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

Influência da desnutrição protéica sobre a expressão de fatores de
transcrição envolvidos no processo de diferenciação da Célula Tronco
Mesenquimal medular

Mayara Caldas Ramos Cunha

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:

Profº. Drº. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2012

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

Cunha, Mayara Caldas Ramos
C972i Influência da desnutrição protéica sobre a expressão de
fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação da
célula tronco mesenquimal medular / Mayara Caldas Ramos
Cunha. -- São Paulo, 2012.
88p.

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

Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio

1. Desnutrição protéica : Medicina I. T. II. Fock, Ricardo
Ambrósio, orientador.

615.9 CDD

Mayara Caldas Ramos Cunha

Influência da desnutrição protéica sobre a expressão de fatores de
transcrição envolvidos no processo de diferenciação da Célula Tronco
Mesenquimal medular

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, _____ de _____.

Dedico esse trabalho:

*Ao meu amor, Filipe, que me apoiou e me incentivou a essa conquista
mesmo nos momentos mais difíceis.*

*Ao meu pai e a minha Avó Lorena, mesmo distante, transmite carinho
e orgulho pelas minhas escolhas e vitórias.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, especialmente a minha tia Lúcia Andréia Zeni, como meu exemplo de vida.

Ao meu orientador, Ricardo Ambrósio Fock, pela total contribuição e orientação na realização deste trabalho.

A minha mãe, Vera, e meus avós que estão ao lado de DEUS me abençoando em cada batalha na minha vida.

Aos pais do Filipe por estarem sempre comigo e acreditarem em mim, nos meus esforços e na minha profissão.

Aos amigos do laboratório de Hematologia Clínica, em especial a Fabiana Lima, Graziela Batista da Silva, Luciana Simão Carmo e Alexandra Siqueira Melo por compartilharem comigo este aprendizado tão importante.

Ao Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário USP, com carinho a Valéria Pereira Salgado e Elenice Vicente Rodrigues, pela compressão e ajuda para a realização desse trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Primavera Borelli, pelo exemplo de dedicação ao ensino e a pesquisa.

Aos técnicos de laboratório pelo auxílio prestado.

Aos estagiários de iniciação científica, Gabriela e Mayara Cortez, pelo trabalho em equipe.

Ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, e a todo o pessoal da secretaria da pós-graduação, pelo trabalho realizado.

SUMÁRIO

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE GRÁFICOS.....	XII
LISTA DE TABELAS.....	XIV
LISTA DE SIGLAS.....	XV
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2. OBJETIVOS	19
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1. DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E PROTÉICO – ENERGÉTICA	20
3.2. HEMATOPOESE – DESNUTRIÇÃO E ESTROMA MEDULAR.....	23
3.3. CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E FORMAÇÃO DO ESTROMA MEDULAR	24
3.4. CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E FATORES DE TRANSCRIÇÃO	26
3.4.1. <i>C/EBPs</i>	27
3.4.2. <i>PPARγ</i>	28
3.4.3. <i>RUNX2</i>	29
3.4.4. <i>Osterix (OSX)</i>	30
3.4.5. <i>Sox 9</i>	30
3.4.6. <i>NFκB</i>	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1. ANIMAIS	32
4.2. INDUÇÃO DA DESNUTRIÇÃO	32
4.3. RAÇÕES	33
4.4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS	34
4.5. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA SÉRICA E PRÉ-ALBUMINA	35
4.6. HEMOGRAMA	35
4.7. COLETA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E MIELOGRAMA	35
4.8. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA	36
4.9. CULTURA DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL	36
4.10. CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTMs.....	37

4.11.	CONTAGEM DE CFUs.....	37
4.12.	CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO EM ADIPÓCITOS, CONDRÓCITOS E OSTEÓBLASTOS	38
4.13.	QUANTIFICAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM CTMs POR WESTERN BLOT	38
4.14.	DOSAGEM DE CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO	40
4.15.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
5.	RESULTADOS.....	41
5.1.	AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DAS RAÇÕES.....	41
5.2.	INDUÇÃO DA DESNUTRIÇÃO	41
5.3.	AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA SÉRICA E PRÉ ALBUMINA.....	42
5.4.	HEMOGRAMA	42
5.4.1.	<i>Leucograma</i>	42
5.4.2.	<i>Eritrograma</i>	44
5.4.3.	<i>Plaquetas</i>	45
5.5.	CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E MIELOGRAMA.....	45
5.6.	AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA	46
5.7.	DIFERENCIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTMs.....	49
5.8.	CONTAGEM DE CFUs	51
5.9.	QUANTIFICAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM CTMs	54
5.9.1.	<i>Avaliação da expressão de fatores de transcrição CEBPα, PPARγ</i>	54
5.9.2.	<i>Avaliação da expressão de fatores de transcrição Osterix, RUNX2 e Sox9</i>	55
5.9.3.	<i>Avaliação da expressão de fatores de transcrição NFκB total e fosforilado</i>	57
5.10.	DOSAGEM DE CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO NAS CULTURAS DE CTMs	57
5.10.1.	<i>Quantificação de SCF e IL-3 nas culturas de CTMs</i>	58
5.10.2.	<i>Quantificação de GM-CSF e G-CSF nas culturas de CTMs</i>	59
5.10.3.	<i>Quantificação de TNF-α, IL-1α e IL-6 nas culturas de CTMs</i>	60
5.10.4.	<i>Quantificação de TGF-β nas culturas de CTMs</i>	62
6.	DISCUSSÃO.....	63
7.	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXOS	88

RESUMO

CUNHA, Mayara Caldas Ramos. **Influência da desnutrição protéica sobre a expressão de fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação da Célula Tronco Mesenquimal medular. 2012.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Dados da literatura e do nosso grupo evidenciam que a desnutrição protéica compromete órgãos linfo-hematopoéticos e modifica a resposta imune. Sabendo que animais desnutridos apresentam hipoplasia severa de órgãos hematopoéticos e que o microambiente medular apresenta distintos moduladores que atuam sinergicamente para influenciar a sobrevivência, proliferação e o desenvolvimento das células hematopoéticas em todos os seus níveis de diferenciação, avaliamos em um modelo de desnutrição, alguns aspectos da complexa regulação do microambiente medular avaliando a expressão de fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação da Célula Tronco Mesenquimal (CTM) e capacidade de produção de citocinas importantes para o controle da hematopoese. Camundongos Balb/C machos, adultos, adaptados em gaioleiros metabólicos foram separados nos grupos controles e desnutridos recebendo, respectivamente, ração normoprotéica (12% de proteínas) e hipoprotéicas (2% de proteínas). Após o grupo desnutrido perder cerca de 20% do peso inicial, os animais foram sacrificados para a avaliação nutricional e hematológica caracterizando a desnutrição. As células mesenquimais foram isoladas da medula óssea (MO) e caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo mostrando populações de células em ambos os grupos com marcação positiva para CD90, CD271, Sca1, CD49e, CD13, baixa marcação para CD34 e negativa para CD14, CD45. Na quantificação de fatores de transcrição por Western Blot verificou-se que células mesenquimais medulares de animais desnutridos apresentaram maior expressão de PPAR γ e RUNX2, fato este que pode ser explicado, em parte, pelo remodelamento microambiental observado nesses animais. Sobrenadantes de células mesenquimais de animais desnutridos quantificados por Elisa apresentaram uma maior concentração de SCF e uma redução na concentração de G-CSF e GM-CSF. As alterações encontradas nos permitem concluir que a desnutrição compromete as células mesenquimais tanto no aspecto regulatório de fatores de transcrição, bem como na capacidade de produção de citocinas, contribuindo para o comprometimento do microambiente hematopoético e induzindo a falência medular comumente observada em situações de desnutrição protéica.

