainda me dá.

À minha mãe **Salete**, que acreditou no meu esforço e compreendeu minhas
ausências.

Ao meu marido **Junior**, meu principal incentivador, meu amigo para todas as horas,
pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão **Alisson**, por me ensinar que, independente das dificuldades, o
presente não se chama assim por acaso.

*“Despertar interesse e inflamar o entusiasmo é o caminho certo
para ensinar facilmente e com sucesso.”*

Tryon Edwards

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock**, orientador deste trabalho,
meu especial agradecimento pela confiança,
por estar sempre presente, pelo profissionalismo e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

“A gratidão é a memória do coração.”

Jean Baptiste Massieu

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), em nome de sua diretora, Profa. Dra. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto.

À Comissão de Pós Graduação (CPG) da FCF-USP em nome de seu presidente, Prof. Tit. Adalberto Pessoa Junior.

À Comissão Coordenadora de Programa (CCP) do Programa de Pós Graduação do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, em nome da Profa. Dra. Irene da Silva Soares.

À chefia do Departamento de Análises Clínicas (FBC) da FCF-USP, em nome da Profa. Dra. Sandra Helena Poliselli Farsky.

À Profa. Dra. Primavera Borelli do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, por seu exemplo de profissionalismo.

Às funcionárias da Secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP, Ana Maria Dias Dantas, Sueli Providel, Edna Batista Lima e Maria Auxiliadora Lima, pela paciência, competência e disposição em ajudar.

Aos funcionários da Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da FCF-USP, Elaine Ychico, Edilson Feitosa, Jorge de Lima, Miriam Alves Wrigg e Irineu Ruel de Oliveira pela preciosa atenção, por toda ajuda e pelas dúvidas esclarecidas.

Ao Edson Naoto Makiyama, técnico do laboratório e amigo, que sempre me ajudou em todos os aspectos.

À Iara Fabrícia Kretzer, pela amizade indispensável e pelo exemplo em todos os aspectos.

À Maristela Tsujita e Guilherme Galvão dos Santos, pela inestimável ajuda, amizade e bom humor.

Aos companheiros de pós-graduação do Laboratório de Hematologia Experimental, Mayara Caldas Ramos Cunha, Ed Wilson Cavalcante Santos, Graziela Batista, Talita Sartori, Jackeline Beltran, Dalila Cunha e Alexandra Mello. Obrigada pelo apoio, atenção e incentivo.

Aos estagiários e colegas de trabalho.

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

Por fim, mas não menos importante, aos queridos Leopoldo, Nicolau e Romeu, pelo amor incondicional e por me ensinarem todos os dias que as coisas mais simples podem trazer muita felicidade.

Resumo

HASTREITER, A.A. **Avaliação de aspectos regulatórios da hematopoese em desnutrição proteico-energética experimental: papel das células endoteliais derivadas das células tronco mesenquimais medulares.** 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

A desnutrição proteico-energética (DPE) provoca anemia e leucopenia decorrente da redução de precursores hematopoéticos e comprometimento da produção de mediadores indutores da hematopoese, bem como alterações estruturais e ultra-estruturais na matriz extracelular medular. A hematopoese ocorre em nichos medulares distintos – endosteal e perivascular – que modulam os processos de diferenciação, proliferação e auto-renovação da célula tronco hematopoética (CTH). As células tronco mesenquimais (CTM) tem um papel importante na formação destes nichos, através da sua diferenciação nos diversos tipos celulares que os compõe. Adicionalmente, a CTM pode modular a função de outras células, como a CTH e a célula endotelial (CE) medular, através da liberação de diversos fatores de crescimento e citocinas. As CE expressam proteínas que regulam a diferenciação e movimentação das CTH na MO. Há sinais que a CTM pode ser a precursora da CE medulares, pois *in vitro* a CTM pode se diferenciar em CE-like. Desta forma, a CTM é um ponto chave no estudo das alterações causadas pela DPE no nicho perivascular e sobre a regulação da hematopoese. Neste trabalho, investigamos se a DPE afeta a diferenciação *in vitro* da CTM medular em CE-like e avaliamos se essas células apresentam diferentes capacidades em produzir alguns mediadores regulatórios da hematopoese (CXCL-12, SCF, Ang-1, IL-11, GM-CSF e TFG- β), bem como possíveis alterações no perfil de expressão gênica de marcadores de função das CTM e CE-like. Utilizamos camundongos C57BL/6 machos, divididos em grupos Controle e Desnutrido, sendo que o grupo Controle recebeu ração normoprotéica (12% caseína) e o grupo Desnutrido recebeu ração hipoprotéica (2% caseína), ambos durante 5 semanas. Após este período, os animais foram eutanasiados, foi realizada a avaliação nutricional e hematológica, caracterizando a DPE. As CTM foram isoladas, caracterizadas e diferenciadas *in vitro* em CE-like, o que foi evidenciado pela maior expressão gênica de NT5E, FLT1, KDR, PECAM1 e VCAM1. Avaliamos a expressão dos genes CDH5, CSPG4, LEPR, NES, CSF1, CSF2, CSF3, MCAM, PROM1, ANGPT1, CXCL12, ENG, IGF1, IL3, IL11, KITL, TGFB1, WNT3A, WNT5A, ICAM1, PDGFB1 e VWF. Encontramos alterações causadas pela DPE na expressão gênica e quantificação de CXCL-12, SCF e Ang-1, os quais mostraram que as células avaliadas do grupo Desnutrido encontram-se em um estado “pró-proliferativo”, em um esforço para restabelecer a hematopoese na DPE. Entretanto, foi observado neste trabalho e nos demais trabalhos do grupo que há hipoplasia medular na DPE e, portanto, pode-se inferir que as alterações hematopoéticas observadas na DPE não são ocasionadas por alterações na síntese de SCF, CXCL-12 ou Ang-1.

Palavras-chave: Desnutrição proteico-energética; Célula tronco mesenquimal; Célula endotelial “like”; Expressão gênica; Regulação da hematopoese.

Abstract

HASTREITER, A.A. **Evaluation of hematopoietic regulatory aspects in experimental protein-energy malnutrition: the role of endothelial cells derived from bone marrow mesenchymal stem cells**. 2014. 103 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2014.

Protein-energy malnutrition (PEM) causes anemia and leukopenia as it reduces hematopoietic precursors, impairs the production of mediators that induce hematopoiesis and alters structural and ultrastructural changes in bone marrow (BM) extracellular matrix. Hematopoiesis occurs in distinct BM niches - endosteal and perivascular – which modulate the processes of differentiation, proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cell (HSC). Mesenchymal stem cells (MSC) play an important role in the formation of these niches through their differentiation in several cell types that compose them. Additionally, MSC can modulate the function of other cells, such as HSC and endothelial cells (EC), through the release of several growth factors and cytokines. The EC express proteins that regulate the differentiation and migration of HSC in the BM. MSC seem to be the precursor of medullary EC because *in vitro* MSC can differentiate into EC-like cells. Thus, MSC are a key point in the study of changes caused by PEM on the perivascular niche and on the regulation of hematopoiesis. In this study, we investigated whether PEM would affect BM-MSC *in vitro* differentiation into EC-like cells and evaluated whether these cells would have distinct capacities of producing some regulatory mediators of hematopoiesis (CXCL-12, SCF, Ang-1, IL-11, GM-CSF and TGF- β), as well as analyzed possible changes in the gene expression profile of MSC function and EC-like cells related markers. C57BL/6 mice were divided into Control and Malnourished groups, which received for 5 weeks, respectively, a normal protein diet (12% casein) and a low protein diet (2% casein). After this period, animals were euthanized, nutritional and hematological evaluations were performed, featuring the PEM. MSC were isolated, characterized and differentiated *in vitro* into EC-like cells, which were evidenced by increased gene expression of NT5E, FLT1, KDR, PECAM1 and VCAM1. The expression of CDH5, CSPG4, LEPR, NES, CSF1, CSF2, CSF3, MCAM, PROM1, ANGPT1, CXCL12, ENG, IGF1, IL3, IL11, KITL, TGFB1, Wnt3a, WNT5A, ICAM1, PDGFB1 and VWF genes was also evaluated. Changes caused by PEM on gene expression and quantification of CXCL-12, SCF and Ang-1 were found, indicating that tested cells from the Malnourished group were in a "pro-proliferative" state in an effort to restore hematopoiesis. However, our results are in accordance to the literature regarding bone marrow hypoplasia as a consequence of PEM. Therefore, we infer hematopoietic changes observed in this work are not related to changes in the synthesis of SCF, 12 CXCL-12 or Ang-1.

Key-words: Protein-energy malnutrition; Mesenchymal stem cell, Endothelial cell "like"; Gene expression; Hematopoiesis regulation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição das Rações.....	32
Tabela 2	Composição da Mistura Vitamínica.....	32
Tabela 3	Composição da Mistura Salínica.....	33
Tabela 4	Características dos ensaios TaqMan® utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.....	43-44
Tabela 5	Hemograma.....	49
Tabela 6	Mielograma.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática dos microambientes endosteal e perivascular na medula óssea.....	26
Figura 2	Variação de peso corpóreo.....	46
Figura 3	Consumo diário de ração e proteínas.....	47
Figura 4	Concentração sérica de proteínas totais e albumina.....	48
Figura 5	Celularidade da medula óssea.....	50
Figura 6	Fotomicrografias representativas das CTM avaliadas por imunofluorescência.....	51
Figura 7	Fotomicrografias representativas dos testes de diferenciação <i>in vitro</i> das CTM em osteoblastos, adipócitos e condrócitos.....	52
Figura 8	Fotomicrografias representativas das CTM do grupo Controle no período de indução de diferenciação endotelial.....	53
Figura 9	Resultados da expressão gênica de caracterização de fenótipo endotelial.....	55
Figura 10	Resultados da expressão gênica de caracterização de função da CTM.....	57
Figura 11	Resultados da expressão gênica de caracterização do nicho perivascular.....	58
Figura 12	Resultados da expressão gênica para avaliação da modulação da hematopoese.....	60
Figura 13	Resultados da expressão gênica para avaliação da modulação da hematopoese.....	61
Figura 14	Resultados da quantificação de citocinas.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG	Angiopietina
ANGPT1	Gene codificador da Ang-1
ANOVA	Análise de variância
CD	<i>“Cluster of differentiation”</i>
CDH5	Caderina epitelial vascular
cDNA	DNA complementar
CE	Célula endotelial
CE-like	Célula endotelial “like”
CO2	Dióxido de carbono
CT	<i>“Cycle threshold”</i>
CTH	Célula tronco hematopoética
CTM	Célula tronco mesenquimal
CXCL-12	Fator derivado de células estromais
DAPI	4’’-6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Meio Dulbecco modificado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
DPE	Desnutrição proteico-energética
DPM	Desvio padrão da média
EDTA	Sal potássico do ácido etileno diaminotetracético
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGM	Meio de crescimento endotelial
ELISA	<i>“Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay”</i>
ENG	Endoglina
FAO	<i>“Food and Agriculture Organization”</i>
FGF	Fator de crescimento de fibroblastos
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FLT-1	Receptor de VEGF tipo 1
G-CSF	Fator de crescimento de colônias granulocíticas
GM-CSF	Fator de crescimento de colônias granulo-macrofágicas

HUVEC	Célula endotelial de veia umbilical humana
IC	Intervalo de confiança
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
KDR	Receptor de VEGF tipo 2
KITL	Ligante de c-Kit
M-CSF	Fator de crescimento de colônias macrofágicas
MCAM	Molécula de adesão celular de melanoma
MEC	Matriz extracelular
MO	Medula óssea
mRNA	RNA mensageiro
NES	Nestina
NG2	Chondroitin sulfate proteoglycan 4
NT5E	5' nucleotidase
OMS	Organização Mundial da Saúde
P1	Primeira passagem
P2	Segunda passagem
PBS	Solução tampão fosfato salina
PCR	Reação da cadeia polimerase
PDGFB	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PECAM	Molécula de adesão epitélio-plaquetária
PROM	Prominina 1
qsp	Quantidade suficiente para
RN18s	RNA ribossômico fração 18s
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
SBF	Soro bovino fetal
SCF	Fator de células tronco
SDF	Fator derivado de células estromais
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral

UV	Ultra violeta
VCAM	Proteína celular de adesão vascular
VE-CADERINA	Caderina endotelial vascular
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor de VEGF
VWF	Fator de von Willebrand

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 DESNUTRIÇÃO.....	19
1.1.1 Desnutrição proteico-energética	20
1.2 HEMATOPOESE E DESNUTRIÇÃO PROTEICO-ENERGÉTICA.....	21
1.3 MICROAMBIENTE MEDULAR E CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL	22
1.4 NICHOS HEMATOPOÉTICOS.....	24
1.4.1 Papel da célula tronco mesenquimal no nicho perivascular	27
2 HIPÓTESE E OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 MATERIAIS	31
3.1.1 Animais.....	31
3.1.2 Rações	31
3.2 MÉTODOS.....	33
3.2.1 Indução à desnutrição	33
3.2.2 Obtenção de amostras sanguíneas	34
3.2.3 Avaliação das concentrações de proteínas totais e albumina séricas	35
3.2.4 Hemograma.....	35
3.2.5 Obtenção de células da medula óssea	35
3.2.6 Mielograma.....	36
3.2.7 Isolamento das células tronco mesenquimais medulares.....	36
3.2.8 Identificação da célula tronco mesenquimal	37
3.2.9 Diferenciação <i>in vitro</i> da célula tronco mesenquimal em célula endotelial “like”	39
3.2.10 Extração e análise de RNA total	40
3.2.11 Síntese do DNA complementar.....	40
3.2.12 Seleção dos genes de referência e de interesse	41
3.2.13 Determinação da expressão dos genes de interesse	42
3.2.14 Avaliação da produção de citocinas.....	44

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4 RESULTADOS	46
4.1 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL	46
4.1.1 Avaliação da variação do peso corpóreo	46
4.1.2 Análise do consumo de ração e do consumo proteico.....	47
4.1.3 Avaliação das concentrações séricas de proteínas totais e albumina	47
4.2 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA.....	48
4.2.1 Hemograma.....	48
4.2.2 Mielograma.....	49
4.3 CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL	51
4.4 DIFERENCIAÇÃO IN VITRO DA CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL EM CÉLULA ENDOTELIAL “LIKE”	52
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	53
4.5.1 Expressão de genes de caracterização de fenótipo endotelial	53
4.5.2 Genes para avaliação da função das CTM	56
4.5.3 Expressão de genes de caracterização do nicho perivascular	57
4.5.4 Expressão de genes para avaliação da modulação da hematopoese	58
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS	62
5 DISCUSSÃO	64
5.1 ASPECTOS NUTRICIONAIS E HEMATOLÓGICOS	64
5.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E CÉLULA ENDOTELIAL “LIKE”	68
5.3 ASPECTOS REGULATÓRIOS DA HEMATOPOESE	73
6 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS.....	102

1 INTRODUÇÃO

1.1 DESNUTRIÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas e a Organização Mundial da Saúde (OMS), todo ser humano tem direito à saúde, à não sofrer de fome e à nutrição adequada (ACC/SCN, 2000), entretanto a desnutrição ainda é um dos principais problemas alimentares no mundo (MONTEIRO et al., 2009).

No Brasil, o termo “desnutrição” usualmente é empregado como sinônimo de fome ou baixo peso corporal. Entretanto, segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), esse termo é definido como uma condição fisiológica anormal, causada por consumo inadequado, desbalanceado ou excessivo de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos) e/ou micronutrientes (vitaminas e minerais) essenciais para o desenvolvimento físico e cognitivo do organismo. Assim, a desnutrição (ou subnutrição) pode ser classificada em três categorias principais: (a) desnutrição, (b) deficiência de micronutrientes e (c) sobrepeso e obesidade (WHO, 2011; FAO, 2012).

A desnutrição significa falta de um ou mais nutrientes necessários para a saúde (STINNETT, 1983) e é decorrente de dietas baseadas em alimentos com combinações e/ou proporções inadequadas, bem como da deficiência de nutrientes específicos, tanto por perda ou utilização excessiva (SHETTY, 2003).

Dados da FAO demonstram que no período entre 2011 e 2013 havia cerca de 842 milhões de pessoas desnutridas mundialmente, sendo que no Brasil 6,9% da população, ou seja, 13,6 milhões de pessoas apresentavam algum quadro de desnutrição em 2012 (FAO, 2012; 2013). Como nos demais países em desenvolvimento, a situação nutricional dos brasileiros apresenta melhora resultante da expansão e melhorias nos serviços de saúde e programas sociais, mas os índices de desnutrição continuam elevados. Visto que a desnutrição é de natureza multifatorial, esta pode ser vista como um problema social, e não apenas de saúde pública (MONTE, 2000).

1.1.1 Desnutrição proteico-energética

A desnutrição proteico-energética (DPE) é a forma de desnutrição mais frequente (KEUSCH, 2003) e é definida pela OMS como: “um conjunto de condições patológicas que advém da menor ingestão, em proporções variadas, de proteínas e calorias” (WHO, 2011). Dentre as causas da DPE, se encontram a dieta inadequada, deficiência de absorção, ingestão insuficiente, aumento da utilização dos nutrientes e excreção excessiva. Desta forma, é possível ocorrer mais de uma forma de desnutrição no mesmo indivíduo simultaneamente (SAUNDERS e SMITH, 2010).

As manifestações clínicas da DPE variam de acordo com a intensidade do déficit proteico ou calórico e sua duração, bem como a idade do paciente, a causa da deficiência e a associação com outras doenças (DE ANGELIS, 1986). Duas síndromes – *Marasmus* e *Kwashiorkor* – podem ser resultantes da desnutrição acentuada e podem ocorrer de forma isolada ou combinada, chamada então síndrome Kwashiorkor-marasmática. O *Marasmus* é caracterizado por perda de massa corpórea, particularmente muscular e gordura subcutânea e é usualmente resultado de severa restrição de ingestão calórica. O *Kwashiorkor* é caracterizado por edema, sendo resultado da deficiência prolongada da ingestão proteica e afeta principalmente crianças (DE ANGELIS, 1986; WHO, 2011).

Visto que as proteínas constituem o principal componente estrutural celular (IMNA, 2005), a desnutrição pode afetar todos os sistemas e órgãos (TROWELL, 1954¹ apud MONTE, 2000), sendo que a DPE pode cursar com retardo no crescimento (MONTEIRO et al., 2009) e alterações morfológicas e funcionais nos sistemas cardiovascular, renal, respiratório e digestório (WAITZBERG, 2006). Além desta redução na capacidade física, pode provocar efeitos psicossociais, como depressão e ansiedade (SAUNDERS e SMITH, 2010) e diminuição de habilidades mentais, como a função cognitiva (WHO, 2011).

A população mais suscetível à DPE são as crianças e idosos, bem como portadores de doenças crônicas (PEDRUZZI e TEIXEIRA, 2007). Na maioria das vezes, atua como fator sinérgico, mas também pode resultar diretamente em morte

¹ TROWELL, H. C.; DAVIES J. N. P.; DEAN, R. F. A. **Kwashiorkor**. London: Edward Arnold, 1954.

(WHO, 2011). Sawaya relata que a desnutrição é responsável por 55% das mortes de crianças no mundo inteiro e é considerada a doença que mais mata crianças abaixo de cinco anos (SAWAYA, 2006).

Em nível hospitalar, a DPE pode ocorrer em 19% a 80% dos pacientes, sendo que até 70% dos pacientes inicialmente desnutridos sofrem uma piora gradual em seu estado nutricional durante a hospitalização, afetando o estado geral do paciente e sua resposta ao tratamento (WAITZBERG, 2006). Neste sentido, por exemplo, a presença da desnutrição em pacientes portadores de insuficiência renal crônica sob diálise, que apresentam alta frequência de desnutrição moderada a severa – entre 22 e 54%, é um fator preditivo de mortalidade (PIRATELLI e TELAROLLI JUNIOR, 2012; VAVRUK et al., 2012).

1.2 HEMATOPOESE E DESNUTRIÇÃO PROTEICO-ENERGÉTICA

A hematopoese consiste de um processo dinâmico e finamente controlado em que células tronco hematopoéticas (CTH) pluripotentes proliferam e se diferenciam para originar os diferentes tipos celulares que compõem o sistema sanguíneo (NAKAJIMA, 2010).

O tecido hematopoético, bem como todos os outros tecidos que apresentam alta taxa de renovação e proliferação celular, requer uma variedade de nutrientes e pode ser alterado pela deficiência nutricional (BORELLI et al., 2004; XAVIER et al., 2007; BORELLI et al., 2009). Em 1947, Whipple e colaboradores demonstraram que o consumo adequado de proteínas é necessário para o restabelecimento da eritropoese após sangramentos (WHIPPLE et al., 1947). Desde então, são estudados os efeitos da privação alimentar sobre a hematopoese.

Dados do nosso laboratório e de outros autores evidenciam que a DPE provoca alterações hematológicas quantitativas como a anemia não ferropriva e com redução de reticulócitos (DE ANGELIS, 1986; ROBBINS et al., 2003; BORELLI et al., 2009), sendo que o quadro anêmico encontrado é decorrente da redução da produção de células e precursores eritróides, com baixa resposta à eritropoietina (BORELLI et al., 2007). Fundamentando estes achados, observou-se, em animais

submetidos à DPE, alterações no ciclo celular da CTH e de progenitores hematopoéticos, de forma que essas células estão predominantemente nas fases G0 e G1 do ciclo celular. Isto deve à menor expressão de proteínas indutoras do ciclo celular, como, por exemplo, Cdk2, Cdk4, PCNA e ciclinas D1 e E; também foi observado maior expressão p21 e p27, que são proteínas inibidoras do ciclo celular (BORELLI et al., 2009; NAKAJIMA et al., 2014).

A DPE compromete órgãos linfo-hematopoéticos – medula óssea (MO), baço e timo - com consequente modificação da resposta imune. Isto é evidenciado pela redução da migração celular, fagocitose, atividade bactericida e fungicida e alteração na produção de espécies reativas de oxigênio (CHANDRA, 1991; KEUSCH, 1994; BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000; NARDINELLI e BORELLI, 2001), nitrogênio e diminuição na síntese de fator de necrose tissular (TNF) - α e interleucinas (IL) -1 α , -1 β e -6 (FOCK et al., 2007).

A DPE também provoca alterações histológicas na matriz extracelular (MEC), com atrofia dos compartimentos eritróide e grânulo-monocítico e degeneração medular (XAVIER et al., 2007). A MEC tem por função fornecer o suporte físico para os elementos da hematopoese, entretanto sua importância não está limitada à estrutura. A MEC desempenha um papel essencial na modulação da resposta a fatores de crescimento, citocinas, hormônios e vitaminas e desta forma, modula funções biológicas, como a adesão, proliferação, diferenciação e migração das células hematopoéticas (LYRA et al., 1993; KLEIN, 1995; VITURI et al., 2000). Desta forma, alterações na MEC podem ser significantes para a fisiologia do tecido medular (BORELLI et al., 2009).

Adicionalmente, há um aumento na quantidade de proteínas, principalmente fibronectina, trombospondina e laminina, da MEC medular de camundongos desnutridos (VITURI et al., 2000). Esta alteração pode modificar a co-localização de fatores de crescimento e citocinas, comprometendo o microambiente medular (KLEIN, 1995; XAVIER et al., 2007).

1.3 MICROAMBIENTE MEDULAR E CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL

Em 1978, Schofield relatou que o microambiente atua como regulador das

CTH, modulando seus processos de diferenciação, proliferação e auto-renovação (SCHOFIELD, 1978). O microambiente medular é composto basicamente pelo sistema celular hematopoético e estromal (DEANS e MOSELEY, 2000). O estroma apresenta-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica que, além de fornecer o parênquima de sustentação para as células hematopoéticas, permite um "ambiente bioquímico" fundamental para a proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (MAYANI et al., 1992).

O estroma é composto pela MEC, por um conjunto de substâncias solúveis e pelo sistema celular estromal, composto por fibroblastos, células endoteliais, células reticulares e adipócitos, além de outros tipos celulares. O estroma é altamente adaptativo, visto que apresenta a habilidade de alterar sua função em resposta a estímulos externos e, desta forma, modular a sobrevivência, proliferação e o desenvolvimento das células hematopoéticas em todos os seus níveis de diferenciação (BORDIGNON et al., 1999; ZHANG et al., 2003; KOLF et al., 2007; SATO et al., 2010), através da produção local de citocinas e proteínas da MEC (GORDON, 1988).

O microambiente medular é altamente organizado e regula a localização e fisiologia das células tronco bem como sua produção e taxa de liberação celular da MO para o sangue periférico (MAYANI et al., 1992; VITURI et al., 2000). Dessa maneira, a existência de fatores regulatórios pode formar microambientes indutivos (TRENTIN, 1978; TESTA e DEXTER, 1990), que controlam a hematopoese pela produção e secreção local de citocinas pelas células do estroma, co-localização de citocinas para a CTH nos locais de contato célula - célula e/ou célula – MEC ou ainda, por estímulo direto pelo contato celular (RIOS e WILLIAMS, 1990; METCALF, 1994).

Na MO, a célula tronco mesenquimal (CTM) é um importante componente do microambiente hematopoético. As CTM, também conhecidas como células estromais mesenquimais multipotentes, são um grupo de células clonogênicas presentes ao longo da MO que originam o estroma de suporte para a hematopoese (KASSEM e ABDALLAH, 2008; HOCKING e GIBRAN, 2010).

A primeira evidência concreta de que a MO contém células precursoras não-hematopoéticas provém de estudos realizados por Friedenstein na década de 70 (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Posteriormente, diversos estudos estabeleceram que

essas células – somente então chamadas células tronco mesenquimais – exibiam capacidade de se diferenciar em tipos celulares mesodérmicos, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (BARRY e MURPHY, 2004; JUNG et al., 2009; WATABE e MIYAZONO, 2009; KURODA et al., 2010).

As CTM representam uma pequena fração (0,001-0,01%) do total de células nucleadas na MO, porém podem ser isoladas e expandidas com alta eficiência (BARRY e MURPHY, 2004) porque apresentam aderência seletiva a superfícies plásticas quando comparadas com as células hematopoéticas. Apresentam características fusiformes e tipo fibroblastóides e, no início do crescimento *in vitro*, formam colônias análogas às unidades formadoras de colônias de fibroblastos. São células negativas para marcadores hematopoéticos CD45 e CD14, e são positivas para CD105, CD73 e CD90 (BARRY e MURPHY, 2004; KASSEM e ABDALLAH, 2008) e CD44 (KASSEM e ABDALLAH, 2008) em murinos. Visto que os marcadores de superfície celular sugeridos não são específicos, marcadores de superfície celular adicionais são utilizados para identificar de maneira mais adequada a CTM, dentre esses, os mais empregados e que apresentam positividade para CTM são CD29, CD49e e CD106 (BARRY e MURPHY, 2004; KOLF et al., 2007; MOSNA et al., 2010), bem como CD271 (KUCI et al., 2010) e Sca-1 (MORIKAWA et al., 2009).

As CTM são capazes de influenciar a função de outras células através de interação direta célula-célula e através da liberação de um amplo espectro de fatores bioativos, como citocinas e fatores de crescimento (OLIVEIRA, 2010). Dentre os fatores secretados estão fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) -1, fator de crescimento transformador (TGF) - β , fator inibidor da leucemia (LIF), fator derivado de células estromais (SDF) -1 ou CXCL-12, angiopoietinas e interleucinas, dentre outros numerosos quimiotáticos (DA SILVA MEIRELLES et al., 2008; FU e LI, 2009).

1.4 NICHOS HEMATOPOÉTICOS

O termo nicho hematopoético é utilizado para designar a localização anatômica do microambiente em que as CTH residem (SCHOFIELD, 1978). Embora

as CTH estejam bem caracterizadas, seu nicho ainda é pouco compreendido.

A interface entre a MO e os ossos trabeculares é chamada endósteo, no qual estão presentes numerosos osteoblastos. A primeira evidência que mostrou que os osteoblastos poderiam modular a CTH foi um estudo de Taichman & Emerson em 1994, no qual foi demonstrado que osteoblastos diferenciados *in vitro* a partir da CTM produzem fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF) (TAICHMAN e EMERSON, 1994). Posteriormente, foi demonstrado que um grande número de CTH situa-se próximo ao endósteo e surgiu o conceito do nicho endosteal como principal nicho hematopoético (ZHANG et al., 2003; LI e XIE, 2005). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* relatam que os osteoblastos parecem ser necessários para a manutenção da hematopoese (KIEL e MORRISON, 2008; MENDEZ-FERRER et al., 2010; RENSTROM et al., 2010), de forma que estas células podem regular o número e a função das CTH através, por exemplo, da secreção de osteopontina (STIER et al., 2005) e da expressão de angiopoietina (Ang) -1 (ARAI et al., 2004), que mantêm a CTH em estado de quiescência.

Entretanto, estudos atuais mostram que a modulação das CTH pelos osteoblastos é prioritariamente indireta. Isto foi evidenciado por estudos de imagens *in vivo* que demonstraram que apenas um pequeno número de CTH está em contato com os osteoblastos (KIEL et al., 2005; KIEL et al., 2009). Além disso, em estudos baseados na depleção ou aumento do número de osteoblastos, não foram observadas alterações importantes nas CTH (KIEL et al., 2007; LYMPERI et al., 2008).

Duas observações importantes questionaram a existência de outros nichos hematopoéticos: (a) durante o desenvolvimento fetal, ou seja, antes da formação das cavidades medulares, a CTH tem capacidade de diferenciação e auto-renovação (TAVIAN e PEAULT, 2005) e (b) a CTH pode residir próxima aos sinusóides medulares (KIEL et al., 2005; KIEL et al., 2007; NOMBELA-ARRIETA et al., 2013).

Figura 1 – Representação esquemática dos microambientes endosteal e perivascular na medula óssea (Adaptado de EHNINGER e TRUMPP, 2011).

Em 1997 foi demonstrado por Ohneda & Bautch que células endoteliais (CE) sinusoidais podem modular e sustentar a CTH *in vitro* (OHNEDA e BAUTCH, 1997), mas apenas em 2005, no estudo realizado por Kiel e colaboradores, foi apontada a existência de um nicho perivascular (KIEL et al., 2005). O nicho perivascular se localiza na região anatômica próxima ao endotélio vascular dos sinus medulares e parece ser a localização *in vivo* de dois terços das CTH (MITSIADIS et al., 2007; CARRION et al., 2010), de maneira que as CTH se mantêm próximas a CE e células perivasculares, como a CTM (KIEL e MORRISON, 2008; MENDEZ-FERRER et al., 2010).

As CE sinusoidais medulares podem modular as CTH, através da expressão de proteínas reguladoras, como proteína celular de adesão vascular 1 (VCAM-1), CXCL-12, Ang-1 (LEVESQUE e WINKLER, 2011) e receptor de fator de crescimento endotélio-vascular (VEGFR) - 2 (HOOPER et al., 2009). Além disso, promovem a expansão das CTH *in vitro* (BUTLER et al., 2010), sugerindo que as CE podem ser essenciais para a proliferação das CTH *in vivo* (WINKLER et al., 2010). Um dos mecanismos propostos para tal é a capacidade de síntese *in vitro* de “stem cell fator” (SCF) e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) pelas CE, que promovem a proliferação de progenitores hematopoéticos (WADHWA e THORPE, 2008). Entretanto outros componentes do nicho perivascular produzem estes mediadores, como as CTM. Dessa forma, não é claro se a modulação *in vivo* da CE sobre a CTH é direta ou indireta.

Desde a descoberta do nicho perivascular, foi proposto que as CTH com proliferação mais ativa situam-se preferencialmente na região perivascular, enquanto

que as CTH quiescentes preferencialmente situam-se no nicho endosteal, sob influência osteoblástica (LEVESQUE e WINKLER, 2011). Recentemente esta suposição foi revogada por Kunisaki e colaboradores, que mostraram que a manutenção da quiescência da CTH é regulada por CTM NG2⁺, presentes no nicho perivascular arteriolar próximo ao endósteo, e não pelos osteoblastos (KUNISAKI et al., 2013). Dessa forma, parece existir mais de um nicho perivascular: o arteriolar e o sinusoidal. Contudo, a real existência *in vivo* destes nichos e seus componentes precisa ser melhor elucidada, bem como é necessário averiguar se o nicho endosteal realmente é um nicho hematopoético.

1.4.1 Papel da célula tronco mesenquimal no nicho perivascular

As CTM têm um papel importante na modulação do nicho hematopoético, visto que expressam genes importantes para a regulação da diferenciação e da movimentação da CTH na MO (AU et al., 2008). Como exemplo, as CTM produzem CXCL-12 e Ang-1, que contribuem para manter a CTH quiescente, impedindo sua proliferação e apoptose (ARAI et al., 2004). Outro regulador negativo da hematopoese sintetizado pelas CTM é o TGF- β , que age de forma direta, inibindo o ciclo celular de progenitores hematopoéticos, e indireta, promovendo maior diferenciação osteoblástica da CTM (RUSCETTI et al., 2005). Em contrapartida, o TGF- β estimula a expressão de IL-11 pelas células do estroma, que estimula a proliferação de progenitores hematopoéticos (PAUL et al., 1990).

Além disso, alguns subtipos de CTM exercem atividade essencial no nicho perivascular. Foi demonstrado que CTM que expressam nestina (Nes⁺), CTM que expressam receptor de leptina (LepR⁺) e “CAR cells” – células reticulares que sintetizam grandes quantidades de CXCL-12 - se localizam adjacentes às CE e às CTH, sendo que estas células expressam fatores de crescimento e citocinas que favorecem a manutenção da CTH, como SCF e CXCL-12 (SUGIYAMA et al., 2006; MENDEZ-FERRER et al., 2010; EHNINGER e TRUMPP, 2011; DING et al., 2012). Entretanto, a distribuição destas células não é uniforme. Kunisaki e colaboradores apontaram que CTM Nes⁺/NG2⁺/LepR⁻ se encontram preferencialmente no nicho perivascular arteriolar, enquanto que CTM Nes⁺/NG2⁻/LepR⁺ estão localizadas no

nicho perivascular sinusoidal (KUNISAKI et al., 2013).

Além de exercerem um papel regulador sobre as CTH, as CTM modulam células da linhagem endotelial, de maneira que é cogitado que a função primária das CTM é fornecer suporte para a hematopoese e estabilizar os vasos sanguíneos medulares (BIANCO et al., 2010). Reforçando esta ideia, estudos sugerem que a CTM pode ser a célula progenitora tanto das células de linhagem mesenquimal quanto da célula endotelial medular (MORIKAWA et al., 2009; LEVESQUE e WINKLER, 2011).

A habilidade de diferenciação das CTM para células endoteliais tem sido amplamente abordada na literatura, entretanto os mecanismos e as moléculas envolvidas nestes processos não estão totalmente esclarecidos (OSWALD et al., 2004; LIU et al., 2007; LOZITO, KUO, et al., 2009; LOZITO, TABOAS, et al., 2009; MOSNA et al., 2010).

Oswald e colaboradores demonstraram que, *in vitro*, a CTM adquire características endoteliais na presença de VEGF, como a expressão de VCAM-1, fator de von Willebrand (vWF) e dos receptores de VEGF 1 e 2, Flt-1 e Kdr, respectivamente, de forma que a intensidade de expressão varia conforme o tempo de cultura (OSWALD et al., 2004). Na presença de um meio de crescimento endotelial mais completo, composto por fator de crescimento epidérmico (EGF), VEGF, fator de crescimento de fibroblastos β (FGF- β) e IGF-1, a CTM passa a expressar uma maior variedade de marcadores de superfície endotelial, como a molécula de adesão celular epitélio-plaquetária (PECAM) 1, endogлина (Eng), CD73 e molécula de adesão celular de melanoma (MCAM), além dos acima descritos. Entretanto, como o fenótipo dessa célula diferenciada não é idêntico ao das células endoteliais, convém chama-la de célula endotelial “like” ou endotélio “like” (CE-like) (LIU et al., 2007).

Xu e colaboradores demonstraram que o microambiente e a interação célula-célula são fundamentais para a diferenciação endotelial da CTM, sugerindo que a sinalização de junção celular é um determinante-chave neste processo. Esta sinalização de junção estimula a diferenciação das CTM pela via de sinalização TACE/TNF- α (XU et al., 2010).

Além da habilidade de diferenciação da CTM em CE-like, estas células são

funcionais e tem capacidade de formar vasos sanguíneos *in vitro* e *in vivo*. Bianco e colaboradores sugerem que este processo seja chamado de “angiopoese” (BIANCO et al., 2010), visto que difere em natureza da angiogênese – formação de vasos por brotamento a partir de vasculatura pré-existente (AL-KHALDI et al., 2003) - e da vasculogênese – formação de vasos a partir da diferenciação *in situ* de angioblastos (REYES et al., 2002).

Neste contexto, a utilização de CE-like pode ser uma ferramenta apropriada para o estudo *in vitro* da funcionalidade do nicho perivascular e pode fornecer informações importantes a respeito da quiescência, auto-renovação, diferenciação e mobilização da célula tronco hematopoética.

2 HIPÓTESE E OBJETIVOS

Dados da literatura e do nosso grupo evidenciam que a desnutrição compromete a hematopoese como um todo, através de alterações na CTH e na MEC. Visto que a MEC é constituída por microambientes com composições celular e bioquímica distintas, e que ambas provém de células originadas a partir da CTM, hipotetizamos que a DPE tem uma ação fisiopatológica importante também sobre esse tipo celular e, portanto, na formação dos microambientes indutores medulares – nichos hematopoéticos – que regulam os processos de manutenção da hematopoese.

Dessa forma, objetivamos determinar se a DPE afeta a diferenciação *in vitro* da CTM medular em CE-like e avaliar se essas células apresentam diferentes capacidades em produzir alguns mediadores regulatórios da hematopoese (CXCL-12, SCF, Ang-1, IL-11, GM-CSF e TFG- β), bem como avaliar possíveis alterações no perfil de expressão gênica de marcadores de função das CTM e CE-like.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus domesticus*) machos, com 45-60 dias de idade, da linhagem C57BL/6 (isogênica) provenientes de colônias mantidas pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Após o nascimento, os animais foram mantidos à temperatura ambiente (22 a 25°C), ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 07h00min da manhã) e umidade relativa do ar a $55 \pm 10\%$. Após o desmame, os animais receberam ração Purina® (Nestlé, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum* até atingirem a idade estipulada para início dos experimentos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/344, **anexo I**).

3.1.2 Rações

Foram utilizados dois tipos de ração – normoproteica e hipoproteica - para a alimentação dos animais neste modelo experimental, sendo que ambas foram produzidas em nosso laboratório na forma de granulado e armazenadas a -4°C até sua utilização. A composição das rações, discriminada na **Tabela 1**, está de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos - AIN-93M (REEVES et al., 1993). Foi utilizada caseína comercial (LABSYNTH®, Diadema, Brasil) como fonte proteica e a concentração proteica da caseína foi determinada pelo método micro-Kjeldahl (Instituto Adolfo Lutz, 1985) 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. As misturas vitamínica (**Tabela 2**) e salínica (**Tabela 3**) foram preparadas sob encomenda pela Rhoster[®] (Rhoster[®], Araçoiaba da Serra, Brasil).

Tabela 1: Composição das Rações

Constituintes	Ração normoproteica (g/Kg de ração)	Ração hipoproteica (g/Kg de ração)
Caseína (85% pureza)	120	20
Mistura salínica	35	35
Mistura vitamínica	10	10
Sacarose	100	100
Óleo de Milho	80	80
Fibra alimentar (Celulose)	10	10
Metionina	1,5	1,5
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008
Amido de milho q.s.p.	1000	1000

Tabela 2: Composição da Mistura Vitamínica

Constituintes	Rações normoproteica e hipoproteica (g/Kg de mistura salínica)
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 B12	2,50
Vitamina E	15,00
Vitamina A	0,80
Vitamina D ₃	0,25
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,655

Tabela 3: Composição da Mistura Salínica

Constituintes	Ração normoproteica (g/Kg de mistura salínica)	Ração hipoproteica (g/Kg de mistura salínica)
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	0
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 tetra hidratado	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

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Indução à desnutrição

Os animais foram previamente pesados e separados em gaioleiros metabólicos, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais descritas no item 3.1.1. Inicialmente os animais passaram por um período de adaptação (10 a 15 dias), no qual todos os animais receberam ração normoproteica e água *ad libitum*,

sendo pesados a cada 48 horas para avaliar a estabilização de seu peso corporal. Ao final do período de adaptação, os animais foram divididos em dois grupos: Controle e Desnutrido, sendo que a média de peso corporal do grupo Controle foi estatisticamente semelhante à média do grupo Desnutrido.