Palavras-chave: desnutrição protéica, Célula Tronco Mesenquimal, fatores de transcrição, citocinas.

ABSTRACT

CUNHA, Mayara Caldas Ramos. **Influence of protein malnutrition on the expression of transcription factors involved in differentiation of bone marrow Mesenchymal Stem Cell. 2012.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Data from literature and our group showed that protein malnutrition compromises lympho-hematopoietic organs and modifies the immune response. Knowing that malnourished animals show severe hypoplasia of hematopoietic organs and the bone marrow microenvironment has distinct modulators that act synergistically to influence survival, proliferation and development of hematopoietic cells in all levels of differentiation, we evaluated in a model of protein malnutrition, some aspects of the complex regulation of bone marrow microenvironment evaluating the expression of transcription factors involved in the differentiation of Mesenchymal Stem Cells, and the production capacity of cytokines which are important in the regulation of the hematopoiesis. BALB/c mice, males, adults adapted in metabolic cages were separated in two groups: control and malnourished groups receiving, respectively, normal protein diet (12% protein) and low protein (2% protein). After the malnourished group lost about 20% of initial weight, the animals were sacrificed and evaluated the nutrition status, as well as hematological parameters. Mesenchymal Stem Cells were isolated from bone marrow and immunophenotypically characterized by flow cytometry showing cells populations in both groups stained positive for CD90, CD271, Sca1, CD49e, CD13, low marking for CD34 and negative for CD14, CD45. In the measurement of transcription factors by Western Blot found that Mesenchymal Cells of bone marrow malnourished animals showed higher expression of RUNX2 and PPAR γ . This fact can be explained, in part, by microenvironmental remodeling observed in these animals. Mesenchymal stem cells supernatants of malnourished mice quantified by Elisa presented a higher concentration of SCF and a reduced concentration of G-CSF and GM-CSF. The alterations found in malnourished animals allow us to conclude that malnutrition commits Mesenchymal Stem Cells on the expression of transcription factors involved in the regulatory aspects of the differentiation process, as well as at the capacity of cytokine production, contributing to an impaired hematopoietic microenvironment and inducing the bone marrow failure commonly observed in protein malnutrition states.

Keywords: protein malnutrition, Mesenchymal Stem Cell, transcription factors, cytokines.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR DA CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL POR FATORES DE TRANSCRIÇÃO..	26
FIGURA 2. FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS DOS GRUPOS.	47
FIGURA 3. FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS DOS GRUPOS DESNUTRIDOS	47
FIGURA 4. FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES.....	48
FIGURA 5. FOTOMICROGRAFIA DE CORTE HISTOLÓGICO DE MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS DOS GRUPOS DESNUTRIDOS.....	48
FIGURA 6. FOTOMICROGRAFIA DAS CULTURAS DE CTM..	52
FIGURA 7. FOTOMICROGRAFIA DA CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CTMS.	52

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO (A) DO CONSUMO DE RAÇÃO POR DIA, (B) DO CONSUMO DE PROTEÍNAS POR DIA E (C) DA VARIAÇÃO DE PESO DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES (N=20 ANIMAIS) E DESNUTRIDOS (N=27 ANIMAIS).	41
GRÁFICO 2. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DO NÚMERO ABSOLUTO DE LEUCÓCITOS, LINFÓCITOS, NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS (/MM ³) E DA CONTAGEM DIFERENCIAL DAS CÉLULAS LEUCOCITÁRIAS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.	43
GRÁFICO 3. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DO NÚMERO DE ERITRÓCITOS DA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA E DO VOLUME DO HEMATÓCRITO DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.....	44
GRÁFICO 4. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CONTAGEM TOTAL DE PLAQUETAS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.	45
GRÁFICO 5. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CELULARIDADE DA MEDULA ÓSSEA E CONTAGEM DIFERENCIAL DAS CÉLULAS MEDULARES DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.....	46
GRÁFICO 6. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO TOTAL DE CTMS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.....	49
GRÁFICO 7. IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO TOTAL DE CTMS DOS GRUPOS CONTROLES.	50
GRÁFICO 8. IMUNOFENOTIPAGEM DA POPULAÇÃO TOTAL DE CTMS DOS GRUPOS DESNUTRIDOS.	51
GRÁFICO 9. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA QUANTIFICAÇÃO DAS UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIAS FIBROBLASTÓIDES DE CTMS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.....	53
GRÁFICO 10. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS DA PORCENTAGEM DE CONFLUÊNCIA A PARTIR DO PLAQUEAMENTO DE 1×10^6 CÉLULA/ML DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.	53
GRÁFICO 11. RESULTADOS DA MÉDIA $\pm$ O ERRO PADRÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE CEBP α EM CULTURA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.....	54
GRÁFICO 12. RESULTADOS DA MÉDIA $\pm$ O ERRO PADRÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE PPAR γ TOTAL E PPAR γ FOSFORILADO (P-PPAR γ) EM CULTURA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.	55

GRÁFICO 13. RESULTADOS DA MÉDIA $\pm$ O ERRO PADRÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE OSTERIX E SOX9 EM CULTURA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.....	56
GRÁFICO 14. RESULTADOS DA MÉDIA $\pm$ O ERRO PADRÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE RUNX2 EM CULTURA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.....	56
GRÁFICO 15. RESULTADOS DA MÉDIA $\pm$ O ERRO PADRÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE NF κ B TOTAL E NF κ B FOSFORILADO (P-NF κ B) EM CULTURA DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.	57
GRÁFICO 16. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE SCF PRODUZIDO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLES.	58
GRÁFICO 17. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IL-3 PRODUZIDO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLES.	59
GRÁFICO 18. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GM-CSF PRODUZIDO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLES.....	60
GRÁFICO 19. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE G-CSF PRODUZIDO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLES.	60
GRÁFICO 20. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TNF- α PRODUZIDO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLES.	61
GRÁFICO 21. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IL-1 α PRODUZIDO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLES.	61
GRÁFICO 22. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE IL-6 PRODUZIDO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLES.	62
GRÁFICO 23. RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DA CONCENTRAÇÃO DE TGF- β PRODUZIDO POR CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DE CAMUNDONGOS DOS GRUPOS CONTROLES.	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- COMPOSIÇÃO DAS RAÇÕES EXPERIMENTAIS.	34
TABELA 2- RESULTADOS EM VALORES MÉDIOS $\pm$ O ERRO PADRÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA E PRÉ-ALBUMINA DOS ANIMAIS DOS GRUPOS CONTROLES E DESNUTRIDOS.....	42

LISTA DE SIGLAS

AIN- Instituto Americano de Nutrição

Bglap- Proteína óssea gamma carboxyglutamato [gla]/ Osteocalcina

BMP- Proteína Morfogenética Óssea

Cbf- Fator ligante do núcleo

CTMDTA (h)- CTM derivada do tecido adiposo humano

C/EBP - Proteínas Estimuladoras de Ligação a CCAAT

CFU- Unidade Formadora de Colônia

Colla1- Colágeno, tipo I, alfa 1/ subunidade 1 da cadeia alfa do colágeno tipo 1

CTH- Célula Tronco Hematopoética

CTM- Célula Tronco Mesenquimal

DMEM- Meio Dulbecco Modificado

DNA- Ácido deSoxirribonucléico

DPE- Desnutrição Protéico- Energética

EDTA- Ácido Etileno Diaminotetracético

G-CSF- Fator estimulador de colônias granulocíticas

GLUT4- Transportador de glicose tipo 4

GM-CSF- Fator estimulador de colônias grânulo/ monocíticas

Ibsp- Sialoproteína ligante de integrina

IGF- Fator de crescimento tipo Insulina

IKK- I kappa quinase

IL- Interleucina

LPS- Lipopolissacarídeo

MEC- Matriz Extracelular

MO- Medula Óssea

NFATc1- Fator Nuclear de Células T- ativadas

NFκB- Fator Nuclear Kappa B

OSX- Osterix

PGC1α- Co-ativador 1 alfa do receptor α ativado por proliferador de peroxissoma.