No período de indução da desnutrição, os animais do grupo Controle receberam ração normoproteica, contendo 12% de proteína, e os animais do grupo Desnutrido receberam ração hipoproteica, contendo 2% de proteína. As rações utilizadas são isocalóricas (3601,0 kcal/kg), diferindo apenas na concentração proteica que é definida pela quantidade de caseína adicionada. A caseína fornece em torno de 80% de fósforo, portanto, na ração hipoproteica, que contém teor mais baixo de caseína, a composição da mistura salínica foi corrigida de acordo com a concentração proteica de cada lote, para que a deficiência de fósforo fosse suprida (REEVES et al., 1993). O período para a indução à desnutrição utilizado foi 35 a 40 dias, sendo que o peso e o consumo de ração de cada animal foram avaliados a cada 48 horas (FOCK, ROGERO, et al., 2010).

3.2.2 Obtenção de amostras sanguíneas

As amostras sanguíneas foram obtidas a partir da punção do plexo axilar dos camundongos previamente anestesiados com xilazina (10mg/Kg de peso, Rompun[®], Bayer HealthCare Animal Health, Leverkusen, Alemanha) e cetamina (100 mg/Kg de peso, Ketamina[®], Cristália, São Paulo, Brasil). As amostras foram coletadas com pipeta de transferência e divididas em dois tubos tipo Eppendorf: a) um tubo contendo EDTA (sal potássico do ácido etileno diaminotetracético) a 10% na proporção de 50 µL para cada 1,0 mL de sangue total para a realização do hemograma e b) um tubo sem anticoagulante para obtenção de soro, após centrifugação (2000Xg por 10 minutos) a 4°C. O soro foi dividido em alíquotas e congelado a -40°C. Após a coleta das amostras sanguíneas, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

3.2.3 Avaliação das concentrações de proteínas totais e albumina séricas

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método do Biureto (GORNALL et al., 1949) e a determinação de albumina realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (RODKEY, 1965; DOUMAS et al., 1971), para tanto foram utilizados "kits" comerciais da Labtest® (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Brasil). As amostras foram processadas em triplicata e as leituras realizadas no espectrofotômetro EL800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek® Instrumentals, Winooski, EUA).

3.2.4 Hemograma

O hemograma foi realizado a partir de sangue total. A análise do volume hematócrito, dosagem de hemoglobina e contagem global de hemácias e leucócitos foram determinadas pelo analisador automático de células sanguíneas ABC Vet (ABX Diagnostics®, Horiba, Kyoto, Japão). A contagem diferencial de leucócitos circulantes foi determinada a partir da preparação de extensões sanguíneas coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). As extensões coradas foram analisadas por microscopia óptica e foram contados, no mínimo, 100 leucócitos.

3.2.5 Obtenção de células da medula óssea

Após a eutanásia, conforme descrito no item 3.2.2, os fêmures de cada animal foram seccionados entre as articulações fêmur-íliaca e fêmur-tibial. Com o auxílio de agulha e seringa, foi feita a lavagem das cavidades femorais esquerda e direita com 4,0 mL de meio de cultura cada. O meio de cultura utilizado em todos os procedimentos para obtenção das CTM foi o meio Dulbecco modificado (DMEM) baixa glicose (Cultilab®, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab®, Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA).

Posteriormente, as suspensões celulares foram centrifugadas (1500 rpm por 10 minutos), os sobrenadantes foram desprezados e as células foram cuidadosamente ressuspensas em 1,0 mL de meio de cultura. Foi separada uma alíquota da suspensão celular do fêmur esquerdo para realização do mielograma e o material remanescente foi destinado para o isolamento e caracterização das CTM medulares. O material foi mantido imerso em gelo até a sua utilização, tempo que não ultrapassou duas horas após a coleta.

Todos os procedimentos de coleta e cultivo celular foram realizados em fluxo laminar bidirecional, específico para este fim, para manutenção da esterilidade dos materiais bem como para evitar contaminação das culturas celulares.

3.2.6 Mielograma

A partir das amostras da suspensão de células totais da MO reservadas para o mielograma, conforme descrito no item 3.2.5, foram preparadas lâminas por citocentrifugação (Incibrás®, São Paulo, Brasil). As lâminas foram coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) para a análise diferencial com contagem mínima de 300 células. A contagem total de células foi realizada em hemocítômetro de Neubauer após diluição das amostras em líquido de Turk na proporção 1:50.

3.2.7 Isolamento das células tronco mesenquimais medulares

O isolamento das CTM foi realizado seguindo a metodologia originalmente descrita por Friedenstein (FRIEDENSTEIN et al., 1976), que se baseia na capacidade que estas células têm de aderir ao plástico, ficando relativamente isentas de CTH após a 2ª ou 3ª passagem (COLTER et al., 2000). As células totais da medula óssea de foram cultivadas em dois frascos de cultura de 25 cm² utilizando 5 mL de meio DMEM baixa glicose (Cultilab®, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab®, Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera

úmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Esta cultura primária foi classificada como passagem zero (P0).

O crescimento e morfologia celulares foram monitorados a cada 48 horas em microscópio invertido e os meios de culturas dos frascos foram trocados no 3º, 7º e 14º dias. Após confluência celular de 80 a 90%, as células foram subcultivadas em outros frascos. Para o subcultivo, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas por três vezes com 5 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS) sem cálcio e magnésio pH 7,4. As células foram tripsinizadas com a adição de 2,5 mL de solução de tripsina 0,5% e 1mM EDTA por três minutos a 37°C sob agitação constante. Em seguida, a tripsina foi inativada com a adição de 2,5 mL de DMEM com 10% de soro bovino fetal e o material foi aspirado, centrifugado (1500 rpm por 10 minutos) e o botão celular foi ressuscitado em 1,0 mL de meio de cultura. As células obtidas, classificadas como passagem P1, foram recultivadas em dois frascos de 25 cm² e incubadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Dos quatro frascos de cultura celular obtidos de cada animal, duas réplicas foram direcionadas aos testes com as CTM propriamente ditas e duas foram direcionadas para a indução de diferenciação celular.

3.2.8 Identificação da célula tronco mesenquimal

As CTM foram caracterizadas por imunofluorescência, citometria de fluxo e avaliação do potencial de diferenciação para as linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica.

Para a realização da técnica de imunofluorescência, as culturas celulares em primeira passagem (P1) foram subcultivadas em placa de 6 wells com lamínula numa densidade de 1×10^6 células/ml até adesão celular. Em seguida, as células aderentes fixadas com solução de paraformaldeído 4% por 15 minutos e permeabilizadas com Triton 0,1% por 10 minutos. Em seguida, as células foram lavadas com PBS pH 7,4 e tratadas com solução contendo soro bovino fetal para o bloqueio das ligações inespecíficas por 30 minutos a temperatura ambiente. Após este período, as células foram novamente lavadas PBS pH 7,4 e foram incubadas com o anticorpo primário anti-CD271 na diluição 1:200 por uma hora em temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi retirado após três lavagens com PBS. Foi

realizada a incubação com o anticorpo secundário conjugado com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) por uma hora a temperatura ambiente. Novamente as células foram lavadas três vezes com PBS. Realizou-se a contra coloração pela marcação dos núcleos com 4'-6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), com incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. As células foram analisadas em microscópio de imunofluorescência.

Para confirmação do fenótipo da CTM, as culturas celulares em P1 foram centrifugadas por 10 minutos a 300g em temperatura de 20-25°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspenso em 400µL de PBS, pH 7,2 e 2 a 5µL de anticorpo para cada 1×10^6 células/mL. Foi realizada incubação por 20 minutos, em temperatura de 20-25°C. Posteriormente, o sedimento celular foi centrifugado por 10 minutos a 300g, em temperatura de 20-25°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 500µL de PBS e foi realizada centrifugação por 10 minutos a 300g em temperatura de 20-25°C. Após nova lavagem, foi adicionado 400µL de PBS pH 7,2 e foram realizadas as aquisições em citômetro de fluxo. Os anticorpos anti-CD90, -CD271, -Sca1, -CD49e, -CD34, -CD45 e -CD14 foram utilizados para a caracterização das CTM. Após a marcação com os anticorpos, o perfil fenotípico dessas células foi obtido por citometria de fluxo (FACScan®, BECTON DICKSON, San Jose, EUA). Como controle, utilizou-se a marcação para o isotipo de cada cadeia dos anticorpos adotados.

A confirmação da multipotencialidade da CTM, utilizando testes de diferenciação *in vitro*, também é necessária para a identificação deste tipo celular. Para tanto, foi utilizado o kit *Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification* (Catálogo SC010 - R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), composto de meios de diferenciação celular para as linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, além dos reagentes necessários para caracterizar por imunocitoquímica estes tipos celulares.

As CTM obtidas conforme descrito no item 3.2.7 foram tripsinizadas, plaqueadas em placas de 24 poços e submetidas a diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Para a diferenciação em adipócitos plaqueou-se $3,7 \times 10^4$ células por poço. Essas células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura para CTM (fornecido no kit). Após esse período, todo o meio de cultura foi removido

e, a seguir, foi adicionado 0,5 mL de meio de indução α -MEM contendo 10% de SBF e 1% de suplemento adipogênico (fornecido no kit). O período de diferenciação das CTM em adipócitos foi de 14 dias. Posteriormente, avaliou-se a morfologia dos adipócitos obtidos por microscopia de contraste de fase, utilizando-se a coloração de *oil red*. Além disso, a diferenciação das CTM em adipócitos foi confirmada através da imunocitoquímica utilizando o anticorpo FABP4 (protocolo e anticorpo fornecidos no kit).

Para a diferenciação em osteoblastos, plaqueou-se $7,4 \times 10^3$ células por poço previamente tratados com 1 μ g/mL de fibronectina. Essas células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura para CTM (fornecido no kit). Após esse período, todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, foi adicionado 0,5 mL de meio de indução α -MEM contendo 10% de SBF e 5% de suplemento osteogênico (fornecido no kit). O período de diferenciação das CTM em osteoblastos foi de 14 dias. Posteriormente, avaliou-se a morfologia dos osteoblastos obtidos por microscopia de contraste de fase, utilizando-se a coloração de vermelho de alizarina. Além disso, a diferenciação das CTM em osteoblastos foi confirmada através da imunocitoquímica utilizando o anticorpo osteopontina (protocolo e anticorpo fornecidos no kit).

Para a diferenciação em condrócitos, plaqueou-se $2,5 \times 10^5$ células por tubo. Essas células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura para CTM (fornecido no kit). Após esse período, todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, foi adicionado 0,5 mL de meio de indução DMEM/F-12 contendo 10% de SBF e 1% de suplemento condrogênico (fornecido no kit). O período de diferenciação das CTM em condrócitos foi de 21 dias. Posteriormente, o pellet formado foi fixado com 4% paraformaldeído para criosecção. Avaliou-se a morfologia do tecido condrogênico através da coloração das criosecções com azul de toluidina.

3.2.9 Diferenciação *in vitro* da célula tronco mesenquimal em célula endotelial “like”

As CTM isoladas como descrito no item 3.2.7 foram plaqueadas em frascos de 25 cm² por 24 horas até a aderência celular. Após a adesão celular, foi retirado totalmente o meio de cultura e adicionado meio de crescimento endotelial EGM-2 (EGMTM-2[®] *Endothelial Cell Growth Medium*, Lonza, Walkersville, EUA) suplementado com 2% de SBF, VEGF, hFGF-B, R-IGF-1, hEGF, heparina, ácido

ascórbico, GA-1000 e Glutamina penicilina-estreptomicina 100x. As células foram cultivadas pelo período de duas semanas em temperatura de 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, com troca total do meio EGM-2 a cada três dias. As modificações de forma e organização celulares foram observadas em microscópio invertido a cada 48 horas.

3.2.10 Extração e análise de RNA total

O RNA total foi obtido a partir das CTM e das CE-like dos animais dos grupos Controle e Desnutrido, conforme descrito nos itens 3.2.7 e 3.2.9, usando o kit *RNeasy Mini* (Qiagen, Incorporated, Chatsworth, EUA) com tratamento com DNase e seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o RNA total foi imediatamente mensurado por espectrofotometria pelo equipamento *NanoVue Plus* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A absorbância máxima dos ácidos nucléicos sob luz UV ocorre no comprimento de onda de 260 nm e a concentração de RNA total é dada em ng/μL, onde uma unidade de densidade óptica equivale a 40 μg de RNA por mL de solução. A pureza do RNA total foi avaliada pela razão de absorbância A_{260nm}/A_{280nm} (SAMBROOK, 2001), sendo que foram consideradas adequadas para utilização as amostras cujas razões de absorbância encontravam-se na faixa entre 1,9 e 2,1. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1,0%. As amostras de RNA foram armazenadas em alíquotas a -80°C até que a transcrição reversa fosse realizada.

3.2.11 Síntese do DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) das amostras foi sintetizado a partir de RNA total. Foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), que utiliza a enzima transcriptase reversa *MultiScribe™*. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 500 ng de RNA total em um volume total de 10 μL em água livre de DNase e RNase. A proporção de reagentes utilizada para a transcrição reversa foi: 2,0 μL de 10x *RT Buffer*, 0,8 μL de 25x *dNTP Mix* (100 mM), 2,0 μL de 10x *RT Random Primers*, 1,0 μL de transcriptase

reversa MultiScribe™, 1,0 µL de inibidor de RNase e 3,2 µL de água livre de DNase e RNase, totalizando um volume final de 20 µL. A reação foi feita sob as seguintes condições de ciclagem: incubação dos reagentes por 10 minutos a 25°C, aquecimento a 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C, seguindo as instruções do fabricante. A eficiência da reação de transcrição reversa foi considerada igual para todas as amostras. O cDNA obtido foi armazenado a -40 °C até a realização da PCR em tempo real.

3.2.12 Seleção dos genes de referência e de interesse

A análise da expressão gênica foi feita pelo método de quantificação relativa, no qual foi utilizado um gene de referência como controle endógeno. Neste intuito, foram testados quatro genes constitutivos (*ACTB*, *GAPDH*, *HRPT1* e *RN18s*) e foram testados “pools” de quatro tipos de amostras: (1) CTM / grupo Controle; (2) CTM / grupo Desnutrido; (3) CE-like / grupo Controle e (4) CE-like / grupo Desnutrido. Os resultados foram avaliados pelo programa geNorm™ (VANDESOMPELE et al., 2002), sendo que o gene *RN18S* apresentou a estabilidade mais adequada para normalização dos valores de expressão gênica.

Foi realizada uma revisão bibliográfica na qual os genes de interesse foram selecionados a partir de marcadores potenciais descritos em estudos prévios. A seleção seguiu os seguintes parâmetros: (a) genes expressos por células endoteliais para caracterização da CE-like, (b) genes expressos pelas CTM, (c) genes que distinguem o nicho perivascular e (d) genes expressos pelas CTM e CE-like com envolvimento potencial em processos de diferenciação, proliferação e migração da célula tronco hematopoética. Os genes de interesse selecionados para este trabalho estão descritos na **Tabela 4**.

A eficiência dos ensaios de amplificação foi calculada utilizando-se a curva padrão obtida da relação de diferentes concentrações de cDNA e os respectivos valores de limiar de amplificação (C_t – *Cycle Threshold*). Foram utilizadas as diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 a partir de um *pool* contendo cDNA extraído de CTM, sendo que os pontos da curva foram feitos em triplicata.

O cálculo da eficiência foi feito de acordo com a fórmula: $E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1$. Foram realizadas curvas de eficiência para os genes de referência e de

interesse. As eficiências foram consideradas adequadas para todos os genes avaliados neste trabalho, visto que os valores de eficiência obtidos encontraram-se dentro de uma faixa entre 96 e 104%.

3.2.13 Determinação da expressão dos genes de interesse

A determinação da expressão dos genes listados na **Tabela 4** foi feita por PCR em tempo real utilizando o sistema *TaqMan*[®] (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e os ensaios foram conduzidos no equipamento *A&B StepOne Plus Real-Time PCR System*[®] (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). Neste sistema, a amplificação é avaliada por monitoramento contínuo da fluorescência de cada amostra, entre 520 e 660 nm, de forma que a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA presente na amostra. Estes dados são traduzidos por um software específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa (HIRAYAMA et al., 2008).

O volume total de reação de 10 µl foi composto de 1,0 µL de cDNA, 5,0 µl de *TaqMan*[®] *Fast Universal Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), 0,5 µl de cada iniciador (sense e antisense) – marcado com sonda FAM e referência passiva ROX – e 3,5 µl de água livre de DNase e RNase. As condições de ciclagem foram: pré-incubação por 2,0 minutos a 50°C e por 20 segundos a 95°C para desnaturação das dupla-fitas de cDNA, seguido de 40 ciclos de 01 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C.

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

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

O ΔCt foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média dos Cts do controle endógeno, para normalização dos dados. Como calibrador, foi utilizada a média aritmética do ΔCt das CTM do grupo Controle,

empregada como base para resultados comparativos. Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram utilizados controles negativos.

Tabela 4: Características dos ensaios TaqMan® utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.

Nome do gene	Símbolo do gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Genes para caracterização da CE-like				
CD73	NT5E	<i>Mus musculus</i>	Mm00501910_m1	77
VEGFR-1	FLT1	<i>Mus musculus</i>	Mm00438980_m1	58
VEGFR-2	KDR	<i>Mus musculus</i>	Mm01222421_m1	64
CD31	PECAM1	<i>Mus musculus</i>	Mm01242584_m1	71
Fator de Von Willebrand	VWF	<i>Mus musculus</i>	Mm00550376_m1	63
VE-Caderina	CDH5	<i>Mus musculus</i>	Mm00486938_m1	69
CD106	VCAM1	<i>Mus musculus</i>	Mm01320970_m1	71
CD105	ENG	<i>Mus musculus</i>	Mm00468256_m1	70
Genes para avaliação da função das CTM				
Icam-1	ICAM1	<i>Mus musculus</i>	Mm00516023_m1	58
PDGF-B	PDGFB	<i>Mus musculus</i>	Mm00440677_m1	62
CD146	MCAM	<i>Mus musculus</i>	Mm00522397_m1	84
Genes para caracterização do nicho perivascular				
Nestina	NES	<i>Mus musculus</i>	Mm00450205_m1	72
Receptor de leptina	LEPR	<i>Mus musculus</i>	Mm00440181_m1	97
NG2	CSPG4	<i>Mus musculus</i>	Mm00507257_m1	70
Genes para avaliação da modulação da hematopoese				
Angiopoetina-1	ANGPT1	<i>Mus musculus</i>	Mm00456503_m1	84
SDF-1	CXCL12	<i>Mus musculus</i>	Mm00445553_m1	85
SCF	KITL	<i>Mus musculus</i>	Mm00442972_m1	91
CD133	PROM1	<i>Mus musculus</i>	Mm00477115_m1	67
TGF-β1	TGFB1	<i>Mus musculus</i>	Mm01178820_m1	59
IGF-1	IGF1	<i>Mus musculus</i>	Mm00439560_m1	77

Continuação da Tabela 4: Características dos ensaios TaqMan[®] utilizados para avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.

Nome do gene	Símbolo do gene	Espécie	Identidade do ensaio	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
Genes para avaliação da modulação da hematopoese				
IL-11	IL11	<i>Mus musculus</i>	Mm00434162_m1	130
IL-3	IL3	<i>Mus musculus</i>	Mm00439631_m1	85
M-CSF	CSF1	<i>Mus musculus</i>	Mm00432686_m1	70
GM-CSF	CSF2	<i>Mus musculus</i>	Mm01290062_m1	125
G-CSF	CSF3	<i>Mus musculus</i>	Mm00438335_g1	63
Wnt-3a	WNT3A	<i>Mus musculus</i>	Mm00437337_m1	86
Wnt-5a	WNT5A	<i>Mus musculus</i>	Mm00437347_m1	70
Gene de referência				
18S ribossomal RNA	RN18s	<i>Mus musculus</i>	Mm03928990_g1	61

pb: pares de bases

3.2.14 Avaliação da produção de citocinas

As culturas celulares de CTM e CE-like em P1 foram tripsinizadas, conforme descrito no item 4.2.7, e as células obtidas foram classificadas em segunda passagem (P2). A viabilidade celular foi avaliada com azul de Trypan 1% em hemocítômetro de Neubauer. Foram plaqueadas 5×10^5 células viáveis por poço em placa de 6 wells, sendo que as CTM foram cultivadas em DMEM baixa glicose (Cultilab[®], Campinas, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Cultilab[®], Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA) e as CE-like foram cultivadas em meio EGM-2 (EGMTM-2[®] *Endothelial Cell Growth Medium*, Lonza,

Walkersville, EUA) suplementado com 2% de SBF, VEGF, hFGF-B, R-IGF-1, hEGF, heparina, ácido ascórbico, GA-1000 e Glutamina penicilina-estreptomicina 100x. Após 24 horas, foi realizada a coleta de sobrenadante das culturas celulares, que foi armazenado a -40°C.