PPAR- Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissoma

RNA- Ácido ribonucleico

RUNX- Fator de Transcrição Relacionado à Runt

RXR- Ácido 9-cis- retinóico

SBF- Soro Bovino Fetal

SCF- Fator de Célula Tronco

SDS- Dodecil Sulfato de Sódio

Spp1- Fosfoproteína secretada/ Osteopontina

TAZ- Co-ativador transcricional com ligação PDZ

TBS- Solução tampão Tris

TGF- Fator Transformador do Crescimento

TNF- Fator de Necrose Tumoral

VLA- Antígeno de expressão tardia

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A desnutrição protéica e protéico-energética (DPE) é o tipo mais freqüente de desnutrição, estimando-se que mais de 30% da humanidade sofre de algum grau de desnutrição sendo mais encontrada em crianças, idosos, pacientes portadores de neoplasias, doenças crônicas ou sob quimioterapia (WAITZBERG et al., 1999; MARCOS, 2000; WHO, 2000; GADDUCCI et al., 2001; AKNER; CEDERHOLM, 2001; NOVA et al., 2002; KEUSCH, 2003).

A desnutrição protéica e DPE possui como causa primária uma redução na ingestão de alimentos ou da utilização inapropriada de energia e proteína (LATHAM, 1990). Fisiologicamente, em seres humanos após o nascimento, a hematopoese ocorre exclusivamente na MO. A produção de células sanguíneas em um padrão constante depende do microambiente medular, estrutura organizada que regula a fisiologia da célula tronco hematopoética (CTH) (COWLING; DEXTER, 1995; McKENNA; COTTER, 1997; LAKSHMIPATHY; VERFAILLIE, 2005). O tecido hematopoético, como os tecidos que possuem uma alta taxa de renovação celular, requerem uma ampla fonte de nutrientes, e podem assim serem alterados em estados nutricionais deficientes (CHANDRA, 1991, 1992; BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995; WOODWARD, 1998; BORELLI et al., 2007; XAVIER et al., 2007).

Dados da literatura e do nosso grupo evidenciam que a desnutrição compromete órgãos linfo-hematopoéticos e modifica a resposta imune. Alterações funcionais como redução da migração celular, do espraio, fagocitose, atividade bactericida e fungicida e alterações na produção de espécies reativas do oxigênio (CHANDRA, 1991; KEUSCH, 1994; BORELLI, et al., 1995; NARDINELLI; BORELLI, 2001; BRIASSOULIS et al., 2001; VITURI et al., 2001) e nitrogênio (FOCK, et al., 2003), bem como diminuição na síntese de TNF- α , IL-1 α e IL-6 (FOCK et al., 2007), são dados que foram encontrados por nosso grupo.

Alterações estruturais e ultra-estruturais da MO, com evidente hipoplasia medular (BORELLI et al, 1995, 2001, 2007) e alterações histológicas da matriz extracelular (MEC),

com alteração na proporção de proteínas, especialmente de fibronectina, trombospondina e laminina (VITURI et al., 2000), bem como diminuição do ciclo celular de células tronco-progenitoras hematopoéticas (BORELLI et al., 2009) também são alterações importantes evidenciados em nosso modelo. Tais alterações podem modificar a co-localização de uma série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de crescimento e diferenciação de células hematopoéticas (BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995, 2001, 2007; KLEIN, 1995; VITURI, 2000).

Uma vez que, animais desnutridos apresentam hipoplasia severa de órgãos hematopoéticos e alterações do microambiente medular (BORELLI et al., 2007, 2009; XAVIER et al., 2007; FOCK et al., 2007) e que este microambiente apresenta distintos moduladores que atuam sinergicamente para influenciar a sobrevivência, proliferação e o desenvolvimento das células hematopoéticas em todos os seus níveis de diferenciação, investigamos a influência da desnutrição protéica sobre Células Tronco Mesenquimais, avaliando a capacidade de produção de citocinas e o comprometimento de fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação dessas células.

2. OBJETIVOS

Sabendo-se que animais desnutridos apresentam hipoplasia medular e comprometimento do microambiente medular, sendo este uma estrutura organizada e de fundamental importância para a hematopoese proveniente, principalmente, da diferenciação da Célula Tronco Mesenquimal, avaliamos, neste trabalho, a influência da desnutrição protéica sobre a capacidade de produção de citocinas e a expressão de fatores transcricionais reguladores da diferenciação das Células Tronco Mesenquimais.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Como objetivos específicos nos propusemos avaliar:

- ✓ Parâmetros bioquímicos indicativos do estado nutricional: consumo de ração e proteínas, concentração de proteínas totais, albumina e pré-albumina sérica;
- ✓ Hemograma e mielograma;
- ✓ Análise histológica da medula óssea;
- ✓ Isolamento e avaliação das características morfológicas e imunofenotípicas de Células Tronco Mesenquimais;
- ✓ Identificação e quantificação da expressão de fatores de transcrição (CEPB α , PPAR γ , RUNX2, Sox9, OSX, NFkB) nas Células Tronco Mesenquimais;
- ✓ Quantificação da capacidade de produção de citocinas (IL-1, IL-3, IL-6, TNF- α , TGF- β , GM-CSF, G-CSF e SCF) das Células Tronco Mesenquimais.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. DESNUTRIÇÃO PROTÉICA E PROTÉICO – ENERGÉTICA

A desnutrição significa a falta de alguns ou todos os nutrientes necessários para a saúde humana. Há dois tipos básicos de desnutrição: a primeira e mais importante é a DPE, onde há falta de quantidade suficiente de proteína e de alimentos que fornece energia. Este é o tipo de desnutrição que é referido quando a fome no mundo é discutida. O segundo tipo de desnutrição, também muito importante, é a deficiência de micronutrientes como vitaminas e minerais. Recentemente há discussões para incluir a obesidade como o terceiro tipo de desnutrição, neste caso, não relacionado à falta de alimentos, mas sim com a má nutrição como pobres escolhas alimentares (STINNETT, 1983; MONTEIRO et al., 1995; BARON, 1997; WORLDHUNGER, 2011).

A desnutrição pode ter origem na deficiência ou ausência de qualquer nutriente, sendo que sua instalação e gravidade dependem da causa, intensidade e duração da carência. Pode ser causada, primariamente, por dieta inadequada ou, secundariamente, por deficiência na absorção e, ou ingestão deficiente, por um aumento da utilização ou ainda, excreção excessiva de nutrientes. Assim, formas várias de desnutrição podem ocorrer simultaneamente e, desta maneira, quadros carenciais devidos a dietas quantitativas ou qualitativamente alteradas, originando tipos diversos de desnutrição (STINNETT, 1983).

Segundo De Onis et al. (1993) a organização mundial da saúde definiu a desnutrição protéica como resultado de uma menor ingestão de proteínas, mas com consumo adequado de calorias, e a DPE como condição (ões) patológica(s) que provém da menor ingestão, em várias proporções, de proteínas e calorias. A proteína é necessária para as funções de órgãos vitais, incluindo fornecimento de aminoácidos essenciais, desenvolvimento e manutenção dos músculos (WORLDHUNGER, 2011).

A desnutrição pode ser aguda ou crônica e a resposta metabólica pode ser diferente em cada caso. Crianças jovens nos países em desenvolvimento sofrem graus variados de desnutrição. Essas crianças estão vulneráveis aos efeitos desta dieta inadequada crônica, como a exposição para doenças infecciosas, resultando em alta taxa de mortalidade. A taxa de morte

por desnutrição esta estimada em 35% das mortes de crianças no mundo (BLACK; MORRIS; BRYCE, 2003; EMERY, 2005). Crianças e adultos, principalmente nos países em desenvolvimento, que estão ingerindo dietas inadequadas são classificados como deficientes de energia crônica. Embora essas pessoas considerem-se adaptadas com a dieta inadequada, sua produção no trabalho é baixo e a sua capacidade de executar e desfrutar de funções normais sociais podem ser limitados. Em países industrializados, pessoas com doenças graves podem levar a anorexia, resultando em desnutrição, um fator sinérgico para contribuir com a morbidade e mortalidade (KEUSCH, 2003; EMERY, 2005).

De acordo com a FAO (2010), a maior parte da população desnutrida vive em países em desenvolvimento, embora a prevalência infantil tenha reduzido 47% em 1980 para 33% em 2000 (aproximadamente, 40 milhões), o progresso é desigual segundo as regiões (DE ONIS; FRONGILLO; BLOSSNER, 2000). Um total de aproximadamente 925 milhões de pessoas passaram fome em 2010 comparados ao ano anterior que atingiu aproximadamente 1,020 bilhão. Na Ásia e no Pacífico é estimado que 578 milhões de pessoas sofram de fome crônica, 239 milhões passam fome na África Sub-Saariana, 53 milhões na América Latina e Caribe, 37 milhões no Oriente Médio e África do Norte e 19 milhões em países desenvolvidos (FAO, 2010).

No Brasil, o índice de desnutrição irregular mostra que em 2003, no Norte e Nordeste urbano e rural os índices de desnutrição variaram entre 36,2 a 48,3%, enquanto que na região Sul, Sudeste e Centro-Oeste esses índices foram menores (17%, 18,3% e 22,3%, respectivamente). Dados mostraram que 6,6% das crianças com até cinco anos de idade que vivia no Semi-Árido, uma das áreas mais pobres do país, sofriam de desnutrição crônica (baixa estatura) (MONTEIRO, 2003).

No entanto, houve um declínio substancial da desnutrição infantil no Brasil, sendo que os fatores responsáveis por esse declínio seria a melhoria da distribuição de renda, redução da pobreza, consequência da reativação do crescimento econômico e diminuição do desemprego, reajustes do salário mínimo e expansão da cobertura dos programas de transferência de renda. Essa evolução do declínio da desnutrição no Brasil entre 1996-2007 indica que a meta do milênio das Nações Unidas relativa à desnutrição infantil de 6% (redução à metade no período de 1990-2015) poderá ser alcançada pelo Brasil (MONTEIRO et al., 2009).

As manifestações clínicas da desnutrição dependem do grau e severidade da causa e duração da deficiência, bem como da idade do indivíduo e da associação ou não com outras doenças. Desta forma, a desnutrição compreende uma gama de síndromes clínicas. As formas clínicas características com manifestações mais severas são o Kwashiorkor, decorrente de uma carência protéica com ingestão normal de carboidratos, e o Marasmus que decorre da deficiência prolongada de proteínas e carboidratos. Os quadros intermediários surgem pela combinação de vários graus de privação protéica com diversos graus de deficiência calórica total (DE ANGELIS, 1986).

Estas síndromes podem cursar com retardo no crescimento, alterações psicomotoras e morfológicas e funcionais acentuadas em diversos órgãos e sistemas do corpo como coração, pulmões, trato gastrointestinal, fígado, rins e sistemas endócrino e imunológico (DE ANGELIS, 1986; AUGUSTO, 1995; ROBBINS; CONTRAN; KUMAR, 2003).

O comprometimento dos órgãos linfo-hematopoéticos na desnutrição está diretamente associado com a modificação da resposta imune que se traduz por maior suscetibilidade a infecções (GROSS; NEWBERNE, 1980; TOMKINS, 1986; VICTORIA; HERNANDEZ, 1990; SCRIMSHAW, 2003). Alterações hematológicas quantitativas como, anemia é evidenciada em desnutrição protéico e protéico-energética (MARTINS et al., 1971; DE ANGELIS, 1986; ALVES, 1995; LEE; HERBERT, 1999; ROBBINS; CONTRAN; KUMAR, 2003). Em nosso modelo de desnutrição protéico e protéico-energética evidenciamos que anemia encontrada não é ferropriva, nossos resultados indicam que a anemia instalada nesses animais é uma anemia decorrente da redução do número de precursores eritróides e que são hiporesponsivas à eritropoetina (BORELLI et al., 2007).

Outras alterações hematológicas quantitativas, também evidenciadas em condições de desnutrição, como leucopenia (GARCIA, 1992; BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995) linfocitopenia (GARCIA, 1992; AUGUSTO, 1995; BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995; BARON, 1997) são um reflexo do comprometimento dos órgãos linfo-hematopoéticos, particularmente do microambiente hematopoético (XAVIER et al., 2007).

A aparente dificuldade da resposta leucocitária em processos infecciosos, em parte, ocorre devido à redução no compartimento de reserva da MO (BLATT; BORELLI, 2004) com consequente alteração no processo de mobilização dos leucócitos do sangue para os

tecidos (BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995; LANDGRAF et al., 2007), além de alterações dos mecanismos funcionais de resposta celular. (BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995; NARDINELLI; BORELLI, 2001; VITURI et al., 2001; FOCK; SILVA; BORELLI, 2003).

3.2. HEMATOPOESE – DESNUTRIÇÃO E ESTROMA MEDULAR

O tecido hematopoético como todos os outros tecidos que apresentam alta taxa de renovação e proliferação celular requer uma variedade de nutrientes e pode ser alterado por deficiência nutricional (BORELLI et al., 2004; XAVIER et al., 2007; BORELLI et al., 2009).

O microambiente medular é composto basicamente pelo sistema celular hematopoético e estromal (DEANS; MOSELEY, 2000). O termo estroma refere-se ao conjunto composto pelo sistema celular estromal – que inclui fibroblastos, células endoteliais, células reticulares, adipócitos e osteoblastos – conjuntamente com a MEC a ele associada, bem como outros tipos celulares, tais como macrófagos, que embora sejam de origem hematopoética, são considerados componentes estromais funcionais (BORDIGNON et al., 1999), e por substâncias solúveis (EAVES; CASHMAN; EAVES, 1991; BRACH; HERRMANN, 1991; MAYANI; GUILBERT; JANOWSA-WIECZOREK, 1992), apresentando-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; GUILBERT; JANOWSA-WIECZOREK, 1992; OPAS, 1994). Dessa maneira, as existências de fatores regulatórios formam microambientes indutivos (TRENTIN, 1978; TESTA; 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; WILLIAMS, 1990; METCALF, 1992; OPAS, 1994).

Dessa forma, para que ocorra a sobrevivência, proliferação e diferenciação das CTH, é necessário que exista um local em que possam se fixar. Esse parênquima de sustentação que inclui várias moléculas da MEC apresenta grande vascularização e é composto por células CTMs e células originadas desse tipo celular (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004).

O compartimento estromal é altamente adaptativo e apresenta a capacidade de alterar sua função em resposta a estímulos externos, com isso se especula o papel do estroma na tradução de sinais da periferia para as CTH (MÜLLER-SIEBURG; DERYUGINA, 1995). O microambiente medular apresenta então distintos moduladores que atuam sinergicamente para influenciar a sobrevivência, proliferação e o desenvolvimento das células hematopoéticas em todos os seus níveis de diferenciação (FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004).