Foi realizada a quantificação de citocinas no sobrenadante coletado das culturas celulares através de imunoensaio do tipo ELISA. Para a quantificação de SCF, CXCL-12, TGF- β , GM-CSF E IL-11 foram utilizados “Kits” comerciais da Quantikine® ELISA (R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) e para a quantificação de Ang-1 foi utilizado o “Kit” comercial da Uscn Life Science (Uscn Life Science Inc., Wuhan, China), seguindo as orientações dos fabricantes.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 6.0e™ for Mac OS X (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de homocedasticidade da amostra e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva Normal (curva Gaussiana). Posteriormente, os dados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos apropriados, os quais estão mencionados junto aos seus respectivos resultados. O nível de significância adotado para a análise estatística foi de 5%, ou seja, $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

4.1.1 Avaliação da variação do peso corpóreo

Após um período de 7 a 10 dias de adaptação, os animais foram separados em grupos Controle e Desnutrido e alimentados com as respectivas rações. O peso corpóreo dos camundongos foi acompanhado durante todo o período de indução da desnutrição. A **Figura 2** mostra o percentual de variação do peso dos animais dos grupos estudados estimado através da relação entre o peso inicial e o peso do animal na data do experimento. Após o período de indução da desnutrição de 5 semanas, o grupo Desnutrido apresentou perda de peso, ao contrário do grupo Controle.

Figura 2. Variação de peso corpóreo. Resultados representam a variação final do peso corpóreo dos grupos Controle (n=30) e Desnutrido (n=30). Teste estatístico utilizado: Teste T de Student. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). n representa o número de animais avaliados.

4.1.2 Análise do consumo de ração e do consumo proteico

Durante o período de indução da desnutrição, os animais do grupo Controle ingeriram uma quantidade diária de ração maior que o grupo Desnutrido: $4,11 \pm 0,05$ g/dia/animal (média $\pm$ DPM) e $3,80 \pm 0,06$ g/dia/animal (média $\pm$ DPM), respectivamente (**Figura 3A**). O modelo de desnutrição proposto é baseado no consumo reduzido de proteínas; enquanto o grupo Controle consumiu uma média diária de $0,4933 \pm 0,0346$ g/dia (média $\pm$ DPM), o grupo Desnutrido consumiu $0,0761 \pm 0,0066$ g/dia (média $\pm$ DPM). Estes resultados estão demonstrados na **Figura 3B**. Os valores de consumo proteico foram calculados com base na dosagem de proteínas de cada lote de ração (dados não demonstrados).

Figura 3. Consumo diário de ração e proteínas. **(A)** Resultados representam a média de consumo de ração diário dos grupos Controle (n=30) e Desnutrido (n=30). **(B)** Resultados representam a média de consumo proteico diário dos grupos Controle (n=30) e Desnutrido (n=30). Teste estatístico utilizado: Teste T de Student. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). n representa o número de animais avaliados.

4.1.3 Avaliação das concentrações séricas de proteínas totais e albumina

O grupo Desnutrido apresentou níveis séricos de proteínas totais menores que o grupo Controle, $3,624$ ($3,355 - 3,914$) g/dL (média geométrica e intervalo de confiança 95% - IC95%) e $4,026$ ($3,834 - 4,228$) g/dL (média geométrica e IC95%),

respectivamente (**Figura 4A**). Resultados semelhantes foram observados na concentração sérica de albumina, em que o grupo Desnutrido apresentou $1,806 \pm 0,124$ g/dL (média $\pm$ DPM) e o grupo Controle apresentou $2,023 \pm 0,163$ g/dL (média $\pm$ DPM). Estes resultados estão demonstrados na **Figura 4B**.

Figura 4. Concentração sérica de proteínas totais e albumina. **(A)** Resultados representam a média da concentração sérica de proteínas totais dos grupos Controle (n=10) e Desnutrido (n=10). Teste estatístico utilizado: Mann-Whitney. Resultados expressos em média geométrica e IC95%. **(B)** Resultados representam a média da concentração sérica de albumina dos grupos Controle (n=10) e Desnutrido (n=10). Teste estatístico utilizado: Teste T de Student. Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). n representa o número de animais avaliados.

4.2 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

4.2.1 Hemograma

Como consequência da dieta hipoprotéica, os animais do grupo Desnutrido apresentaram redução significativa no número de hemácias, nos valores de hematócrito e na concentração de hemoglobina quando comparados aos animais do grupo Controle. Os resultados do eritograma estão ilustrados na **Tabela 5**.

A análise da séria leucocitária revelou que os animais desnutridos

apresentaram leucopenia significativa em relação aos animais controles, com consequente redução dos valores absolutos de neutrófilos, linfócitos e monócitos (**Tabela 5**). Na contagem diferencial destas células, não foi observada diferença significativa. Eosinófilos e basófilos raramente foram encontrados nos animais de ambos os grupos.

Não houve diferença estatística entre os dois grupos avaliados na contagem total de plaquetas (**Tabela 5**).

Tabela 5. Hemograma

Parâmetros	Grupo Controle (n=15)	Grupo Desnutrido (n=15)	p valor
Eritrograma			
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8,65 $\pm$ 1,16	7,90 $\pm$ 1,09	0,011
Hemoglobina (g/dL)	12,49 $\pm$ 1,46	11,05 $\pm$ 1,40	<0,001
Hematócrito (%)	38,61 $\pm$ 4,85	34,21 $\pm$ 4,88	<0,001
Leucograma			
Leucócitos (/mm ³)	2014,0 $\pm$ 484,6	841,2 $\pm$ 350,9	<0,001
Neutrófilos	212,8 $\pm$ 77,6	113,8 $\pm$ 40,1	<0,001
Linfócitos	1707,0 $\pm$ 84,4	653,1 $\pm$ 45,1	<0,001
Monócitos	36,6 $\pm$ 19,4	8,8 $\pm$ 8,7	<0,001
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	740,8 $\pm$ 56,63	753,3 $\pm$ 62,54	

Valores comparativos dos parâmetros hematológicos de amostras sanguíneas. Teste estatístico utilizado: teste T de Student; resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão da média (DPM). n representa o número de animais avaliados.

4.2.2 Mielograma

O grupo Desnutrido apresentou redução significativa na contagem de células totais da medula óssea quando comparado ao grupo Controle, sendo que a média obtida foi 2,14 (1,91 - 2,41) $\times 10^7$ células/mL (média geométrica – IC95%) e 2,85 (2,50 - 3,25) $\times 10^7$ células/mL (média geométrica – IC95%), respectivamente (**Figura 5**). A análise diferencial demonstrou uma redução significativa de células das

linhagens granulocítica e eritróide (**Tabela 6**).

Figura 5. Celularidade da medula óssea. Resultados representam a média do número de células totais nucleadas na medula óssea de camundongos do grupo Controle (n=4) e do grupo Desnutrido (n=4). Teste estatístico utilizado: Mann-Whitney. Resultados expressos em média geométrica e intervalo de confiança (IC95%).

Tabela 6. Mielograma

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Desnutrido	p valor
	(n=4) (x10 ⁵ /mm ³)	(n=4) (x10 ⁵ /mm ³)	
Blastos	10,6 ± 0,9	6,0 ± 1,0	0,022
Granulócitos			
Formas jovens	4,3 ± 0,8	2,2 ± 0,1	0,088
Formas em anel	19,0 ± 3,6	8,2 ± 1,1	0,021
Segmentados	126,0 ± 3,9	108,5 ± 1,9	0,007
Eosinófilos	11,4 ± 1,8	4,9 ± 1,1	0,022
Monócitos	1,4 ± 0,8	0,5 ± 0,4	0,361
Plasmócitos	2,2 ± 1,4	1,1 ± 0,6	0,492
Linfócitos	45,7 ± 10,1	23,9 ± 2,0	0,071
Eritroblastos jovens	14,68 ± 0,1	8,2 ± 0,5	0,002
Eritroblastos maduros	72,6 ± 8,9	47,9 ± 2,1	0,017

Resultados comparativos dos valores absolutos das diferentes células hematopoéticas na medula óssea. Teste estatístico utilizado: teste T de Student; resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM). n representa o número de animais avaliados.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL

A técnica de imunofluorescência mostrou positividade de expressão do marcador CD271 e indicou a presença das CTM nas culturas celulares, conforme demonstrado na **Figura 6**.

Foi realizada a caracterização imunofenotípica confirmatória da CTM por citometria de fluxo. As células foram marcadas para CD90, CD49e, CD271 e Sca1 – indicadores de fenótipo de CTM - e CD34, CD45 e CD14 - marcadores hematopoéticos.

Os resultados obtidos demonstraram positividade nas células marcadas para CD49e, CD90, CD271 e Sca1, e fraca positividade para células marcadas para CD34 e negatividade marcadas para CD14 e CD45 (resultados não demonstrados). Desta forma, as células obtidas exibiram um perfil de expressão de marcadores de superfície compatível com CTM.

Figura 6. Fotomicrografias representativas das CTM avaliadas por imunofluorescência. **(A)** Marcação para CD271 com anticorpo fluorescente FITC. Aumento 40x. **(B)** Sobreposição da marcação nuclear com DAPI. Aumento 40x.

Com respeito ao potencial de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos, as CTM exibiram capacidade de se diferenciar nestes três tipos celulares (**Figura 7**).

Figura 7. Fotomicrografias representativas dos testes de diferenciação *in vitro* das CTM em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. **(A)** Fotomicrografia representativa de osteoblastos corados pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado. Aumento 10x. **(B)** Fotomicrografia representativa de osteoblastos corados com vermelho da alizarina. Aumento 10x. **(C)** Fotomicrografia representativa de osteoblastos marcados com anticorpo anti-osteopontina. Aumento 10x. **(D)** Fotomicrografia representativa de adipócitos corados com *oil red*. Aumento 40x. **(E)** Fotomicrografia representativa de adipócito marcado com anticorpo FABP4. Aumento 40x. **(F)** Fotomicrografia representativa de pellet de condrócitos. Aumento 10x.

4.4 DIFERENCIAÇÃO IN VITRO DA CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL EM CÉLULA ENDOTELIAL “LIKE”

As CTM foram cultivadas como descrito no 3.2.9 para indução da diferenciação *in vitro* para CE-like e durante o período necessário para a diferenciação, foram coletadas fotomicrografias das culturas celulares. No primeiro dia de indução da diferenciação (**Figura 8A**), as culturas celulares apresentaram morfologia poligonal e fibroblastóide, característica de células tronco mesenquimais. No sétimo dia (**Figura 8B**) e ao final do período de diferenciação (14º dia – **Figura 8C**), se pode observar morfologia alongada característica e alteração na organização celular na cultura, na qual as células se rearranjaram em estruturas

semelhantes a vasos. Não foram observadas diferenças quantitativas e/ou morfológicas no padrão de diferenciação entre os grupos Controle e Desnutrido.

Figura 8. Fotomicrografias representativas das CTM do grupo Controle no período de indução de diferenciação endotelial. **(A)** Fotomicrografia de CTM no dia 01 de indução de diferenciação celular em meio EGM-2[®]. Aumento 10x. **(B)** Fotomicrografia de CTM / CE-like no dia 07 de indução de diferenciação celular em meio EGM-2[®]. Aumento 10x. **(C)** Fotomicrografias das CE-like no dia 14 de indução de diferenciação celular em meio EGM-2[®]. Aumento 10x.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.5.1 Expressão de genes de caracterização de fenótipo endotelial

Foram avaliadas as expressões dos genes *NT5E*, *FLT1*, *KDR*, *PECAM1*, *VWF*, *CDH5*, *VCAM1*, e *ENG* para caracterização do fenótipo endotelial adquirido após a indução da diferenciação *in vitro*, conforme descrito no item 3.2.9.

Foi observada maior expressão de *NT5E* pelas CE-like do grupo Controle quando comparado às CTM dos grupos Controle e Desnutrido. Entretanto, não foi observado aumento de expressão pelas CE-like do grupo Desnutrido (**Figura 9A**). Conforme esperado, houve expressão acentuada de *FLT1*, *KDR* e *VCAM1* pelas CE-like de ambos os grupos (**Figuras 9B, 9C e 9G**).

A expressão de *PECAM1* pelas células do grupo Controle mostrou-se cerca de três vezes maior nas CE-like quando comparada às CTM, porém não houve diferença estatística na comparação com as células do grupo Desnutrido (**Figura 9D**). A

expressão de VWF mostrou-se reduzida na CE-like do grupo Desnutrido quando comparada à expressão da CTM do grupo Controle (**Figura 9E**). A expressão de *CDH5* e *ENG* mostrou-se similar entre as CTM e as CE-like nos grupos estudados (**Figuras 9F e 9H**).

Figura 9. Resultados da expressão gênica de caracterização de fenótipo endotelial. **(A)** Expressão de *NT5E* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). **(B)** Expressão de *KDR* por CTM dos grupos Controle (n=12) Desnutrido (n=12) e CE-like dos grupos Controle (n=7) e Desnutrido (n=10). **(C)** Expressão de *FLT1* por CTM dos grupos Controle (n=8) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=7) e Desnutrido (n=11). **(D)** Expressão de *PECAM1* por CTM dos grupos

Controle (n=11) Desnutrido (n=9) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=10). (E) Expressão de *VWF* por CTM dos grupos Controle (n=16) Desnutrido (n=16) e CE-like dos grupos Controle (n=15) e Desnutrido (n=15). (F) Expressão de *CDH5* por CTM dos grupos Controle (n=12) Desnutrido (n=12) e CE-like dos grupos Controle (n=7) e Desnutrido (n=7). (G) Expressão de *VCAM1* por CTM dos grupos Controle (n=9) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=7) e Desnutrido (n=11). (H) Expressão de *ENG* por CTM dos grupos Controle (n=8) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=5) e Desnutrido (n=11). Teste estatístico utilizado: One-way ANOVA, *post hoc*: Teste de comparações múltiplas de Tukey. Resultados expressos em média e desvio padrão da média (DPM). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. n representa o número de animais avaliados.

4.5.2 Genes para avaliação da função das CTM

Com a finalidade de avaliar possíveis efeitos da DPE, foi investigada a expressão dos genes *PDGFB1*, *MCAM* e *ICAM1*, amplamente expressos pelas CTM. Conforme esperado, estes genes foram mais expressos pelas CTM em relação às CE-like e não foi observada diferença entre os respectivos grupos Controle e Desnutrido (**Figura 10**).

Figura 10. Resultados da expressão gênica de caracterização de função da CTM. **(A)** Expressão de *PDGFB1* por CTM dos grupos Controle (n=9) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). **(B)** Expressão de *MCAM* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). **(C)** Expressão de *ICAM1* por CTM dos grupos Controle (n=8) Desnutrido (n=9) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). Teste estatístico utilizado: One-way ANOVA, *post hoc*: Teste de comparações múltiplas de Tukey. Resultados expressos em média e desvio padrão da média (DPM). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. n representa o número de animais avaliados.

4.5.3 Expressão de genes de caracterização do nicho perivascular

Não foi observada diferença estatística na expressão dos genes *NES* e *CSPG4* entre os grupos Controle e Desnutrido nos dois tipos celulares avaliados (**Figuras 11A e 11C**). A expressão do gene *LEPR* nas CE-like foi maior o grupo Desnutrido em relação à expressão deste gene pelas CTM de ambos os grupos, entretanto não foi observada diferença em relação ao grupo Controle das CE-like (**Figura 11B**).

Figura 11. Resultados da expressão gênica de caracterização do nicho perivascular. **(A)** Expressão de *NES* por CTM dos grupos Controle (n=9) Desnutrido (n=10) e CE-like dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=10). **(B)** Expressão de *LEPR* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=10) e CE-like dos grupos Controle (n=7) e Desnutrido (n=10). **(C)** Expressão de *CSPG4* por CTM dos grupos Controle (n=6) Desnutrido (n=10) e CE-like dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=5). Teste estatístico utilizado: One-way ANOVA, *post hoc*: Teste de comparações múltiplas de Tukey. Resultados expressos em média e desvio padrão da média (DPM). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. n representa o número de animais avaliados.

4.5.4 Expressão de genes para avaliação da modulação da hematopoese

Os resultados da expressão de genes moduladores da hematopoese mostraram que a CE-like expressa mais *ANGPT1* e *PROM* que as CTM e não houve diferença estatística nos respectivos grupos Desnutridos (**Figuras 12A e 12D**). A expressão de *CXCL12* pelas CTM foi similar nos grupos avaliados, entretanto, a expressão desse gene pelas CE-like mostrou-se aumentada no grupo Controle (**Figura 12B**).

Nas CTM, a expressão de *KITL* foi maior no grupo Desnutrido em relação ao

grupo Controle. Já as CE-like de ambos os grupos expressaram mais *KITL* que as CTM (**Figura 12C**). A expressão de *TGFB1*, *CSF1*, *CSF2*, *CSF3* e *WNT5A* foi semelhante nos dois tipos celulares, tanto dos animais controles quanto dos animais desnutridos (**Figuras 12E, 12H, 13A, 13B e 13C**).

As CTM expressaram mais *IGF1* que as CE-like e não foi observada diferença entre os grupos Controle e Desnutrido (**Figura 12F**). Com relação à expressão gênica de *IL11*, foi observada maior expressão nas CE-like pelo grupo Desnutrido em relação ao grupo Controle das CTM (**Figura 12G**).

Não foi detectada expressão dos genes *WNT3A* e *IL3* em nenhum tipo celular de ambos os grupos avaliados.

Figura 12. Resultados da expressão gênica para avaliação da modulação da hematopoese. (A) Expressão de *ANGPT1* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). (B) Expressão de *CXCL12* por CTM dos grupos Controle (n=9) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). (C) Expressão de *KITL* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=10) e CE-like dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=9). (D) Expressão de *PROM1* por CTM dos

grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=10) e CE-like dos grupos Controle (n=7) e Desnutrido (n=11). (E) Expressão de *TGFB1* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=159). (F) Expressão de *IGF1* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). (G) Expressão de *IL11* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). (H) Expressão de *CSF1* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). Teste estatístico utilizado: One-way ANOVA, *post hoc*: Teste de comparações múltiplas de Tukey. Resultados expressos em média e desvio padrão da média (DPM). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. n representa o número de animais avaliados.

Figura 13. Resultados da expressão gênica para avaliação da modulação da hematopoese. (A) Expressão de *CSF2* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=9) e CE-like dos grupos Controle (n=4) e Desnutrido (n=5). (B) Expressão de *CSF3* por CTM dos grupos Controle (n=8) Desnutrido (n=7) e CE-like dos grupos Controle (n=5) e Desnutrido (n=5). (C) Expressão de *WNT5A* por CTM dos grupos Controle (n=10) Desnutrido (n=11) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=11). Teste estatístico utilizado: One-way ANOVA, *post hoc*: Teste de comparações múltiplas de Tukey. Resultados expressos em média e desvio padrão da média (DPM). Letras diferentes representam diferença estatisticamente

significativa entre os grupos. n representa o número de animais avaliados.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS

A produção de Ang-1 mostrou-se mais acentuada pelas CE-like do grupo Controle em relação aos demais (**Figura 14A**). A produção de CXCL-12 mostrou-se reduzida no grupo Desnutrido, tanto das CTM quanto das CE-like, entretanto a redução foi mais pronunciada nas CTM (**Figura 14B**). Foi observada maior produção de SCF no grupo Controle pelas CE-like em relação às CTM, em contrapartida, quando o grupo Desnutrido é avaliado, observou-se maior produção pela CTM e menor produção pela CE-like, em relação aos seus respectivos controles (**Figura 14C**).