Nosso grupo tem demonstrado que a desnutrição protéica compromete diversos aspectos da resposta inflamatória, com destaque para o comprometimento hematopoético onde observamos comprometimento da CTH, com diminuição e/ou perda de proliferação celular comprometendo a granulopoese (BORELLI et al., 2009), o qual contribuiu para a leucopenia encontrada (GARCIA, 1992; BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995), linfocitopenia (GARCIA, 1992; AUGUSTO, 1995; BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995; BARON, 1997), sugerindo até um estado de falência medular (BORELLI et al., 2009). Nesse modelo observamos *in vitro* que o estroma medular de animais desnutridos possui comprometimento na sustentação da hematopoese (XAVIER et al., 2007; BORELLI et al., 2007).

Portanto, um dos pré-requisitos para a hematopoese é o estabelecimento das células tronco com um microambiente adequado para interações de células-células ou células-matriz (TAVASSOLI; MIGUELL, 1991). Células estromais e componentes da MEC modulam o crescimento e diferenciação de progenitores hematopoéticos, porém há poucos estudos que exploram o relacionamento entre desnutrição e o microambiente hematopoético (XAVIER et al., 2007; BORELLI et al., 2009) e considerando que moléculas da MEC estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação, diferenciação e migração das células hematopoéticas, essas mudanças podem ser significativas para a fisiologia desse tecido (BORELLI et al., 2009).

3.3. CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E FORMAÇÃO DO ESTROMA MEDULAR

O microambiente estromal intacto e funcional é essencial para uma hematopoese adequada, este ambiente de forma direta ou indireta regula a auto-renovação, proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação das CTHs por vários mecanismos.

A evidência de que o microambiente estromal teria como principal função sustentar a hematopoese foi descrita, pela primeira vez, por Dexter et al. (DEXTER; ALLEN; LAJTHA, 1977), onde comprovou em um sistema, que uma cultura de células aderentes derivadas da MO mantêm as CTHs viáveis e capazes de originar colônias de granulócitos – macrófagos e colônias eritróides, por um período de semanas a meses. Trabalhos posteriores mostraram que CTMs derivadas principalmente da MO são capazes de criar o ambiente necessário para manter as CTHs (CD34⁺/CD38⁻) viáveis e de expandi-las mesmo na ausência de citocinas suplementares, sendo que, na presença de ambas, este processo é sinérgico (BACIGALUPO, 2004; ZHANG et al., 2004; JANG et al., 2006).

Os primeiros relatos de que a medula óssea contém células precursoras não hematopoéticas advém de estudos realizados por Friedenstein na década de 60 (PHINNEY, 2002). Em seus estudos dispensava amostra de MO em placas de cultura plásticas, e descartava as células não aderentes após 4 horas de incubação. Com este procedimento, CTHs e sua progênie (que a princípio não aderem ao plástico) foram grandemente eliminadas, e as células remanescentes mantidas em cultura apresentavam-se fusiformes, semelhantes a fibroblastos, formando agrupamentos de duas a quatro células, que permaneciam dormentes por dois a quatro dias, quando então passavam a se multiplicar rapidamente. Outra característica importante dessa célula era sua capacidade de se diferenciar em colônias que morfologicamente lembravam pequenos fragmentos de osso e cartilagem. Posteriormente, nos anos 80, diversos estudos estabeleceram pelo mesmo método proposto por Friedenstein, que essas células isoladas eram multipotentes e tinham capacidade de diferenciarem-se em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (PROCKOP, 1997).

As CTHs possuem capacidade de aderir ao estroma através ligação a integrinas, como VLA-4 e VLA-5 (antígeno de expressão tardia) (WHETTON; GRAHAM, 1999), esse processo pode ser modulado por citocinas como SCF (fator de célula tronco), GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos/macrófagos) e IL-3 (interleucina 3). Como as células periféricas e funcionais apresentam tempo de vida limitado e precisam ser substituídas regularmente, as CTHs estão continuamente proliferando para atender a essa demanda fisiológica. Em caso de dano em algum outro tecido do organismo poderá ocorrer mobilização

dessas células, sendo o dano um estímulo para que esse tipo celular se diferencie e promova o reparo da estrutura danificada (KONDO et al., 2003; FUCHS; TUMBAR; GUASCH, 2004).

3.4. CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E FATORES DE TRANSCRIÇÃO

CTMs são células multipotentes que, classicamente, dão origem a osteoblastos, adipócitos, condrócitos (NISHIMURA et al., 2008; KASSEM; ABDALLAH, 2008; MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009), mioblastos (BARRY; MURPHY, 2004; MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009), além de prover o estroma medular para células hematopoéticas (BARRY; MURPHY, 2004). Na MO o comprometimento, diferenciação e maturação da CTM em outras células são harmoniosamente controlados por sinais de transdução específicos (NISHIMURA et al., 2008) e expressão de específicos grupos de fatores de transcrição (NISHIMURA et al., 2008; MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009) (figura 1).

Figura 1. Representação da diferenciação celular da Célula Tronco Mesenquimal por fatores de transcrição. Fonte: Adaptado de NISHIMURA et al., 2008.

C/EBP α (Proteínas Estimuladoras de Ligação a CCAAT) e PPAR γ (Receptor Ativado por Proliferadores de Peroxissoma Gamma) são os principais fatores de transcrição para determinar a adipogênese, enquanto RUNX2 (Fator de Transcrição Relacionado à Runt 2) e OSX (osterix) têm papel crítico na osteoblastogênese (NISHIMURA et al., 2008; MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009); para a diferenciação em condrócitos, membros da família Sox no estágio recente e RUNX2 nos últimos estágios, são requeridos. A expressão e a função desses fatores de transcrição é controlada ou modulada por co-ativadores, co-repressores e outros reguladores transcricionais (NISHIMURA et al., 2008).

A diferenciação para osteoblastos e adipócitos tem relevância particular para a manutenção da homeostase óssea. Osso é um tecido conectivo especializado que dá suporte estrutural para o músculo esquelético, proteção física aos órgãos como cérebro e coração, reserva minerais como cálcio e fosfato e fonte contínua de CTHs para a regeneração das células sanguíneas e do sistema imune (NISHIMURA et al., 2008). Experimentos *in vitro* com CTMs derivadas da MO têm demonstrado que os fatores que induzem a adipogênese inibem a formação de osteoblastos, e vice-versa. Além disso, alguns fatores associados com a perda óssea, como idade, tratamento com glicocorticóides, aumento de cortisol produzido e osteoporose, coincidem com o aumento da MO adiposa. Adipócitos podem influenciar a remodelação óssea através da secreção de ácidos graxos, e adipocinas que com ação parácrina podem influenciar o desenvolvimento e a função de precursores e células maduras como osteoblastos e osteoclastos (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009).

Enquanto o PPAR γ parece ser crucial para a indução da adipogênese medular, citocinas como IL-1 e o TNF- α possuem capacidade em suprir a adipogênese. SUZAWA et al. (2003) demonstrou que células ST2, células mesenquimais derivadas da MO de camundongos, tratadas com troglitazone diferenciam para osteoblastos e apresentam super expressão de IKK β (I kappa β quinase), IKK α (I kappa α quinase) e NF κ B consequentemente com diminuição da expressão de PPAR γ e diminuição da adipogênese. Assim, propôs a existência de um mecanismo regulatório entre a expressão de PPAR γ e do NF κ B, um fator de transcrição importante na ativação de genes envolvidos na resposta inflamatória, podendo levar a síntese de diversas citocinas, entre elas IL-1 e o TNF- α .

3.4.1. C/EBPs

Os fatores de transcrição C/EBPs possuem 6 isoformas: C/EBP α , C/EBP β , C/EBP γ , C/EBP δ , C/EBP ζ (CHOP-10) e C/EBP ϵ (OTTO; LANE, 2005; MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009). A família das C/EBPs apresenta funções em inúmeros processos como diferenciação, resposta inflamatórias, regeneração hepática e metabolismo celular (RMAJI; FOKA, 2002).

C/EBP α , C/EBP β e C/EBP γ promovem a adipogênese, sendo que em CTMs a adipogênese é caracterizada pela presença de C/EBP α e C/EBP β tanto na fase de determinação e diferenciação. C/EBP α ativa diretamente vários genes adipogênicos necessários para o desenvolvimento de adipócitos maduros, incluindo PPAR γ (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009) e a redução da expressão de C/EBP α acarreta em significativa diminuição do potencial adipogênico com diminuição também da expressão de PPAR γ , os quais são reversíveis com a adição de PPAR γ . Entretanto, células que não expressam PPAR γ não possuem potencial adipogênico, sugerindo que C/EBP α promove adipogênese PPAR γ dependente (RMAJI; FOKA, 2002; MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009).

3.4.2. PPAR γ

O PPAR γ pertence à família de receptores nucleares que incluem receptores de hormônios que para serem ativados dependem de ligantes (OTTO; LANE, 2005; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007; MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009). Três proteínas codificadas por genes diferentes têm sido identificadas: PPAR α , PPAR β , PPAR γ que regulam a expressão de gene alvo pela ligação a elementos específicos situados em sítios regulatórios de cada gene formando dímeros juntamente com um fator protéico adicional, o receptor do ácido 9-cis- retinóico (RXR) (OTTO; LANE, 2005; TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007). Sob atuação de agonistas, a conformação do PPAR é alterada e estabilizada, criando um sítio de ligação, com posterior recrutamento de co-ativadores transcripcionais, resultando num aumento da transcrição gênica.

O gene do PPAR γ foi mapeado no cromossomo 3, região 3p25 (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007). São expressos em duas isoformas: PPAR γ 1, PPAR γ 2 (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009), que diferem na sua extremidade 5', sendo este último a isoforma predominante no tecido adiposo (TAVARES; HIRATA; HIRATA, 2007; MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009). PPAR γ 1 é expresso em baixas concentrações no tecido adiposo e em muitos outros tipos celulares como macrófagos, próstata, no entanto a expressão de ambas isoformas é indutora de adipogênese (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009).

PPAR γ é o principal regulador da adipogênese porque nenhum outro fator pode induzir adipogênese na falta de PPAR γ e todas as vias críticas de sinalização intracelular envolvidas nesse processo convergem para a expressão de deste fator (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009). O aumento da expressão ativa diretamente ou induz a expressão de genes que caracterizam o fenótipo do adipócitos, incluindo ácido graxo sintase, GLUT4 (Transportador de glicose tipo 4), acetil CoA carboxilase, receptores de insulina. A promoção da adipogênese por PPAR γ não envolve somente o aumento da expressão, mas também a ativação de ligantes dependentes desse fator na fase de determinação (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009).

3.4.3. RUNX2

RUNX2 é o fator de transcrição responsável pela ativação do gene da osteocalcina, regulando a transcrição da osteocalcina, osteopontina e proteína sialo-osso (KOMORI, 2003; NISHIMURA et al., 2008). É expresso em duas isoformas que diferem na porção N-terminal (KOMORI; KISHIMOTO, 1998). RNA mensageiros de RUNX2 tipo I e II são expressos em osteoblastos e condrócitos, no entanto tipo II é predominantemente em osteoblastos (CHOI et al., 2002).

A super expressão promove a diferenciação das CTMs em osteoblastos. É também expressado em condrócitos hipertróficos e camundongos deficientes de RUNX2 mostram severos prejuízos na condrogênese nesses estágios (NISHIMURA et al., 2008; KOMORI, 2010). Requer Cbfb (fator ligante do núcleo beta), fator co-transcricional que forma

heterodímero com RUNX2 (KOMORI, 2003), para associar firmemente ao DNA e por isso Cbfb é necessário para o desenvolvimento ósseo e cartilaginoso. Estudos bioquímicos indicam a interação do sinal BMP (Proteína Morfogênica do Osso) com RUNX2, BMP2 regula a expressão de RUNX2 através da ativação de Smads. Smad 1 e 5 interagem fisicamente com RUNX2 e aumenta a atividade transcricional e osteblastogênica sendo o TAZ (co-ativador transcricional com ligação PDZ) um co-ativador de RUNX2 (NISHIMURA et al., 2008).

Durante o desenvolvimento de ossos intramembranosos, RUNX2 é fortemente detectado em pré-osteoblastos, osteoblastos imaturos e maduros. Durante o desenvolvimento do osso endocondral, RUNX2 é o primeiro a ser detectado em CTM na região pericondral; osteoblastos imaturos circundando condrócitos hipertróficos expressam RUNX2 e Spp1 (Fosfoproteína secretada/ Osteopontina), mas não expressam Bglap (proteína óssea gamma carboxyglutamato [gla]/ Osteocalcina); ocorre expressão de Bglap em osteoblastos maduros jovens, os quais expressam RUNX2. A expressão deste é finalmente suprimida por osteoblastos maduros Bglap- positivos (MARUYAMA et al., 2007).

3.4.4. Osterix (OSX)

O OSX é um fator transcricional pertencente à família sp1, sendo essencial para o desenvolvimento ósseo. Sua expressão é regulada via BMP2 durante a fase inicial de diferenciação das CTMs em osteoblastos (KOMORI, 2003; NISHIMURA et al., 2008; ULSAMER et al., 2008), seguida pela ativação de RUNX2 (KOMORI, 2003). OSX promove proliferação de células progenitoras enquanto RUNX2 tem efeito anti-proliferação (ULSAMER et al., 2008). OSX se liga ao NFATc1 (Fator Nuclear de Células T- ativadas) e aumenta a atividade de Coll α 1 (colágeno tipo I, alfa 1) (NISHIMURA et al., 2008; ULSAMER et al., 2008).

3.4.5. Sox 9

É o fator de transcrição para a condensação mesenquimal para iniciar diferenciação de condrócitos. Juntamente com Sox5 e 6 tem papel importante na produção de proteínas da matriz, especialmente colágeno tipo II e agrecan (KOMORI, 2003; KOMORI 2010). Promove a diferenciação e a expressão de genes MEC cartilagem específica Col2 α 1, Col1 α 1 e agrecan. Forma um complexo transcricional com várias proteínas, Sox5 e 6 os quais são induzidos por Sox9 associam com Sox9 e regulam a diferenciação de condrócitos. PGC1 α é co-ativador de Sox9 e interação entre β -catenina e Sox9 também foi demonstrada (NISHIMURA et al., 2008).

3.4.6. NF κ B

Fator nuclear kappa B é um componente chave na indução de vias de expressão, e pode levar a produção de citocinas por células tronco. NF κ B é tipicamente ativado por IKK sendo que IKK fosforilado é dissociado do NF κ B permitindo a ativação e translocação nuclear do NF κ B (NOVOTNY et. al, 2008).

Hess et al., (2009) mostraram que TNF α ativa a sinalização NF κ B promovendo a diferenciação osteogênica da Célula Tronco Mesenquimal por aumentar a expressão de BMP2 tanto quanto reguladores osteogênicos e também influencia na diferenciação condrogênica por alterar níveis de RNAm do fator de transcrição Sox9.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

Para realização dos experimentos, foram utilizados camundongos Balb/c, machos, de dois a três meses de idade, provenientes de colônias mantidas no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Inicialmente, os animais foram pesados e separados em gaioleiros metabólicos (ZUCAS; LAJOLO; BARBÉRIO, 1969), mantidos em temperatura ambiente de 22 a 25°C, ciclo de luz claro-escuro de 12 horas, umidade de $55 \pm 10\%$. Neste período de adaptação todos os animais receberam ração comercial Purina[®], água *ad libitum* e foram pesados a cada 48 horas até a estabilização do peso corpóreo, cerca de 15 a 20 dias.

O presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo em 10 de maio de 2010 (CEUA/FCF/36/2010, protocolo nº277, anexo 1).

4.2. INDUÇÃO DA DESNUTRIÇÃO

Após a fase de adaptação os animais foram separados aleatoriamente em 2 grupos: controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles receberam a ração normoprotéica; e os animais pertencentes aos grupos desnutridos, a ração hipoprotéica (DU; HIGGINBOTHAN; WHITE, 2000; BORELLI et al, 2007). Os animais foram submetidos aos ensaios experimentais quando o grupo desnutrido perdeu cerca de 20 % do peso inicial sendo que o peso e o consumo de ração foram avaliados a cada 48 horas (XAVIER et al., 2007).

4.3. RAÇÕES

As rações dos animais de ambos os grupos foram preparadas em nosso laboratório, conforme a dieta para roedores do Instituto Americano de Nutrição (AIN-93M). Os dois tipos de ração são isocalóricos, diferindo na concentração protéica que é definida pela quantidade de caseína (Labsynth[®]) adicionada: normoprotéica com 12% e hipoprotéica com 2% de caseína (tabela 1).

Como a caseína fornece em torno de 80% de fosfato, na ração hipoprotéicas que contém teores mais baixos de caseína, a composição da mistura salínica foi corrigida de acordo com a concentração protéica de cada lote, para que a deficiência de fosfato seja suprida (REEVES et al., 1993).

A concentração protéica de caseína de cada lote produzido 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 a responsabilidade do Prof Dr. Júlio Tirapegui.

As rações granuladas foram conservadas a 4°C até o uso quando os animais dos grupos controles receberam a ração contendo 12% de proteína e os animais dos grupos desnutridos receberam ração hipoprotéica contendo 2% de proteína (DU; HIGGINBOTHAN; WHITE, 2000).

Tabela 1- Composição das rações experimentais.

Constituintes	Ração I	Ração II
	Controle	Hipoprotéica
	(g/kg ração)	
Proteína	120	20
Mistura salínica ¹	35	35
Mistura vitamínica ¹	10	10
Sacarose	100	100
Óleo Soja	40	40
Celulose	50	50
L-Cistina	1,8	0,257
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008
Amido (q.s.p.)	1000	1000

¹ As misturas salínica e vitamínica foram preparadas sob encomenda de acordo com as recomendações de 1993 do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos (REEVES, 1993).

4.4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS SANGÜÍNEAS

Após a alteração de peso dos grupos desnutridos, os animais foram previamente anestesiados com xilazina (10mg/Kg de peso, Rompum[®], Bayer) e cetamina (100 mg/Kg de peso, Ketamina[®], Cristália). As amostras sanguíneas foram obtidas a partir da punção do plexo axilar de camundongos sendo coletado sangue total para a realização de hemograma e soro para dosagem de proteínas totais, albumina, pré-albumina. O sangue total foi coletado em tubo eppendorfe com EDTA 10% (ácido etileno diaminotetracético) na proporção de 50 µL para cada 1,0 mL de sangue e o soro foi obtido após a coleta de sangue total sem anticoagulante e separação após centrifugação (2000g por 15 minutos) a 4°C.

4.5. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA SÉRICA E PRÉ-ALBUMINA

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método do Biureto (GORNALL, 1949) e a determinação de albumina realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (RODKEY, 1965; DOUMAS et al., 1971), utilizando “kits” comerciais da Labtest®. As amostras foram processadas em duplicatas e as leituras realizadas em espectrofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instrumentals, Inc). A pré-albumina foi avaliada pela determinação quantitativa em soro por técnica automatizada de nefelometria utilizando-se reagentes comerciais N-Antisoro pré-albumina (Dade Behring®, Marburg, USA), seguindo-se a metodologia indicada pelo fabricante.

4.6. HEMOGRAMA

Com as amostras de sangue total foi realizado o hemograma completo. A contagem total de leucócitos, hemácias, plaquetas; dosagem de hemoglobina e determinação do hematócrito foi determinada pelo analisador automático de células sanguíneas ABC vet (ABX Diagnostics). A contagem diferencial dos leucócitos foi determinada a partir de extensões sanguíneas coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). As extensões coradas foram analisadas pelo microscópio óptico e no mínimo 100 leucócitos foram contados.

4.7. COLETA DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E MIELOGRAMA

Os animais dos dois grupos anestesiados, exsanguinados, foram sacrificados por deslocamento cervical. A seguir o fêmur foi seccionado entre a articulação fêmur-íliaca e fêmur-tibial e com o auxílio de uma agulha e seringa, foi realizada a lavagem da cavidade femural e das tíbias com 2 mL de meio DMEM baixa glicose (Cultilab®, Campinas, Brasil).

A suspensão de células da MO obtida a partir dessa lavagem foi mantida em tubos tipo falcon no gelo até a realização do mielograma e cultura celular. Uma alíquota desse material foi diluída em líquido de Turk para a contagem de células nucleadas na câmara de Neubauer. Lâminas de citocentrifugado (Incibrás[®], Brasil) foram confeccionadas e também coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) para fazer a contagem diferencial de no mínimo 300 células.

4.8. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA

Após os animais sacrificados, foi coletado o esterno e estes fixados em paraformaldeído 4% por 24hs, sob agitação. Para a descalcificação foi utilizado solução de EDTA 10% por 3hs a temperatura ambiente e com agitação. O material foi lavado em água corrente seguido de passagens de 30 minutos por álcool 100, 95 e 70%. Os blocos foram incluídos em parafina e seccionados em 5 µm, seguindo-se o processamento histológico convencional. As preparações histológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Os tecidos foram emblocados em parafina e os cortes, de aproximadamente 5µm, corados pela Hematoxilina e Eosina (H/E).

4.9. CULTURA DE CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL

O isolamento das CTMs foi realizado seguindo-se a metodologia originalmente descrita por Friedenstien (FRIEDENSTEIN et al., 1976), que se baseia na capacidade que estas células têm de aderir ao plástico, ficando relativamente isentas de CTHs após a 2^a ou 3^a passagem (COLTER et al., 2000).

As células da MO foram obtidas por lavagem da cavidade medular do fêmur, conforme descrito e a viabilidade celular avaliada com azul de Trypan 1% em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas (1×10^6 células/mL) em placas de cultura, com ou sem lamínulas, redondas de 13 mm de diâmetro, utilizando meio DMEM baixa glicose

(Cultilab[®], Campinas, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), 100 UI-mL de penicilina G sódica (Sigma[®], Chemical Company, USA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma[®], Chemical Company, USA). As células foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e, no 3º, 7º, 14º dia o meio de cultura foi trocado por meio de cultura novo sendo avaliado o crescimento celular utilizando-se o microscópio invertido.

4.10. CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTMs

Após a tripsinização das células cultivadas conforme descrito no item 4.9, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 300g, em temperatura de 20-25°C. O sobrenadante foi retirado e o sedimento ressuspenso em 400µL de PBS, pH 7,2 e 2 a 5µL de anticorpo para cada 1×10^6 células/mL sendo incubado por 20 minutos, em temperatura de 20-25°C. Após esse período, a suspensão foi centrifugada novamente por 10 minutos a 300g, em temperatura de 20-25°C e o sobrenadante foi retirado sendo o sedimento ressuspendido em 500µL de PBS e centrifugado 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.

As células separadas foram caracterizadas imunofenotipicamente pelos anticorpos anti-CD90, CD271, Sca1, CD49e, CD13, CD34, CD45 e CD14 em citômetro de fluxo FACS Calibur[®] (Becton Dickson, San Jose, CA). Também foi feito como controle, a marcação para o isotipo de cada cadeia do anticorpo. A fluorescência celular foi medida em citômetro de fluxo FACScan[®] (Becton Dickson, San Jose, CA) em de 488nm e excitação com íon argônio.