Foi observada maior produção de IL-11 pelo grupo Desnutrido das CE-like em relação aos demais grupos (**Figura 14D**). Não foi observada diferença estatística na produção de TGF- β 1 e GM-CSF nos grupos avaliados (**Figuras 14E e 14F**).

Figura 14. Resultados da quantificação de citocinas. **(A)** Produção de SCF por CTM dos grupos Controle (n=6) Desnutrido (n=6) e CE-like dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=6). **(B)** Produção de CXCL-12 por CTM dos grupos Controle (n=5) Desnutrido (n=5) e CE-like dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=6). **(C)** Produção de ANG-1 por CTM dos grupos Controle (n=9) Desnutrido (n=7) e CE-like dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=7). **(D)** Produção de TGF-β1 por CTM dos grupos Controle (n=6) Desnutrido (n=6) e CE-like dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=7). **(E)** Produção de IL-11 por CTM dos grupos Controle (n=5) Desnutrido (n=7) e CE-like dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=7). **(F)** Produção de GM-CSF por CTM dos grupos Controle (n=6) Desnutrido (n=6) e CE-like dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=6). Teste estatístico utilizado: One-way ANOVA, *post hoc*: Teste de comparações múltiplas de Tukey. Resultados expressos em média e desvio padrão da média (DPM). Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5 DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS NUTRICIONAIS E HEMATOLÓGICOS

A desnutrição, nos mais variados graus, ainda constitui um sério problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, entretanto não está restrita a estes (SCHOFIELD e ASHWORTH, 1996; WHO, 2011). A DPE não promove somente graves consequências para a saúde, como também a economia de um país é afetada pela desnutrição. Além de aumentar os gastos em saúde, a alta prevalência desta doença atrasa o desenvolvimento econômico e perpetua a pobreza devido à perda na produtividade pelo estado físico debilitado e, de forma indireta, devido à deficiência das funções cognitivas e no aprendizado (WORLD BANK, 2006).

Diversos programas de combate à desnutrição, como o Programa Bolsa Família, foram implementados ao longo dos anos no Brasil. Porém, um estudo recente de Wolf e Barros Filho indica que o estado nutricional dos beneficiários do programa não está de acordo com o esperado pelos objetivos do programa, visto que quase 70% das famílias beneficiadas relataram um aumento no consumo de alimentos altamente calóricos, mas de baixo valor nutricional (WOLF e BARROS FILHO, 2014).

Os efeitos mais importantes da dieta sobre o organismo ocorrem a nível molecular e podem ser tanto benéficos quanto prejudiciais, envolvendo diversos órgãos em seus mais variados – e complexos – níveis de regulação (HIRSCH e EVANS, 2005).

Constituintes da dieta, tanto macro quanto micronutrientes, participam da regulação da expressão gênica em resposta a alterações nutricionais (CORTHESEY-THEULAZ et al., 2005). Assim, a DPE não causa somente consequências momentâneas para o organismo. Um menor consumo de energia e proteínas de boa qualidade, suficientemente importante para acarretar baixo peso e/ou estatura, desencadeia uma série de fenômenos fisiológicos para garantir a sobrevivência, mas que são deletérios a longo prazo (COZZOLINO e COMINETTI, 2013). Por exemplo,

a DPE modifica por efeito epigenético os mecanismos de controle do estresse, com alterações na síntese de adrenalina, noradrenalina, cortisol e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Estas alterações metabólicas causam malformação em vasos e provocam alterações permanentes no metabolismo intermediário, levando à menor oxidação de gordura e danos na síntese muscular e óssea. Em longo prazo, a DPE pode favorecer o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes, hipertensão e obesidade. De fato, existe uma correlação entre DPE na infância e obesidade na idade adulta, principalmente em mulheres (FLORENCIO et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; COZZOLINO e COMINETTI, 2013).

A literatura contém diversos estudos sobre DPE em seres humanos, abrangendo crianças e adultos, indivíduos originários de locais onde a fome é endêmica ou voluntariamente desnutridos, pacientes hospitalizados – portadores ou não de doenças crônicas – nos quais múltiplas deficiências nutricionais podem estar presentes ou nas quais os efeitos da doença de base ou terapia são difíceis de serem distinguidos daquelas causados pela deficiência nutricional.

A maioria dos estudos dos efeitos dos nutrientes sobre a expressão gênica provém de modelos animais. Entretanto, a experimentação animal também apresenta uma gama de situações distintas: diferença entre as espécies, isogenicidade ou não das espécies, sexo, idade, tipos e formas de desnutrição. Assim, muitas vezes pode ser difícil definir o perfil de como a desnutrição modula algumas respostas do organismo.

Optamos por trabalhar com um modelo murino, no qual utilizamos camundongos C57Bl/6 machos e adultos jovens. Se optou por utilizar animais do sexo masculino neste trabalho, com a finalidade de evitar interferências causadas por alterações hormonais características de fêmeas durante o ciclo estral. Outra característica importante é a idade destes animais, pois camundongos adultos jovens já atingiram a maturidade hematológica e utilizar uma estreita faixa de idade reduz variáveis indesejadas relativas às idades baixa ou avançada (BANNERMAN, 1983; FOCK, 2005).

No modelo experimental utilizado, os animais foram induzidos à desnutrição a partir de uma dieta hipoproteica durante cinco semanas. Segundo Quinn, o período de cinco semanas para o camundongo tem grandeza semelhante a dois anos de idade para o homem (QUINN, 2005). Desta forma, se pode julgar o modelo

utilizado como equivalente a dois anos de alterações na dieta e considerar como uma afecção crônica.

As rações normo e hipoproteica utilizadas são isocalóricas e foram elaboradas considerando os teores de vitaminas, ácidos graxos e sais minerais necessários para fornecer uma dieta adequada, restringindo-se apenas a quantidade de proteína na ração hipoproteica (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997). Utilizamos caseína como fonte proteica na elaboração das rações, devido ao seu alto valor biológico.

Foi observado um menor consumo de ração pelos animais do grupo Desnutrido em relação aos animais do grupo Controle e, conseqüentemente, menor consumo calórico. Somados os menores consumos calórico e proteico, decorrente da ração hipoproteica, se caracterizou uma desnutrição proteico-energética (DPE).

As informações da literatura são conflitantes com relação a dietas hipoproteicas e consumo de ração; alguns trabalhos mostram aumento de consumo (COLOMBO et al., 1992; WHITE et al., 1998; NAKAJIMA et al., 2014), enquanto outros relatam comportamento anorético dos animais (BECK et al., 1989; MERCER et al., 1994). Este comportamento em relação à redução na ingestão de ração hipoproteica era esperado, visto que esta reação é habitual em outros trabalhos realizados por nosso grupo (BORELLI et al., 2004; BORELLI et al., 2007; FOCK et al., 2007; FOCK et al., 2008; BORELLI et al., 2009; FOCK, BLATT, et al., 2010; FOCK, ROGERO, et al., 2010; FOCK et al., 2012) e pode ser explicada por alterações nas concentrações plasmáticas de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, valina e isoleucina), os quais influenciam a regulação do centro da fome (FERRO-LUZZI e SPADONI, 1978).

Como consequência da instalação da DPE, os animais do grupo Desnutrido apresentaram expressiva redução de peso corpóreo, contrastando com os animais do grupo Controle, que apresentaram aumento do peso corporal. Na privação proteica, o organismo tende a utilizar aminoácidos provenientes da musculatura esquelética e, em menor proporção, da musculatura lisa (HUANG e FRAKER, 2003; ALVES et al., 2008; MALAFAIA et al., 2009). De fato, foi observado (dados não demonstrados) que os animais do grupo Desnutrido apresentaram depleção do tecido muscular esquelético, justificando a perda de peso observada.

Em decorrência da menor ingestão proteica pelos animais do grupo Desnutrido, observamos, conforme esperado, redução nas concentrações séricas de proteínas totais e albumina. A albumina sérica é uma das principais proteínas associadas ao estado nutricional, de forma que a queda em sua concentração deriva de menor biossíntese hepática, que por sua vez é ocasionada pelo suprimento limitado de substrato proteico (CUPPARI e KAMIMURA, 2009). Assim, a perda de aproximadamente 20% do peso corpóreo inicial, associados aos valores das concentrações de proteínas totais e albumina séricas e ao hemograma, mostraram-se bons indicadores da instalação da DPE.

Em relação aos dados hematológicos, o grupo Desnutrido apresentou redução quantitativa tanto no compartimento periférico quanto no central. Os resultados dos leucogramas dos animais Desnutridos mostraram uma diminuição quantitativa de leucócitos quando comparado aos animais Controle, embora nenhuma alteração qualitativa, que se refletiu num menor valor absoluto de linfócitos, neutrófilos e monócitos circulantes no sangue periférico. Esta leucopenia pode comprometer tanto a imunidade inata, quanto a adquirida, conforme descrito em trabalhos anteriores do nosso grupo (FOCK et al., 2007; FOCK, BLATT, et al., 2010; FOCK, ROGERO, et al., 2010; LIMA, 2011). O número de plaquetas foi semelhante nos dois grupos avaliados e está de acordo com dados da literatura descritos desde 1978 (FRIED et al., 1978).

Foi observada redução do número de hemácias com consequente redução na porcentagem do volume do hematócrito e baixa concentração de hemoglobina no grupo Desnutrido. Dados de nosso laboratório demonstram que a anemia provocada pela DPE é hipoproliferativa, com redução no número de reticulócitos (BORELLI et al., 2009), baixa responsividade à eritropoietina (BORELLI et al., 2007) e com um maior número de CTH em fase G0/G1 do ciclo celular (NAKAJIMA et al., 2014).

Desta forma, pode-se inferir que o quadro hematológico encontrado no grupo Desnutrido é decorrente de uma hipoplasia medular, que corrobora com o menor número de células nucleadas na MO de animais desnutridos observado neste trabalho. A hipoplasia medular resultante da DPE é decorrente de dois fatores principais: (a) a síntese proteica necessária para a proliferação celular está comprometida pela baixa disponibilidade de substrato e (b) a DPE provoca alterações no microambiente medular e, consequentemente, na modulação da

fisiologia das CTH (VITURI et al., 2000; XAVIER et al., 2007).

5.2 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E CÉLULA ENDOTELIAL “LIKE”

A existência de um microambiente medular especializado, ou nicho hematopoético, no qual as CTH estariam associadas a células específicas que determinam o seu destino, sustenta o rigoroso controle dos processos de quiescência, proliferação, diferenciação e auto-renovação das CTH (CALVI et al., 2003; WILSON e TRUMPP, 2006; RENSTROM et al., 2010).

Atualmente, estão descritos como nichos hematopoéticos o nicho endosteal e o nicho perivascular, cada um com suas características distintas. Entretanto, estes nichos ainda são pouco compreendidos, pois pouco se entende sobre os mecanismos que regulam a formação do microambiente medular responsável pelo controle da hematopoese, principalmente se considerarmos a reduzida quantidade de informações acerca de sua localização *in situ*. Além disso, a literatura mostra dados conflitantes acerca da função exata de cada um deles *in vivo* e a determinação na íntegra dos componentes dos nichos não é consensual entre os trabalhos.

As CTH se localizam a cerca de 2 a 5 células dos vasos medulares e aproximadamente 10 células da região da metáfise óssea (ELLIS et al., 2011). Como resultado, as CTH podem residir tanto no endóstio como longe deste, mas elas sempre serão influenciadas pela vasculatura. Aceita-se que no nicho perivascular encontra-se a maior parte das CTH em proliferação, tornando-o responsável pelo estabelecimento do sistema sanguíneo. Contudo, devido à heterogeneidade de células envolvidas na regulação desse microambiente, o nicho perivascular mostra-se bastante complexo, o que se traduz em uma grande dificuldade para estudar a regulação do nicho *in vivo* e/ou reproduzi-lo *in vitro*.

Intimamente relacionadas às CTH, as CTM apresentam-se distribuídas nos nichos hematopoéticos de forma que são responsáveis pela regulação direta e indireta das CTH. Portanto, para avaliar possíveis efeitos no nicho perivascular causados pela DPE, optamos por explorar alterações nas CTM medulares e em células endoteliais derivadas destas (CE-like).

Isolamos e cultivamos CTM medulares de animais dos grupos Controle e Desnutrido pela metodologia clássica descrita por Friedenstien, que utiliza a propriedade física de aderência ao plástico (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Apesar de ser a técnica padrão para isolamento das CTM, sabe-se que não fornece uma população homogênea de CTM. Técnicas alternativas, como imunodepleção e/ou centrifugação parecem permitir o isolamento de diferentes populações de CTM, entretanto estas células não proliferam *in vitro*, provavelmente devido ao menor contato célula-célula ou ausência de citocinas específicas necessárias para as primeiras fases da cinética de expansão celular (DOBSON et al., 1999; SHORT et al., 2001; BADDOO et al., 2003; PEISTER et al., 2004).

A caracterização destas células ainda é complexa, pois, além de não haver um marcador específico para as CTM, a expressão dos marcadores pode variar conforme a espécie (humano, camundongo) e mesmo entre as diferentes linhagens de camundongos (ANJOS-AFONSO e BONNET, 2011; BOXALL e JONES, 2012). Isso é um fator limitante na escolha da técnica para a identificação dessas células. Dessa forma, as CTM atualmente são caracterizadas por uma combinação de critérios físicos e fenotípicos, além de propriedades funcionais, como a confirmação de sua multipotencialidade, utilizando testes de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Devido à sua extensa plasticidade, a existência de subpopulações de CTM justificaria a sua multipotencialidade e variedade fenotípica (PHINNEY, 2007; BOXALL e JONES, 2012).

Neste trabalho, optamos por trabalhar com CTM em P2, pois a manipulação *in vitro* dessas células resulta na perda da capacidade de diferenciação, sendo esta mantida até aproximadamente a 6ª passagem (BONAB et al., 2006). Os resultados de caracterização das CTM obtidos por imunofluorescência, imunofenotipagem por citometria de fluxo e pelos testes de diferenciação mostraram que o isolamento e a expansão celulares realizados foram efetivos. As células obtidas em cultura apresentaram positividade para os marcadores selecionados para a identificação de CTM (CD90, CD49e, CD271 e Sca-1). Também apresentaram negatividade para CD14 e CD45 e baixa positividade para CD34, indicando baixa contaminação por células hematopoéticas e, portanto, as culturas celulares obtidas se mostraram suficientemente puras para realizar os experimentos.

Em determinadas condições fisiológicas ou fisiopatológicas, as CTM podem

tanto se diferenciar em células especializadas, como osteoblastos, adipócitos, células endoteliais e reticulares, quanto manterem o seu estado indiferenciado, secretando fatores de crescimento e citocinas (SHI, 2012). Oreffo e colaboradores demonstraram que, numa situação de desnutrição proteica materna durante a gestação, os filhos apresentavam, *in vitro*, menor número de unidades formadoras de colônias de CTM e menores diferenciação e proliferação osteoblásticas, que se mostraram reversíveis (OREFFO et al., 2003). Em acordo, Cunha e colaboradores apontaram que a desnutrição proteica provoca alteração em fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação da CTM, com maior expressão de PPAR- γ e C/EBP- α , levando à diferenciação adipogênica *in vitro* (CUNHA et al., 2013).

Neste trabalho avaliamos se a DPE altera a diferenciação da CTM em CE-like, sendo que, inicialmente, foi realizado o acompanhamento das culturas celulares durante o período de diferenciação endotelial. A partir do 7º dia do período de diferenciação, foi observado um padrão homogêneo de disposição circular de células alongadas em todo o frasco de cultura, sugerindo estruturas semelhantes a vasos, que foi bastante evidente no final do período de diferenciação. De fato, as CTM apresentam este arranjo e alongamento conforme se diferenciam em células endotelial “like” e, em testes realizados em Matrigel™, formam vasos funcionais (LIU et al., 2007; JANECEK PORTALSKA et al., 2012).

Optamos por avaliar a expressão de mRNA de genes expressos por CE – *NT5E*, *KDR*, *FLT1*, *PECAM1*, *VWF*, *CDH5*, *VCAM1* e *ENG* – para determinar a obtenção de características endoteliais pelas CTM. Após o período de indução da diferenciação, observamos um aumento na expressão gênica de *NT5E*, *KDR*, *FLT1*, *PECAM1* e *VCAM1* quando comparamos as CTM e CE-like dos animais do grupo Controle.

O gene *NT5E* codifica a proteína CD73, que é expressa pelas CTM, mas altamente expressa por pericitos e CE. Além disso, a expressão da CD73 aumenta durante a diferenciação da CE-like, indicando comprometimento com a linhagem endotelial (LIU et al., 2007). A CD73 é uma nucleotidase envolvida principalmente em processos de migração e adesão metastáticos (WANG et al., 2008), e apesar de ser um marcador de identificação celular, se pode hipotetizar que também poderia fornecer informações sobre mobilização celular.

Adicionalmente, se observou um aumento na expressão de *KDR* na CE-like.

Isto revela o comprometimento endotelial adquirido, visto que este gene – também conhecido como VEGFR2 – codifica o receptor de VEGF (fator de crescimento vâsculo-endotelial), um dos mediadores mais importantes para as CE. O aumento na expressão de *FLT1* – VEGFR1 - também remete ao perfil endotelial induzido pelo meio de cultura. Além do potencial angiogênico e de modular a permeabilidade vascular, o VEGF é essencial para a sobrevivência da célula endotelial, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, prevenindo a apoptose (FERRARA et al., 2003). Outra observação importante foi a maior expressão de *VCAM1* e *PECAM1* pelas CE-like, que são marcadores expressos por CE e células estromais na MO e são utilizados classicamente como marcadores endoteliais (JANECZEK PORTALSKA et al., 2012).

Estes resultados nos permitem inferir que a obtenção de CE-like foi efetiva a partir do protocolo de diferenciação utilizado, embora não foi observada diferença estatística na expressão de *VWF*, *ENG* e *CDH5*. Com relação aos efeitos da DPE sobre a diferenciação endotelial, não observamos aumento na expressão de mRNA dos genes *NT5E* e *PECAM1*, entretanto, como não houve diferença na expressão gênica quando comparamos as CE-like dos grupos Controle e Desnutrido, julgamos que a diferenciação endotelial foi equivalente entre os grupos.

O fator de von Willebrand (vWF) é amplamente conhecido por mediar a agregação e adesão plaquetárias, mas também desempenha um papel importante na regulação negativa da angiogênese e na expressão de VEGFR2, entretanto o mecanismo para tanto não está esclarecido (LUO et al., 2012). A endogлина (Eng ou CD105), codificada pelo gene *ENG*, é um co-receptor do TGF- β expresso em CE que modula a transição dos progenitores endoteliais a células endoteliais maduras (NASSIRI et al., 2011). A VE-caderina ou CD144, codificada pelo gene *CDH5* é uma proteína reconhecida por propiciar o desenvolvimento vascular e pela estabilização de novos vasos, por interagir com o citoesqueleto e mediar as junções intercelulares endoteliais (DEJANA e GIAMPIETRO, 2012).

Era esperado maior expressão gênica desses marcadores (*VWF*, *CDH5* e *ENG*) nas CE-like, entretanto há alguns argumentos para estes resultados: (a) os trabalhos que demonstram maior expressão de *CDH5* e *ENG* não avaliaram a expressão de mRNA, e sim da proteína *per si* (LIU et al., 2007) e é descrito na literatura que a correlação é pequena entre a quantidade de mRNA e os níveis proteicos – exceto quando há aumento de mRNA (SHAROVA et al., 2009;

SCHWANHAUSSER et al., 2011) e (b) a expressão gênica de *VWF* pelas CE-like parece ser dependente de condições específicas de cultura, como o emprego de força mecânica em conjunto com a utilização de uma matriz tridimensional, como o Matrigel®; além disso CE-like provenientes de CTM imortalizadas, mesmo sob estas condições de cultura, não aumentam a expressão de *VWF*, sugerindo que a passagem celular utilizada pode ser determinante na expressão deste gene (JANECZEK PORTALSKA et al., 2012).

Neste trabalho, fizemos uma ampla avaliação do perfil de expressão gênica das CTM e das CE-like nos animais sob dieta hipoproteica, com a finalidade de compreender de forma abrangente os possíveis danos causados pela DPE, a nível de transcrição gênica, em fatores importantes para a manutenção do microambiente perivascular medular.

Assim, nos propusemos a avaliar se a expressão de genes classicamente expressos por CTM – *MCAM*, *ICAM1* e *PDGFB1* – é comprometida pela DPE. A *MCAM* (CD146) é uma proteína reconhecida por propiciar o desenvolvimento vascular e pela estabilização de novos vasos, por interagir com o citoesqueleto e mediar as junções intercelulares endoteliais. Além disso, tem papel regulatório na migração e no ciclo celular. A *MCAM* é considerada um bom marcador para as CTM, de forma que existe uma correlação positiva entre a expressão desta molécula e a multipotencialidade das CTM (WANG e YAN, 2013). O PDGF-B é expresso principalmente em células endoteliais vasculares, megacariócitos e neurônios. Os PDGFs e seus receptores são os principais mitógenos para as células de origem mesenquimal. Além do papel na proliferação celular, o PDGF-B promove migração celular e aumenta a síntese de MEC (DONOVAN, ABRAHAM, et al., 2013; DONOVAN, SHIWEN, et al., 2013).

A *ICAM-1*, também chamada de CD54, é uma molécula de adesão intercelular expressa também em células endoteliais vasculares e epiteliais, leucócitos e fibroblastos. Além disso, é apontada como a principal molécula de adesão no recrutamento de leucócitos em situações de inflamação. A *ICAM-1* aumenta a proliferação das CTM e modula a ativação das vias de sinalização ERK/MAPK, NF- κ B e PI3K/AKT, de forma que a inibição de ERK/MAPK ou NF κ B ou ativação de PI3K/AKT propicia a diferenciação osteogênica, enquanto que a inibição das vias p38/MAPK e PI3K/AKT suprimem essa diferenciação (XU et al., 2014).

Observamos, conforme esperado, maior expressão gênica destes marcadores pelas CTM, sendo que não houve diferença entre os grupos Controle e Desnutrido.

5.3 ASPECTOS REGULATÓRIOS DA HEMATOPOESE

Além de serem marcadores de CTM ou de diferenciação endotelial, esses marcadores apresentam um papel na regulação da hematopoese. O VEGF também é importante modulador da sobrevivência da CTH (GERBER et al., 2002; GERBER e FERRARA, 2003). A VCAM-1 é expressa por células endoteliais e estromais na MO e, através de interações com a integrina VLA-4, apresenta grande importância na movimentação e mobilização da CTH (NERVI et al., 2006) e, visto que as CE-like expressaram mais VCAM-1 que as CTM e que não houve diferença entre os grupos Controle e Desnutrido, indica-se que as CE-like tem capacidade de modular a CTH via VCAM-1 e que a DPE não altera esta função.

Já a PECAM1, da mesma forma que VE-caderina e a MCAM, são importantes na manutenção das junções intercelulares endoteliais. Dessa forma, sua expressão pelas CTM e CE-like indica o papel destas células sobre a estabilidade dos vasos medulares e na manutenção do nicho perivascular. Esta observação está de acordo com estudos que demonstraram que os capilares formados por CE-like são mais estáveis que os formados por HUVECs em Matrigel®, de forma que é sugerido que as CTM teriam tanto um papel de CE, quanto de pericito (DA SILVA MEIRELLES et al., 2008; JANECEK PORTALSKA et al., 2012).

Dada a importância das CTM e CE-like no nicho perivascular, procuramos averiguar se as CTM e CE-like obtidas pertencem ao nicho perivascular arteriolar ou sinusoidal para estimar sua possível modulação sobre a hematopoese. A distinção entre os tipos de vasos medulares parece indicar nichos perivasculares distintos que possuem funções opostas: enquanto o nicho arteriolar induz a quiescência das CTH e das demais células do nicho, o nicho sinusoidal modula a migração das CTH (KUNISAKI et al., 2013). É bastante provável que o cambio das CTH entre estes nichos seja uma peça chave no rigoroso controle entre proliferação e quiescência das células hematopoéticas.

Uma subpopulação de CTM localizada exclusivamente na região perivascular e denominada Nes⁺ mostrou-se diretamente associada à população de CTH mais primitiva (CD150⁺ CD48⁻ Sca-1⁺ c-Kit⁺ Lin⁻) (MÉNDEZ-FERRER et al., 2010), sendo que, dentre as CTM Nes⁺, as células NG2⁺ (codificado pelo gene *CSPG4*) LepR⁻ (codificado pelo gene *LEPR*) estão presentes no nicho perivascular arteriolar e as CTM Nes⁺ NG2⁻ LepR⁺ se localizam no nicho sinusoidal (KUNISAKI et al., 2013).

Vimos neste trabalho que as tanto as CTM quanto as CE-like expressam *NES* e *CSPG4*, entretanto somente as CE-like expressam *LEPR*. Assim, se pressupõe que as CE-like teriam um fenótipo mais sinusoidal que arteriolar, mas é necessário quantificar estas proteínas por outras metodologias para confirmar esta suposição. Adicionalmente, verificamos que a DPE não provoca alterações na expressão destes genes, desta forma podemos inferir que a quiescência das CTH nos animais desnutridos não é devido à maior diferenciação das CTM em células do nicho arteriolar.

No intuito de prosseguir a investigação acerca de fatores que poderiam ser responsáveis pela quiescência da CTH na DPE, elegemos Ang-1, CXCL-12 e SCF como marcadores promissores. A Ang-1, codificada pelo gene *ANGPT1*, é constitutivamente expressa em células perivasculares e modula a maturação e estabilidade dos vasos sanguíneos, através do receptor Tie2 presente nas células endoteliais. Na hematopoese, a Ang-1 promove a quiescência das CTH *in vivo*, pela inibição da proliferação celular, de forma que é a principal quimiocina que mantém a CTH no nicho endosteal (ARAI et al., 2004; ARAI e SUDA, 2007; 2008; EMA e SUDA, 2012). Os resultados obtidos neste trabalho, tanto de expressão gênica da Ang-1 quanto de ELISA, sugerem que as CE-like possuem características funcionais similares a células endoteliais. Além disso, indicam que a produção de Ang-1 pelas CTM não é afetada pela DPE, entretanto as CE-like do grupo Desnutrido sintetizaram quantidade significativamente menor de Ang-1. Visto que a expressão de mRNA de *ANGPT1* pelas CE-like não diferiu entre os grupos Controle e Desnutrido, se atribui essa diferença na produção a alterações pós-transcricionais provocadas pela DPE.

A CXCL-12 (ou SDF-1) é a principal quimiocina que promove a mobilização da CTH do nicho endosteal para o nicho perivascular na MO, de forma que quanto menor a quantidade de CXCL-12, maior a mobilização e menos quiescente está a

CTH. Sua interação com seu receptor CXCR-4 regula não somente a movimentação da CTH, mas também a adesão e sobrevivência celulares através de modulação do ciclo celular (NERVI et al., 2006; GREENBAUM et al., 2013). Observou-se menor expressão de *CXCL12* nas CE-like do grupo Desnutrido, bem como menor produção dessa citocina.

O gene *KITL* codifica a citocina SCF (stem cell factor), que é uma molécula que ativa o receptor tirosina quinase c-Kit. Esta ativação é crucial para a hematopoese, visto que media a sobrevivência, migração e proliferação celulares, pois regula diretamente a entrada das células hematopoéticas no ciclo celular (LENNARTSSON e RONNSTRAND, 2012). Nossos resultados mostraram que as CE-like apresentaram maior expressão de *KITL* que as CTM. No que se refere aos grupos Desnutrido, houve maior expressão de *KITL* e maior produção de SCF nas CTM, já nas CE-like não foi observada diferença na expressão gênica entre os grupos C e D, mas houve menor síntese de SCF no grupo Desnutrido. Estes resultados sugerem que possivelmente a produção de SCF pelos animais desnutridos alcançou o patamar máximo e que, apesar do estímulo da diferenciação endotelial, estes animais não conseguem sintetizar quantidades mais elevadas de SCF.

Um dado bastante interessante obtido neste trabalho é a menor expressão de mRNA e da síntese pelas CTM e/ou CE-like nos animais desnutridos dos dois principais fatores moduladores da quiescência da CTH, bem como de alterações na síntese de SCF, o que nos permite inferir que há um esforço para restabelecer a hematopoese na DPE, entretanto o pool de CTH não é recuperado (BORELLI et al., 2009). Assim, pode-se deduzir que a hipoplasia medular observada na DPE não é ocasionada por alterações na síntese de SCF, CXCL-12 ou Ang-1 pelas CTM e/ou CE-like.

Diversas vias de sinalização já foram estabelecidas como essenciais no controle da diferenciação das CTH e CTM. Proteínas da família Wnt, secretadas nos nichos endosteal e vascular, estão associadas a homeostase do tecido ósseo e esta via é uma das mais importantes no controle do balanço entre osteogênese e condrogênese, além de atuar na regulação da auto-renovação de CTH. Estas proteínas são ligantes da via de sinalização celular da β -catenina (dependente e independente). A proteína Wnt3a inibe a expressão de fatores promotores do ciclo

celular, como c-myc e ciclina D1, impedindo a auto renovação e proliferação das CTH, entretanto este mecanismo ainda não está totalmente elucidado. Já a proteína Wnt5a tem ação semelhante à da Wnt3a sobre a CTH, mas sua regulação é exercida pela inibição da via da β -catenina Ca^{2+} -dependente. Assim, estas proteínas atuam de forma a manter a CTH quiescente, em fase G0 do ciclo celular. Além disso, a Wnt5a pode modular a apoptose das CTH (NEMETH e BODINE, 2007; NEMETH et al., 2007; KIKUCHI et al., 2012).

Dados prévios (não publicados) de nosso grupo não demonstraram alteração da expressão de c-myc pelas CTM na DPE, bem como não foi observada alteração na expressão de ciclinas, importantes proteínas no controle do ciclo celular. Nossos resultados demonstraram que não há alteração na expressão gênica de *WNT5A* e não foi detectada expressão do gene *WNT3A*, indicando que a DPE possivelmente não compromete esta via de sinalização nas CTM e CE-like.

Visto que há uma parada na maturação das células progenitoras hematopoéticas na DPE (NAKAJIMA et al., 2014), selecionamos alguns marcadores – *IL11*, *IL3*, *PROM1*, *TGFB1*, *IGF1*, *CSF1*, *CSF2* e *CSF3* – com a finalidade de investigar de possíveis alterações nesses fatores de crescimento que estimulam a proliferação, diferenciação, sobrevivência e função de células hematopoiéticas. A IL-11 é uma citocina que, diretamente, estimula a proliferação de células progenitoras hematopoéticas. Indiretamente, a IL-11 impulsiona a megacariocitopoese, eritropoese, linfopoese e mielopoese, por meio de um efeito sinérgico com outras citocinas e fatores de crescimento, como por exemplo IL-3, IL-4, SCF e eritropoietina (WADHWA e THORPE, 2008). Observamos um aumento da síntese de IL-11 apenas pelas CE-like do grupo Desnutrido, indicando o condicionamento destas em propulsionar e reestabelecer a hematopoese.

O gene *PROM1* codifica a glicoproteína CD133, expressa na superfície de diversos tipos de células tronco, bem como é expresso em células endoteliais e epiteliais (IROLLO e PIROZZI, 2013). Em acordo, observamos maior expressão deste gene nas CE-like, porém não houve diferença estatística quando comparamos os grupos Controle e Desnutrido. Visto que o CD133 é um importante regulador da manutenção, proliferação e destino das CTH (ARNDT et al., 2013), este resultado indica a importante função das CE-like no microambiente perivascular.

A IL-3 é uma interleucina promotora de proliferação e diferenciação das

células progenitoras hematopoéticas, como a CFU-GEMM e BFU-E (OTTMANN et al., 1989). Já o TGF- β 1, que além de ser uma citocina reguladora da proliferação e diferenciação, modula os processos de migração e adesão celulares (NASSIRI et al., 2011). O IGF-1 é um peptídeo multifuncional que regula genericamente o crescimento e a diferenciação celulares, bem como a expressão de proteínas da MEC. O remodelamento ósseo é modulado por este peptídeo, entretanto a literatura é controversa se há um efeito promotor ou inibitório da diferenciação osteogênica (XUE et al., 2013). Neste trabalho, não detectamos expressão do gene *IL3* nas células avaliadas de ambos os grupos. Também não observamos alterações na expressão dos genes *IGF1* e *TGFB1*, bem como na síntese de TGF- β 1, quando comparamos os grupos Controle e Desnutrido.

Os genes *CSF1*, *CSF2* e *CSF3* codificam o M-CSF, GM-CSF e G-CSF, respectivamente, que são fatores de crescimento hematopoéticos que estimulam a proliferação, diferenciação, sobrevivência e função de células mielóides. Visto que há um parada na maturação da CTH na DPE, a finalidade do estudo da expressão desses genes foi a investigação de possíveis alterações nesses fatores de crescimento que estimulam a proliferação, diferenciação, sobrevivência e função de células hematopoiéticas. Entretanto, não foi observada diferença na expressão gênica desses fatores nos grupos analisados, nem na síntese de GM-CSF.

Estes resultados nos permitem inferir que a expressão destes marcadores de proliferação e diferenciação celulares mantém-se bem preservada na CTM e CE-like e, provavelmente, não são responsáveis diretos pelas alterações hematológicas encontradas na DPE.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram os encontrados na literatura, mostrando com clareza que as CTM e as CE-like tem capacidade de modular o estado de quiescência ou proliferação das CTH, bem como de sua movimentação na MO. O *screening* realizado para avaliação dos efeitos da DPE sobre as CTM e CE-like pode direcionar, futuramente, diversos estudos para uma compreensão mais completa acerca do nicho hematopoético e sua respectiva modulação sobre a CTH.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que a DPE não compromete a diferenciação da CTM em CE-like. O *screening* realizado para avaliação dos efeitos da DPE sobre a expressão gênica das CTM e CE-like mostrou que grande parte dos genes avaliados mantém sua expressão preservada. Entretanto, tanto a expressão gênica quanto a síntese dos principais fatores que modulam a quiescência da CTH – SCF, Ang-1 e CXCL-12 – apresentaram-se alterados nos animais desnutridos, de forma que estes encontram-se em um estado “pró-proliferativo”, em um esforço para restabelecer a hematopoese. Porém, como observamos hipoplasia medular nesses animais, podemos inferir que as alterações na síntese de SCF, CXCL-12 ou Ang-1 pelas CTM e/ou CE-like não são diretamente responsáveis pelas alterações hematológicas encontradas na DPE.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACC/SCN. **Nutrition through life**. Administrative Committee on Coordination/Sub-Committee on Nutrition. Geneva. 2000

AL-KHALDI, A.; ELIOPOULOS, N.; MARTINEAU, D.; LEJEUNE, L.; LACHAPELLE, K.; GALIPEAU, J. Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. **Gene Ther**, v. 10, n. 8, p. 621-9, Apr 2003. ISSN 0969-7128 (Print) 0969-7128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12692590> >.

ALVES, A. P.; DAMASO, A. R.; DAL PAI, V. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats. **J Pediatr (Rio J)**, v. 84, n. 3, p. 264-71, May-Jun 2008. ISSN 0021-7557 (Print) 0021-7557 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18392347> >.

ANJOS-AFONSO, F.; BONNET, D. Prospective identification and isolation of murine bone marrow derived multipotent mesenchymal progenitor cells. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 24, n. 1, p. 13-24, Mar 2011. ISSN 1532-1924 (Electronic) 1521-6926 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396589> >.

ARAI, F.; HIRAO, A.; OHMURA, M.; SATO, H.; MATSUOKA, S.; TAKUBO, K.; ITO, K.; KOH, G. Y.; SUDA, T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. **Cell**, v. 118, n. 2, p. 149-61, Jul 23 2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15260986> >.

ARAI, F.; SUDA, T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1106, p. 41-53, Jun 2007. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332071> >.

ARAI, F.; SUDA, T. Quiescent stem cells in the niche. In: (Ed.). **StemBook**. Cambridge (MA), 2008.

ARNDT, K.; GRINENKO, T.; MENDE, N.; REICHERT, D.; PORTZ, M.; RIPICH, T.; CARMELIET, P.; CORBEIL, D.; WASKOW, C. CD133 is a modifier of hematopoietic

progenitor frequencies but is dispensable for the maintenance of mouse hematopoietic stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 14, p. 5582-7, Apr 2 2013. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23509298> >.

AU, P.; TAM, J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. **Blood**, v. 111, n. 9, p. 4551-8, May 1 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18256324> >.

BADDOO, M.; HILL, K.; WILKINSON, R.; GAUPP, D.; HUGHES, C.; KOPEN, G. C.; PHINNEY, D. G. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. **J Cell Biochem**, v. 89, n. 6, p. 1235-49, Aug 15 2003. ISSN 0730-2312 (Print) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12898521> >.

BANNERMAN, R. Hematology. In: SERIES, A. C. O. L. A. M. (Ed.). **The mouse in biomedical research: normative biology, immunology and husbandry**. Ney York: Academic Press, v.3, 1983. p.293-304.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 36, n. 4, p. 568-84, Apr 2004. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15010324> >.

BECK, B.; DOLLET, J. M.; MAX, J. P. Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: effects on food intake and body weight in rats. **Physiol Behav**, v. 45, n. 4, p. 761-5, Apr 1989. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2780844> >.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SAGGIO, I.; RIMINUCCI, M. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. **Hum Gene Ther**, v. 21, n. 9, p. 1057-66, Sep 2010. ISSN 1557-7422 (Electronic) 1043-0342 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20649485> >.

BONAB, M. M.; ALIMOGHADDAM, K.; TALEBIAN, F.; GHAFARI, S. H.; GHAVAMZADEH, A.; NIKBIN, B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. **BMC Cell Biol**, v. 7, p. 14, 2006. ISSN 1471-2121 (Electronic) 1471-2121 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16529651> >.

BORDIGNON, C.; CARLO-STELLA, C.; COLOMBO, M. P.; DE VINCENTIIS, A.; LANATA, L.; LEMOLI, R. M.; LOCATELLI, F.; OLIVIERI, A.; RONDELLI, D.; ZANON, P.; TURA, S. Cell therapy: achievements and perspectives. **Haematologica**, v. 84, n. 12, p. 1110-49, Dec 1999. ISSN 0390-6078 (Print) 0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10586214> >.

BORELLI, P.; BARROS, F. E.; NAKAJIMA, K.; BLATT, S. L.; BEUTLER, B.; PEREIRA, J.; TSUJITA, M.; FAVERO, G. M.; FOCK, R. A. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 6, p. 523-30, Jun 2009. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448901> >

BORELLI, P.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; DE MAURINO, B. B.; TSUJITA, M.; DE SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G.; FOCK, R. A. Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. **Br J Nutr**, v. 97, n. 2, p. 307-14, Feb 2007. ISSN 0007-1145 (Print) 0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17298699> >.

BORELLI, P.; BLATT, S. L.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A. Haematological alterations in protein malnutrition. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 1, p. 49-56, 2004. ISSN 1516-8484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842004000100010> >.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect of myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutr Res**, v. 15, p. 1477-1485, 1995.

BOXALL, S. A.; JONES, E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. **Stem Cells Int**, v. 2012, p. 975871, 2012. ISSN 1687-9678 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666272> >.

BUTLER, J. M.; NOLAN, D. J.; VERTES, E. L.; VARNUM-FINNEY, B.; KOBAYASHI, H.; HOOPER, A. T.; SEANDEL, M.; SHIDO, K.; WHITE, I. A.; KOBAYASHI, M.; WITTE, L.; MAY, C.; SHAWBER, C.; KIMURA, Y.; KITAJEWSKI, J.; ROSENWAKS, Z.; BERNSTEIN, I. D.; RAFII, S. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 3, p. 251-64, Mar 5 2010. ISSN 1875-9777 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207228> >.

CALVI, L. M.; ADAMS, G. B.; WEIBRECHT, K. W.; WEBER, J. M.; OLSON, D. P.;

KNIGHT, M. C.; MARTIN, R. P.; SCHIPANI, E.; DIVIETI, P.; BRINGHURST, F. R.; MILNER, L. A.; KRONENBERG, H. M.; SCADDEN, D. T. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 841-6, Oct 2003. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14574413> >.

CARRION, B.; HUANG, C. P.; GHAJAR, C. M.; KACHGAL, S.; KNIAZEVA, E.; JEON, N. L.; PUTNAM, A. J. Recreating the perivascular niche ex vivo using a microfluidic approach. **Biotechnol Bioeng**, v. 107, n. 6, p. 1020-8, Dec 15 2010. ISSN 1097-0290 (Electronic) 0006-3592 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20672286> >.

CHANDRA, R. K. 1990 McCollum Award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. **Am J Clin Nutr**, v. 53, n. 5, p. 1087-101, May 1991. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902345> >.

COLOMBO, J. P.; CERVANTES, H.; KOKOROVIC, M.; PFISTER, U.; PERRITAZ, R. Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rat. **Ann Nutr Metab**, v. 36, n. 1, p. 23-33, 1992. ISSN 0250-6807 (Print) 0250-6807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1590669> >.

COLTER, D. C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C. M.; PROCKOP, D. J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 7, p. 3213-8, Mar 28 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725391> >.

CORTHESEY-THEULAZ, I.; DEN DUNNEN, J. T.; FERRE, P.; GEURTS, J. M.; MULLER, M.; VAN BELZEN, N.; VAN OMMEN, B. Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. **Ann Nutr Metab**, v. 49, n. 6, p. 355-65, Nov-Dec 2005. ISSN 0250-6807 (Print) 0250-6807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179781> >.

COZZOLINO, S. M. F.; COMINETTI, C. **Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença**. 1. Barueri, SP: Manole, 2013. ISBN 978-85-204-3177-1.

CUNHA, M. C.; LIMA FDA, S.; VINOLO, M. A.; HASTREITER, A.; CURI, R.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. Protein malnutrition induces bone marrow mesenchymal stem cells commitment to adipogenic differentiation leading to hematopoietic failure. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58872, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível

em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516566> >.

CUPPARI, L.; KAMIMURA, M. Avaliação nutricional na doença renal crônica: desafios na prática clínica. **J Bras Nefrol**, v. 31, p. 28-35, 2009.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 9, p. 2287-99, Sep 2008. ISSN 1066-5099.

DE ANGELIS, R. C. **Fisiologia da Nutrição**. 3. Rio de Janeiro: 1986.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Exp Hematol**, v. 28, n. 8, p. 875-84, Aug 2000. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989188> >.

DEJANA, E.; GIAMPIETRO, C. Vascular endothelial-cadherin and vascular stability. **Curr Opin Hematol**, v. 19, n. 3, p. 218-23, May 2012. ISSN 1531-7048 (Electronic) 1065-6251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22395663> >.

DING, L.; SAUNDERS, T. L.; ENIKOLOPOV, G.; MORRISON, S. J. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 457-62, Jan 26 2012. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22281595> >.

DOBSON, K. R.; READING, L.; HABEREY, M.; MARINE, X.; SCUTT, A. Centrifugal isolation of bone marrow from bone: an improved method for the recovery and quantitation of bone marrow osteoprogenitor cells from rat tibiae and femuræ. **Calcif Tissue Int**, v. 65, n. 5, p. 411-3, Nov 1999. ISSN 0171-967X (Print) 0171-967X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10541770> >.

DONOVAN, J.; ABRAHAM, D.; NORMAN, J. Platelet-derived growth factor signaling in mesenchymal cells. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 18, p. 106-19, 2013. ISSN 1093-4715.

DONOVAN, J.; SHIWEN, X.; NORMAN, J.; ABRAHAM, D. Platelet-derived growth factor alpha and beta receptors have overlapping functional activities towards fibroblasts.

Fibrogenesis Tissue Repair, v. 6, n. 1, p. 10, 2013. ISSN 1755-1536.

DOUMAS, B. T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. **Clin Chim Acta**, v. 31, n. 1, p. 87-96, Jan 1971. ISSN 0009-8981 (Print) 0009-8981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5544065> >.

EHNINGER, A.; TRUMPP, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. **J Exp Med**, v. 208, n. 3, p. 421-8, Mar 14 2011. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402747> >.

ELLIS, S. L.; GRASSINGER, J.; JONES, A.; BORG, J.; CAMENISCH, T.; HAYLOCK, D.; BERTONCELLO, I.; NILSSON, S. K. The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature. **Blood**, v. 118, n. 6, p. 1516-24, Aug 11 2011. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21673348> >.

EMA, H.; SUDA, T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. **Blood**, v. 120, n. 11, p. 2174-81, Sep 13 2012. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22786878> >.

FAO. Food and Agriculture Organization. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. Roma 2012.

FAO. Food and Agriculture Organization. Hunger Portal. 2013. Disponível em: < <http://www.fao.org/hunger/en/> >.

FERRARA, N.; GERBER, H. P.; LECOUTER, J. The biology of VEGF and its receptors. **Nat Med**, v. 9, n. 6, p. 669-76, Jun 2003. ISSN 1078-8956 (Print) 1078-8956 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12778165> >.

FERREIRA, H. S.; MOURA, F. A.; CABRAL, C. R., JR.; FLORENCIO, T. M.; VIEIRA, R. C.; DE ASSUNCAO, M. L. Short stature of mothers from an area endemic for undernutrition is associated with obesity, hypertension and stunted children: a population-based study in the semi-arid region of Alagoas, Northeast Brazil. **Br J Nutr**, v. 101, n. 8, p. 1239-45, Apr 2009. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19017417> >.

FERRO-LUZZI, A.; SPADONI, M. A. Protein-energy malnutrition. **Prog Food Nutr Sci**, v. 2, n. 11-12, p. 515-41, 1978. ISSN 0306-0632 (Print) 0306-0632 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/100829> >.

FLORENCIO, T. T.; FERREIRA, H. S.; CAVALCANTE, J. C.; ASSUNCAO, M. L.; SAWAYA, A. L. Short stature and food habits as determining factors for the low productivity of sugarcane labourers in the State of Alagoas, north-eastern Brazil. **Arch Latinoam Nutr**, v. 58, n. 1, p. 33-9, Mar 2008. ISSN 0004-0622 (Print) 0004-0622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18589570> >.

FOCK, R. **Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação dos receptores de LSP (CD14/TLR-4) e do fator de transcrição NFkB**. 2005. 218 (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Área de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FOCK, R. A.; BLATT, S. L.; BEUTLER, B.; PEREIRA, J.; TSUJITA, M.; DE BARROS, F. E.; BORELLI, P. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. **Nutrition**, v. 26, n. 10, p. 1021-8, Oct 2010. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036516> >.

FOCK, R. A.; ROGERO, M. M.; VINOLO, M. A.; CURTI, R.; BORGES, M. C.; BORELLI, P. Effects of protein-energy malnutrition on NF-kappaB signalling in murine peritoneal macrophages. **Inflammation**, v. 33, n. 2, p. 101-9, Apr 2010. ISSN 1573-2576 (Electronic) 0360-3997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876726> >.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A.; BLATT, S. L.; BORELLI, P. Impairment of the hematological response and interleukin-1beta production in protein-energy malnourished mice after endotoxemia with lipopolysaccharide. **Braz J Med Biol Res**, v. 45, n. 12, p. 1163-71, Dec 2012. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983177> >.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A.; CRISMA, A. R.; NAKAJIMA, K.; ROGERO, M. M.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition modifies the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 54, n. 5, p. 371-7, Oct 2008. ISSN 0301-4800 (Print) 0301-4800 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001768> >.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A.; DE MOURA SA ROCHA, V.; DE SA ROCHA, L. C.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. **Cytokine**, v. 40, n. 2, p. 105-14, Nov 2007. ISSN 1096-0023 (Electronic) 1043-4666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950615> >.

FRIED, W.; BARONE, S. J.; ANAGNOSTOU, A. Effect of protein deprivation on hematopoietic stem cells and on peripheral blood counts. **J Lab Clin Med**, v. 92, n. 2, p. 303-10, Aug 1978. ISSN 0022-2143 (Print) 0022-2143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/681816> >.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, v. 4, n. 5, p. 267-74, Sep 1976. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/976387> >.

FU, X.; LI, H. Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions. **Cell Tissue Res**, v. 335, n. 2, p. 317-21, Feb 2009. ISSN 1432-0878 (Electronic) 0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19034523> >.

GERBER, H. P.; FERRARA, N. The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. **J Mol Med (Berl)**, v. 81, n. 1, p. 20-31, Jan 2003. ISSN 0946-2716 (Print) 0946-2716 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12545246> >.

GERBER, H. P.; MALIK, A. K.; SOLAR, G. P.; SHERMAN, D.; LIANG, X. H.; MENG, G.; HONG, K.; MARSTERS, J. C.; FERRARA, N. VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 954-8, Jun 27 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12087404> >.

GORDON, M. Y. Extracellular matrix of the marrow microenvironment. **Br J Haematol**, v. 70, n. 1, p. 1-4, Sep 1988. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3052566> >.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J Biol Chem**, v. 177, n. 2, p. 751-66, Feb 1949. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: <

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18110453> >.

GREENBAUM, A.; HSU, Y. M.; DAY, R. B.; SCHUETTPELZ, L. G.; CHRISTOPHER, M. J.; BORGERDING, J. N.; NAGASAWA, T.; LINK, D. C. CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. **Nature**, v. 495, n. 7440, p. 227-30, Mar 14 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23434756> >.

HIRAYAMA, C.; WATANABE, H.; NAKASHIMA, R.; NANBU, T.; HAMADA, A.; KUNIYASU, A.; NAKAYAMA, H.; KAWAGUCHI, T.; SAITO, H. Constitutive overexpression of P-glycoprotein, rather than breast cancer resistance protein or organic cation transporter 1, contributes to acquisition of imatinib-resistance in K562 cells. **Pharm Res**, v. 25, n. 4, p. 827-35, Apr 2008. ISSN 0724-8741 (Print) 0724-8741 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17934801> >.

HIRSCH, J.; EVANS, D. Beyond the impact of food on genes. **Food Technol**, v. 59, n. 7, p. 24-33, 2005.

HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. **Exp Cell Res**, v. 316, n. 14, p. 2213-9, Aug 15 2010. ISSN 1090-2422 (Electronic) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471978> >.

HOOPER, A. T.; BUTLER, J. M.; NOLAN, D. J.; KRANZ, A.; IIDA, K.; KOBAYASHI, M.; KOPP, H. G.; SHIDO, K.; PETIT, I.; YANGER, K.; JAMES, D.; WITTE, L.; ZHU, Z.; WU, Y.; PYTOWSKI, B.; ROSENWAKS, Z.; MITTAL, V.; SATO, T. N.; RAFII, S. Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 3, p. 263-74, Mar 6 2009. ISSN 1875-9777 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265665> >.

HUANG, Z. L.; FRAKER, P. J. Chronic consumption of a moderately low protein diet does not alter hematopoietic processes in young adult mice. **J Nutr**, v. 133, n. 5, p. 1403-8, May 2003. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12730429> >.

IMNA. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids**. Washington: The National Academies Press. 2005.

IROLLO, E.; PIROZZI, G. CD133: to be or not to be, is this the real question? **Am J Transl Res**, v. 5, n. 6, p. 563-81, 2013. ISSN 1943-8141 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24093054> >.

JANECZEK PORTALSKA, K.; LEFERINK, A.; GROEN, N.; FERNANDES, H.; MORONI, L.; VAN BLITTERSWIJK, C.; DE BOER, J. Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. **PLoS One**, v. 7, n. 10, p. e46842, 2012. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23056481> >.

JUNG, H.; KIM, W. K.; KIM DO, H.; CHO, Y. S.; KIM, S. J.; PARK, S. G.; PARK, B. C.; LIM, H. M.; BAE, K. H.; LEE, S. C. Involvement of PTP-RQ in differentiation during adipogenesis of human mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 383, n. 2, p. 252-7, May 29 2009. ISSN 1090-2104 (Electronic) 0006-291X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19351528> >.

KASSEM, M.; ABDALLAH, B. M. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. **Cell Tissue Res**, v. 331, n. 1, p. 157-63, Jan 2008. ISSN 1432-0878 (Electronic) 0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896115> >.

KEUSCH, G. T. Nutrition and infection. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A., *et al* (Ed.). **Modern nutrition in health and disease**. Philadelphia: Lea&Febiger, v.2, 1994. cap. 1241-1258,

KEUSCH, G. T. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. **J Nutr**, v. 133, n. 1, p. 336S-340S, Jan 2003. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514322> >.

KIEL, M. J.; ACAR, M.; RADICE, G. L.; MORRISON, S. J. Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 2, p. 170-9, Feb 6 2009. ISSN 1875-9777 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19119091> >.

KIEL, M. J.; MORRISON, S. J. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 4, p. 290-301, Apr 2008. ISSN 1474-1741 (Electronic) 1474-1733 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18323850> >.

KIEL, M. J.; RADICE, G. L.; MORRISON, S. J. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 2, p. 204-17, Aug 16 2007. ISSN 1875-9777 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18371351> >.

KIEL, M. J.; YILMAZ, O. H.; IWASHITA, T.; YILMAZ, O. H.; TERHORST, C.; MORRISON, S. J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. **Cell**, v. 121, n. 7, p. 1109-21, Jul 1 2005. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989959> >.

KIKUCHI, A.; YAMAMOTO, H.; SATO, A.; MATSUMOTO, S. Wnt5a: its signalling, functions and implication in diseases. **Acta Physiol (Oxf)**, v. 204, n. 1, p. 17-33, Jan 2012. ISSN 1748-1716 (Electronic) 1748-1708 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21518267> >.

KLEIN, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. **Experientia**, v. 51, n. 9-10, p. 914-26, Sep 29 1995. ISSN 0014-4754 (Print) 0014-4754 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556572> >.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. **Arthritis Res Ther**, v. 9, n. 1, p. 204, 2007. ISSN 1478-6362 (Electronic) 1478-6354 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316462> >.

KUCI, S.; KUCI, Z.; KREYENBERG, H.; DEAK, E.; PUTSCH, K.; HUENECKE, S.; AMARA, C.; KOLLER, S.; RETTINGER, E.; GREZ, M.; KOEHL, U.; LATIFI-PUPOVCI, H.; HENSCHLER, R.; TONN, T.; VON LAER, D.; KLINGEBIEL, T.; BADER, P. CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. **Haematologica**, v. 95, n. 4, p. 651-9, Apr 2010. ISSN 1592-8721 (Electronic) 0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179086> >.

KUNISAKI, Y.; BRUNS, I.; SCHEIERMANN, C.; AHMED, J.; PINHO, S.; ZHANG, D.; MIZOGUCHI, T.; WEI, Q.; LUCAS, D.; ITO, K.; MAR, J. C.; BERGMAN, A.; FRENETTE, P. S. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. **Nature**, v. 502, n. 7473, p. 637-43, Oct 31 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24107994> >.

KURODA, Y.; KITADA, M.; WAKAO, S.; NISHIKAWA, K.; TANIMURA, Y.;

MAKINOSHIMA, H.; GODA, M.; AKASHI, H.; INUTSUKA, A.; NIWA, A.; SHIGEMOTO, T.; NABESHIMA, Y.; NAKAHATA, T.; NABESHIMA, Y.; FUJIYOSHI, Y.; DEZAWA, M. Unique multipotent cells in adult human mesenchymal cell populations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 19, p. 8639-43, May 11 2010. ISSN 1091-6490 (Electronic) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421459> >.

LENNARTSSON, J.; RONNSTRAND, L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. **Physiol Rev**, v. 92, n. 4, p. 1619-49, Oct 2012. ISSN 1522-1210 (Electronic) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23073628> >.

LEVESQUE, J. P.; WINKLER, I. G. Hierarchy of immature hematopoietic cells related to blood flow and niche. **Curr Opin Hematol**, v. 18, n. 4, p. 220-5, Jul 2011. ISSN 1531-7048 (Electronic) 1065-6251 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519242> >.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 605-31, 2005. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212509> >.

LIMA, F. **Modulação da glutamina sobre a via de sinalização do fator nuclear kappa B (NF-kB) em macrófagos peritoniais em um modelo murínico de desnutrição protéica**. 2011. 72 Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciencias Farmacêuticas - Departamento de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LIU, J. W.; DUNOYER-GEINDRE, S.; SERRE-BEINIER, V.; MAI, G.; LAMBERT, J. F.; FISH, R. J.; PERNOD, G.; BUEHLER, L.; BOUNAMEAUX, H.; KRUTHOF, E. K. Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. **J Thromb Haemost**, v. 5, n. 4, p. 826-34, Apr 2007. ISSN 1538-7933 (Print) 1538-7836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17229052> >.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023 (Print) 1046-2023 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609> >.

LOZITO, T. P.; KUO, C. K.; TABOAS, J. M.; TUAN, R. S. Human mesenchymal stem cells express vascular cell phenotypes upon interaction with endothelial cell matrix. **J Cell Biochem**, v. 107, n. 4, p. 714-22, Jul 1 2009. ISSN 1097-4644 (Electronic) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415687> >.

LOZITO, T. P.; TABOAS, J. M.; KUO, C. K.; TUAN, R. S. Mesenchymal stem cell modification of endothelial matrix regulates their vascular differentiation. **J Cell Biochem**, v. 107, n. 4, p. 706-13, Jul 1 2009. ISSN 1097-4644 (Electronic) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415686> >.

LUO, G. P.; NI, B.; YANG, X.; WU, Y. Z. von Willebrand factor: more than a regulator of hemostasis and thrombosis. **Acta Haematol**, v. 128, n. 3, p. 158-69, 2012. ISSN 1421-9662 (Electronic) 0001-5792 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22890291> >.

LYMPERI, S.; HORWOOD, N.; MARLEY, S.; GORDON, M. Y.; COPE, A. P.; DAZZI, F. Strontium can increase some osteoblasts without increasing hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1173-81, Feb 1 2008. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17971481> >.

LYRA, J. S.; MADI, K.; MAEDA, C. T.; SAVINO, W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. **J Pathol**, v. 171, n. 3, p. 231-6, Nov 1993. ISSN 0022-3417 (Print) 0022-3417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8277371> >.

MALAFAIA, G.; MARTINS, R.; SILVA, M. Avaliação dos efeitos, em curto prazo, da deficiência protéica nos parâmetros físicos e bioquímicos de camundongos Swiss. **Rev Saúde e Biol**, v. 4, n. 2, p. 21-33, 2009. ISSN 1980-0002.

MAYANI, H.; GUILBERT, L. J.; JANOWSKA-WIECZOREK, A. Biology of the hemopoietic microenvironment. **Eur J Haematol**, v. 49, n. 5, p. 225-33, Nov 1992. ISSN 0902-4441 (Print) 0902-4441 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1473584> >.

MENDEZ-FERRER, S.; MICHURINA, T. V.; FERRARO, F.; MAZLOOM, A. R.; MACARTHUR, B. D.; LIRA, S. A.; SCADDEN, D. T.; MA'AYAN, A.; ENIKOLOPOV, G. N.; FRENETTE, P. S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 829-34, Aug 12 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703299> >.

MÉNDEZ-FERRER, S.; MICHURINA, T. V.; FERRARO, F.; MAZLOOM, A. R.; MACARTHUR, B. D.; LIRA, S. A.; SCADDEN, D. T.; MA'AYAN, A.; ENIKOLOPOV, G. N.; FRENETTE, P. S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 829-34, Aug 2010. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703299> >.

MERCER, L. P.; KELLEY, D. S.; HUMPHRIES, L. L.; DUNN, J. D. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. **J Nutr**, v. 124, n. 7, p. 1029-36, Jul 1994. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913125> >.

METCALF, D. The 1993 Burnet Lecture. The colony stimulating factors--discovery to clinical use. **Australas Biotechnol**, v. 4, n. 6, p. 337-40, Nov-Dec 1994. ISSN 1036-7128 (Print) 1036-7128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765828> >.

MITSIADIS, T. A.; BARRANDON, O.; ROCHAT, A.; BARRANDON, Y.; DE BARI, C. Stem cell niches in mammals. **Exp Cell Res**, v. 313, n. 16, p. 3377-85, Oct 1 2007. ISSN 0014-4827 (Print) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17764674> >.

MONTE, C. [Malnutrition: a secular challenge to child nutrition]. **J Pediatr (Rio J)**, v. 76 Suppl 3, p. S285-97, Nov 2000. ISSN 1678-4782 (Electronic) 0021-7557 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676906> >.

MONTEIRO, C. A.; BENICIO, M. H.; KONNO, S. C.; SILVA, A. C.; LIMA, A. L.; CONDE, W. L. Causes for the decline in child under-nutrition in Brazil, 1996-2007. **Rev Saude Publica**, v. 43, n. 1, p. 35-43, Feb 2009. ISSN 1518-8787 (Electronic) 0034-8910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169574> >.

MORIKAWA, S.; MABUCHI, Y.; KUBOTA, Y.; NAGAI, Y.; NIIBE, K.; HIRATSU, E.; SUZUKI, S.; MIYAUCHI-HARA, C.; NAGOSHI, N.; SUNABORI, T.; SHIMMURA, S.; MIYAWAKI, A.; NAKAGAWA, T.; SUDA, T.; OKANO, H.; MATSUZAKI, Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. **J Exp Med**, v. 206, n. 11, p. 2483-96, Oct 26 2009. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841085> >.

MOSNA, F.; SENSEBE, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. **Stem Cells Dev**, v. 19, n. 10, p. 1449-70, Oct 2010. ISSN 1557-8534 (Electronic) 1547-3287 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20486777> >.

NAKAJIMA, K. **Avaliação do ciclo celular de células-tronco/progenitoras hemopoéticas de medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica**. 2010. 170 (Tese de Doutorado). Departamento de Análises Clínicas e

Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NAKAJIMA, K.; CRISMA, A. R.; SILVA, G. B.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. **Nutrition**, v. 30, n. 1, p. 82-9, Jan 2014. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24290603> >.

NARDINELLI, L.; BORELLI, P. Protein-calorie malnutrition: decrease in the macrophage's respiratory burst capacity. **Rev Bras Cienc Farm**, v. 37, p. 51-60, 2001.

NASSIRI, F.; CUSIMANO, M. D.; SCHEITHAUER, B. W.; ROTONDO, F.; FAZIO, A.; YOUSEF, G. M.; SYRO, L. V.; KOVACS, K.; LLOYD, R. V. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. **Anticancer Res**, v. 31, n. 6, p. 2283-90, Jun 2011. ISSN 1791-7530 (Electronic) 0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737653> >.

NEMETH, M. J.; BODINE, D. M. Regulation of hematopoiesis and the hematopoietic stem cell niche by Wnt signaling pathways. **Cell Res**, v. 17, n. 9, p. 746-58, Sep 2007. ISSN 1748-7838 (Electronic) 1001-0602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17768401> >.

NEMETH, M. J.; TOPOL, L.; ANDERSON, S. M.; YANG, Y.; BODINE, D. M. Wnt5a inhibits canonical Wnt signaling in hematopoietic stem cells and enhances repopulation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 104, n. 39, p. 15436-41, Sep 25 2007. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881570> >.

NERVI, B.; LINK, D. C.; DIPERSIO, J. F. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 3, p. 690-705, Oct 15 2006. ISSN 0730-2312 (Print) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16888804> >.

NOMBELA-ARRIETA, C.; PIVARNIK, G.; WINKEL, B.; CANTY, K. J.; HARLEY, B.; MAHONEY, J. E.; PARK, S. Y.; LU, J.; PROTOPOPOV, A.; SILBERSTEIN, L. E. Quantitative imaging of haematopoietic stem and progenitor cell localization and hypoxic status in the bone marrow microenvironment. **Nat Cell Biol**, v. 15, n. 5, p. 533-43, May 2013. ISSN 1476-4679 (Electronic) 1465-7392 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624405> >.

OHNEDA, O.; BAUTCH, V. L. Murine endothelial cells support fetal liver erythropoiesis and myelopoiesis via distinct interactions. **Br J Haematol**, v. 98, n. 4, p. 798-808, Sep 1997. ISSN 0007-1048 (Print) 0007-1048 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326171> >.

OLIVEIRA, L. F. **Avaliação de células-tronco mesenquimais de medula óssea em ratos normotensos Wistar-Kyoto (WKY) e espontaneamente hipertensos (SHR)**. 2010. 65 Dissertação Patologia Clínica, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba.

OREFFO, R. O.; LASHBROOKE, B.; ROACH, H. I.; CLARKE, N. M.; COOPER, C. Maternal protein deficiency affects mesenchymal stem cell activity in the developing offspring. **Bone**, v. 33, n. 1, p. 100-7, Jul 2003. ISSN 8756-3282 (Print) 1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12919704> >.

OSWALD, J.; BOXBERGER, S.; JORGENSEN, B.; FELDMANN, S.; EHNINGER, G.; BORNHAUSER, M.; WERNER, C. Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. **Stem Cells**, v. 22, n. 3, p. 377-84, 2004. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15153614> >.

OTTMANN, O. G.; ABOUD, M.; WELTE, K.; SOUZA, L. M.; PELUS, L. M. Stimulation of human hematopoietic progenitor cell proliferation and differentiation by recombinant human interleukin 3. Comparison and interactions with recombinant human granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. **Exp Hematol**, v. 17, n. 2, p. 191-7, Feb 1989. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2463933> >.

PAUL, S. R.; BENNETT, F.; CALVETTI, J. A.; KELLEHER, K.; WOOD, C. R.; O'HARA, R. M., JR.; LEARY, A. C.; SIBLEY, B.; CLARK, S. C.; WILLIAMS, D. A.; ET AL. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 19, p. 7512-6, Oct 1990. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2145578> >.

PEDRUZZI, M. B.; TEIXEIRA, G. A. Tratado de alimentação, nutrição e dietoterapia. In: DA SILVA, S. M. C. S. e MURA, J. D. P. (Ed.). São Paulo: Roca, 2007. p.507.

PEISTER, A.; MELLAD, J. A.; LARSON, B. L.; HALL, B. M.; GIBSON, L. F.; PROCKOP, D. J. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred

mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1662-8, Mar 1 2004. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14592819> >.

PHINNEY, D. G. Biochemical heterogeneity of mesenchymal stem cell populations: clues to their therapeutic efficacy. **Cell Cycle**, v. 6, n. 23, p. 2884-9, Dec 2007. ISSN 1551-4005. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18000405> >.

PIRATELLI, C. M.; TELAROLLI JUNIOR, R. Nutritional evaluation of stage 5 chronic kidney disease patients on dialysis. **Sao Paulo Med J**, v. 130, n. 6, p. 392-7, 2012. ISSN 1806-9460 (Electronic) 1516-3180 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23338736> >.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v. 21, n. 6, p. 775-7, Jun 2005. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925305> >.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **J Nutr**, v. 127, n. 5 Suppl, p. 838S-841S, May 1997. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164249> >.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.

RENTSTROM, J.; KROGER, M.; PESCHEL, C.; OOSTENDORP, R. A. How the niche regulates hematopoietic stem cells. **Chem Biol Interact**, v. 184, n. 1-2, p. 7-15, Mar 19 2010. ISSN 1872-7786 (Electronic) 0009-2797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944675> >.

REYES, M.; DUDEK, A.; JAHAGIRDAR, B.; KOODIE, L.; MARKER, P. H.; VERFAILLIE, C. M. Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. **J Clin Invest**, v. 109, n. 3, p. 337-46, Feb 2002. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827993> >.

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, n. 3, p. 434-43, Dec 1990. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1703166> >.

ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 4. Rio de Janeiro: 2003.

RODKEY, F. L. Direct Spectrophotometric Determination of Albumin in Human Serum. **Clin Chem**, v. 11, p. 478-87, Apr 1965. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14277286> >.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem Inst Butantan**, v. 20, p. 315-328, 1947.

RUSCETTI, F. W.; AKEL, S.; BARTELMEZ, S. H. Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. **Oncogene**, v. 24, n. 37, p. 5751-63, Aug 29 2005. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123808> >.

SAMBROOK, J. R., D.W. . **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SATO, K.; OZAKI, K.; MORI, M.; MUROI, K.; OZAWA, K. Mesenchymal stromal cells for graft-versus-host disease : basic aspects and clinical outcomes. **J Clin Exp Hematop**, v. 50, n. 2, p. 79-89, 2010. ISSN 1880-9952 (Electronic) 1346-4280 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123965> >.

SAUNDERS, J.; SMITH, T. Malnutrition: causes and consequences. **Clin Med**, v. 10, n. 6, p. 624-7, Dec 2010. ISSN 1470-2118 (Print) 1470-2118 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413492> >.

SAWAYA, A. L. Desnutrição: consequências a longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. **Estudos Avançados**, v. 58, p. 147-158, 2006.

SCHOFIELD, C.; ASHWORTH, A. Why have mortality rates for severe malnutrition

remained so high? **Bull World Health Organ**, v. 74, n. 2, p. 223-9, 1996. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706239> >.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells**, v. 4, n. 1-2, p. 7-25, 1978. ISSN 0340-4684 (Print) 0340-4684 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/747780> >.

SCHWANHAUSSER, B.; BUSSE, D.; LI, N.; DITTMAR, G.; SCHUCHHARDT, J.; WOLF, J.; CHEN, W.; SELBACH, M. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 337-42, May 19 2011. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593866> >.

SHAROVA, L. V.; SHAROV, A. A.; NEDOREZOV, T.; PIAO, Y.; SHAIK, N.; KO, M. S. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. **DNA Res**, v. 16, n. 1, p. 45-58, Feb 2009. ISSN 1756-1663 (Electronic) 1340-2838 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001483> >.

SHETTY, P. Malnutrition and Undernutrition. **Medicine**, v. 31, n. 4, p. 18-22, 4/1/ 2003. ISSN 1357-3039. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357303906004786> >.

SHI, C. Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells. **Immunology**, v. 136, n. 2, p. 133-8, Jun 2012. ISSN 1365-2567 (Electronic) 0019-2805 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22321024> >.

SHORT, B.; BROUARD, N.; DRIESSEN, R.; SIMMONS, P. J. Prospective isolation of stromal progenitor cells from mouse BM. **Cytotherapy**, v. 3, n. 5, p. 407-8, 2001. ISSN 1465-3249 (Print) 1465-3249 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11953023> >.

STIER, S.; KO, Y.; FORKERT, R.; LUTZ, C.; NEUHAUS, T.; GRUNEWALD, E.; CHENG, T.; DOMBKOWSKI, D.; CALVI, L. M.; RITTLING, S. R.; SCADDEN, D. T. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. **J Exp Med**, v. 201, n. 11, p. 1781-91, Jun 6 2005. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15928197> >.

STINNETT, J. D. **Nutrition and the immune response**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1983.

SUGIYAMA, T.; KOHARA, H.; NODA, M.; NAGASAWA, T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. **Immunity**, v. 25, n. 6, p. 977-88, Dec 2006. ISSN 1074-7613 (Print) 1074-7613 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174120> >.

TAICHMAN, R. S.; EMERSON, S. G. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. **J Exp Med**, v. 179, n. 5, p. 1677-82, May 1 1994. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513014> >.

TAVIAN, M.; PEAULT, B. The changing cellular environments of hematopoiesis in human development in utero. **Exp Hematol**, v. 33, n. 9, p. 1062-9, Sep 2005. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140155> >.

TESTA, N. G.; DEXTER, T. M. Haemopoietic growth factors and haematological malignancies. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**, v. 4, n. 1, p. 177-89, Mar 1990. ISSN 0950-351X (Print) 0950-351X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2202288> >.

TRENTIN, J. J. Hemopoietic microenvironments. **Transplant Proc**, v. 10, n. 1, p. 77-82, Mar 1978. ISSN 0041-1345 (Print) 0041-1345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/635989> >.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, Jun 18 2002. ISSN 1465-6914 (Electronic) 1465-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808> >.

VAVRUK, A. M.; MARTINS, C.; NASCIMENTO, M. M.; HAYASHI, S. Y.; RIELLA, M. C. [Association between hypokalemia, malnutrition and mortality in peritoneal dialysis patients]. **J Bras Nefrol**, v. 34, n. 4, p. 349-54, Oct-Dec 2012. ISSN 2175-8239 (Electronic) 0101-2800 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318823> >.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 8, p. 889-95, Aug 2000. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10920430> >.

WADHWA, M.; THORPE, R. Haematopoietic growth factors and their therapeutic use. **Thromb Haemost**, v. 99, n. 5, p. 863-73, May 2008. ISSN 0340-6245 (Print) 0340-6245 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18449415> >.

WAITZBERG, D. L. **Nutrição enteral e parenteral na prática clínica**. 3. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

WANG, L.; ZHOU, X.; ZHOU, T.; MA, D.; CHEN, S.; ZHI, X.; YIN, L.; SHAO, Z.; OU, Z.; ZHOU, P. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 134, n. 3, p. 365-72, Mar 2008. ISSN 1432-1335 (Electronic) 0171-5216 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671792> >.

WANG, Z.; YAN, X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. **Cancer Lett**, v. 330, n. 2, p. 150-62, Apr 28 2013. ISSN 1872-7980 (Electronic) 0304-3835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23266426> >.

WATABE, T.; MIYAZONO, K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. **Cell Res**, v. 19, n. 1, p. 103-15, Jan 2009. ISSN 1748-7838 (Electronic) 1001-0602 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19114993> >.

WHIPPLE, G. H.; MILLER, L. L.; ROBSCHUIT-ROBBINS, F. S. Raiding of Body Tissue Protein to Form Plasma Protein and Hemoglobin : What Is Premortal Rise of Urinary Nitrogen? **J Exp Med**, v. 85, n. 3, p. 277-86, Feb 28 1947. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19871614> >.

WHITE, B.; DEAN, R.; MARTIN, R. An association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in basomedial hypothalamus and increased food intake. **Nutritional Neuroscience**, v. 1, p. 173-182, 1998.

WHO. Global burden of protein-energy malnutrition in the year 2000. 2011. Disponível em: < http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_malnutrition.pdf >. Acesso em:

06/05/14.

WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nat Rev Immunol**, v. 6, n. 2, p. 93-106, Feb 2006. ISSN 1474-1733. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16491134> >.

WINKLER, I. G.; BARBIER, V.; WADLEY, R.; ZANNETTINO, A. C.; WILLIAMS, S.; LEVESQUE, J. P. Positioning of bone marrow hematopoietic and stromal cells relative to blood flow in vivo: serially reconstituting hematopoietic stem cells reside in distinct nonperfused niches. **Blood**, v. 116, n. 3, p. 375-85, Jul 22 2010. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20393133> >.

WOLF, M. R.; BARROS FILHO, A. A. [Nutritional status of beneficiaries of the Bolsa Familia Program in Brazil - a systematic review]. **Cien Saude Colet**, v. 19, n. 5, p. 1331-8, May 2014. ISSN 1678-4561 (Electronic) 1413-8123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24897198> >.

WORLD BANK. **Repositioning nutrition as central to development. A strategy for large-scale action**. World Bank. Washington, DC. 2006

XAVIER, J. G.; FAVERO, M. E.; VINOLO, M. A.; ROGERO, M. M.; DAGLI, M. L.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; BOROJEVIC, R.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. **Histol Histopathol**, v. 22, n. 6, p. 651-60, Jun 2007. ISSN 1699-5848 (Electronic) 0213-3911 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17357095> >.

XU, F. F.; ZHU, H.; LI, X. M.; YANG, F.; CHEN, J. D.; TANG, B.; SUN, H. G.; CHU, Y. N.; ZHENG, R. X.; LIU, Y. L.; WANG, L. S.; ZHANG, Y. Intercellular Adhesion Molecule-1 Inhibits Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Impairs Bio-Scaffold-Mediated Bone Regeneration In Vivo. **Tissue Eng Part A**, Jun 5 2014. ISSN 1937-3341.

XU, J.; LIU, X.; CHEN, J.; ZACHAREK, A.; CUI, X.; SAVANT-BHONSALE, S.; CHOPP, M.; LIU, Z. Cell-cell interaction promotes rat marrow stromal cell differentiation into endothelial cell via activation of TACE/TNF-alpha signaling. **Cell Transplant**, v. 19, n. 1, p. 43-53, 2010. ISSN 1555-3892 (Electronic) 0963-6897 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19796498> >.

XUE, Y.; XING, Z.; BOLSTAD, A. I.; VAN DYKE, T. E.; MUSTAFA, K. Co-culture of human bone marrow stromal cells with endothelial cells alters gene expression profiles. **Int J Artif Organs**, v. 36, n. 9, p. 650-62, Oct 3 2013. ISSN 0391-3988.

ZHANG, J.; NIU, C.; YE, L.; HUANG, H.; HE, X.; TONG, W. G.; ROSS, J.; HAUG, J.; JOHNSON, T.; FENG, J. Q.; HARRIS, S.; WIEDEMANN, L. M.; MISHINA, Y.; LI, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 836-41, Oct 23 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14574412> >.

ANEXOS

ANEXO I

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Secretaria de Pós-Graduação

**Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de
Mestrado/Doutorado**

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

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

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

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

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

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

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

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

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

ANEXO II

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/130/2012

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo Certifica que o Projeto **"Influência da desnutrição protéica-energética sobre aspectos regulatórios do microambiente perivascular medular"** (Protocolo CEUA/FCF/344), de responsabilidade da pesquisadora **Araceli Aparecida Hastreiter**, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fockestá de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 03 de dezembro de 2012.

São Paulo, 04 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/FCF/USP

ANEXO III

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

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

9136 - 7913950/1 - Araceli Aparecida Hastreiter

Email:	araceliastreiter@usp.br
Data de Nascimento:	05/11/1980
Cédula de Identidade:	RG - 3.633.127 - SC
Local de Nascimento:	Estado de Santa Catarina
Nacionalidade:	Brasileira
Graduação:	Farmacêutico - Universidade Federal de Santa Catarina - Santa Catarina - Brasil - 2003

Curso:	Mestrado
Programa:	Farmácia (Análises Clínicas)
Área:	Análises Clínicas
Data de Matrícula:	02/02/2012
Início da Contagem de Prazo:	02/02/2012
Data Limite para o Depósito:	04/08/2014
Orientador:	Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 02/02/2012 até o presente. E.Mail: hemato@usp.br
Proficiência em Línguas:	Inglês, Aprovado em 02/02/2012
Data de Aprovação no Exame de Qualificação:	Aprovado em 27/03/2013
Data do Depósito do Trabalho:	30/07/2014
Título do Trabalho:	"Avaliação de aspectos regulatórios da hematopoese em desnutrição proteico-energética experimental: papel das células endoteliais derivadas das células tronco mesenquimais medulares"
Data Máxima para Aprovação da Banca:	29/09/2014
Data de Aprovação da Banca:	
Data Máxima para Defesa:	
Data da Defesa:	
Resultado da Defesa:	
Histórico de Ocorrências:	Ingressou no Mestrado em 02/02/2012 Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2014

Impresso em: 30/07/14 23:27:59

ANEXO III (continuação)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9136 - 7913950/1 - Araceli Aparecida Hastreiter

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
HEP5800-3/3	Bioestatística (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	01/03/2012	10/05/2012	90	6	82	A	N	Concluída
FBC5793-10/2	Tópicos em Análises Clínicas I	06/03/2012	26/06/2012	30	2	80	A	N	Concluída
BMH5767-2/1	Conceitos, Métodos e Diagnósticos em Biologia Tecidual (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	09/03/2012	29/06/2012	90	0	0	-	N	Matrícula cancelada
MIP5737-1/5	Fundamentos da Citometria de Fluxo - Aplicações na Investigação da Relação Hospedeiro-Parasita (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	21/05/2012	27/05/2012	30	2	100	B	N	Concluída
NHA5705-2/4	Fundamentos da Biologia Molecular Aplicados à Nutrição Humana (Curso Interunidades: Nutrição Humana Aplicada - Universidade de São Paulo)	28/05/2012	01/07/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBA5897-1/2	Nutrigenômica do Câncer	13/08/2012	19/08/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5757-4/1	Tópicos em Análises Clínicas II	14/08/2012	26/11/2012	15	1	85	A	N	Concluída
QBQ5747-6/4	Animais de Laboratório (Instituto de Química - Universidade de São Paulo)	17/09/2012	23/09/2012	15	1	100	A	N	Concluída
MPT5794-1/1	Ultra-Estrutura e Função Celular (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	18/10/2012	19/11/2012	75	5	90	A	N	Concluída
FBC5705-4/2	Tópicos em Microscopia Quantitativa	03/12/2012	09/12/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5755-1/3	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese (1)	01/04/2013	05/05/2013	60	4	90	A	S	Concluída
BIO5749-2/2	Biologia Molecular da Célula-Tronco (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo) (1)	03/04/2013	11/06/2013	60	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5780-2/1	Análise de Dados Aplicados às Pesquisas Biológicas (1)	20/05/2013	30/06/2013	90	6	90	A	S	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	35
Estágios:			
Total:	0	25	35

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

1) Disciplina(s) cursada(s) voluntariamente pelo(a) candidato(a) após ter cumprido as exigências regulamentares.

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2014

Impresso em: 30/07/14 23:27:59