4.11. CONTAGEM DE CFUS

Após estabelecimento das culturas, como descrito nos item 4.9, foram contadas as colônias com mais de 50 células fibroblastóides, em microscópio invertido, sendo anotado o crescimento celular, modificação da estrutura e confluência. O crescimento celular e o estabelecimento do estroma foram avaliados no 3º, 7º e 14º dia de cultivo. A confluência foi determinada em porcentagem de crescimento pela análise subjetiva, em relação à área total da placa em um intervalo de 0 a 100%.

4.12. CAPACIDADE DE DIFERENCIAÇÃO EM ADIPÓCITOS, CONDRÓCITOS E OSTEÓBLASTOS

Após o estabelecimento e isolamento das CTMs, essas células foram tripsinizadas e alíquotadas em 1 mL contendo 50.000 células/mL. Essas células foram plaqueadas em placas de 24 poços. A diferenciação foi induzida após 24 horas do início do cultivo, quando a aderência e confluência estava em torno de 50%.

Para a diferenciação em adipócitos todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, adicionado 1 mL de meio de indução DMEM 10% de SBF, suplementado com 10 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), 10 μ g/mL de insulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e 100 mM de indometacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As placas foram incubadas em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂ e a totalidade do meio foi trocado no 3º, 7º e 14º dia de cultivo. A diferenciação em adipócitos foi avaliada em microscopia de contraste de fase e coloração de oil red.

Para a diferenciação em osteoblastos todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, adicionado 1 mL de meio de indução DMEM 10% de SBF, suplementado com 0,10 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), 100 μ M de ácido ascórbico e 10 mM de β glicerolfosfato (Reagem, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A diferenciação em osteoblastos foi avaliada em microscopia de contraste de fase e coloração de fosfatase alcalina.

Para a diferenciação em condrócitos todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, adicionado 1 mL de meio de indução DMEM 10% SBF, suplementado com 10 ng/mL de TGF- β (Lonza), 100 μ M de piruvato de sódio (Gibco), 0,1 μ M de dexametasona (Decadron injetável, Prodome, Campinas, SP, Brasil), 50 μ M de ácido ascórbico, 0,5X insulina-transferrina – selenium A (Gibco) e 0,2% albumina bovina (Sigma Aldrich). A diferenciação em condrócitos foi avaliada em microscopia de contraste de fase e coloração de azul de toluidina.

4.13. QUANTIFICAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM CTMS POR WESTERN BLOT

Para a quantificação dos fatores de transcrição foi realizada cultura conforme o item 4.9. Após a separação, as Células Tronco Mesenquimais foram lisadas para a extração das proteínas totais. Cada placa de cultura foi ressuspensa em 150uL de tampão RIPA® (25mM de Tris HCl pH7,6, 150mM de NaCl, 1% de NP-40, 1% de deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, Pierce) gelado contendo inibidores de fosfatase e proteases (1mM de PMSF, 50mM de NaF, 10ug/mL de leupeptina e 10ug/mL de aprotinina). A suspensão foi homogeneizada por 60 minutos a 4°C. A amostra foi, então, centrifugada a 14000g por 15 minutos para peletizar os restos celulares e ao sobrenadante contendo as proteínas totais foi adicionado tampão Laemmli 5X concentrado (Tris HCl 1M pH6,8, 0,01% de azul de bromofenol, 10% de SDS, 50% de glicerol e 10% de mercaptoetanol) na proporção de 4 partes de amostra para 1 parte de tampão. Essa solução foi aquecida em água a 95°C por 5 minutos para desnaturar as proteínas e armazenada a -40°C até o uso. Uma pequena alíquota do sobrenadante foi separada antes da adição do tampão Laemmli para a quantificação de proteínas utilizando kit comercial (BCA™ protein assay kit, Pierce).

Após a quantificação das proteínas totais foi realizada uma eletroforese em SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis), utilizando um mini gel de poliacrilamida a 10% e para a comparação dos pesos das frações separadas, padrão Spectra™. 40ug de proteínas das amostras foram aplicados em cada poço, juntamente com o padrão de peso molecular. A eletroforese foi executada a 100volts em tampão de corrida (25mM de Trizma base, 192mM de glicina, 0,1% de SDS e pH8,3) até que as amostras percorressem todo o gel. Imediatamente após a separação foi feita a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Hybond ECL, GE Healthcare) em uma cuba contendo tampão de transferência (NaHCO₃ em água destilada) a 30V por 120 minutos a 4°C. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos e depois lavada com solução tampão Tris (TBS) Tween.

A seguir foi feito o imunoblotting: A membrana foi previamente tratada com tampão de bloqueio, solução de leite a 3% (TBS com 0,1% de Tween 20 e leite em pó desnatado (Molico), por 40 minutos a temperatura ambiente e sob constante agitação. A membrana foi, então, lavada 3 vezes com tampão de lavagem TBS-Tween (solução de TBS com 0,1% de Tween 20) por 10 minutos e sob agitação a temperatura ambiente para depois ser incubada

com o anticorpo primário anti-C/EBP α (1:500, Santa Cruz), anti-PPAR γ total e fosforilado (1:1000, Santa Cruz), anti-RUNX2 (1:1000, Abcam), anti-Sox9 (1:500, Santa Cruz), anti-OSX (1:500, Abcam), anti-NF κ B total e fosforilado (1:1000, Cell Signaling) nas devidas diluições em solução de leite a 3% (TBS com 0,1% de Tween 20 e leite em pó desnatado (Molico). A incubação foi mantida overnight, a 4°C e sob constante agitação e depois a membrana foi novamente lavada da mesma forma descrita anteriormente. A seguir, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com biotina, RD Biosciences) numa diluição de 1:2000. Novamente a membrana foi submetida ao processo de lavagem e sendo feita a detecção por quimioluminescência utilizando o kit de revelação ECL (ECL Plus e ECL Femto Western Blot Detection Reagents, Amersham Biosciences).

As aquisições e análise das imagens foram feitas no equipamento ImageQuant 400 (GE Healthcare). Para a quantificação dos fatores de transcrição foi utilizada a marcação de β -actina para normalização.

4.14. DOSAGEM DE CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO

A quantificação de SCF, G-CSF, GM-CSF, IL-3, IL-6, IL-1 α , TNF- α e TGF- β foram realizadas no sobrenadante das células mesenquimais coletados no 3º, 7º e 14º dias de cultura. A metodologia utilizada foi imunoensaio do tipo ELISA, utilizando-se “Kits” comerciais da Quantikine ELISA (RD system).

4.15. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPadInstattm for Windows. Os dados foram analisados pelo teste de Shapiro Wilk para verificação se a distribuição das amostras era normal, sendo as comparações estatísticas paramétricas realizadas por test-T. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças estatisticamente significativas foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DAS RAÇÕES

As concentrações protéicas das rações controles e hipoprotéicas consumidas pelos grupos de animais foram quantificadas método de micro-Kjedahl. As rações controles apresentaram em média $12,83 \pm 0,63$ % (n=5) enquanto as rações desnutridas apresentaram $2,85 \pm 0,41$ % (n=6) de proteínas.

5.2. INDUÇÃO DA DESNUTRIÇÃO

Os animais dos grupos desnutridos, alimentados com a ração 2% de proteínas, apresentaram consumo de ração igual aos animais dos controles alimentados com ração com 12% de proteína (gráfico 1A). Entretanto, animais dos grupos desnutridos consumiram significativamente menor quantidade de proteínas quando comparados aos grupos controles (gráfico 1B).

Os animais dos grupos desnutridos apresentaram uma diminuição no peso corpóreo, após 5 semanas sendo alimentados com a ração 2% de proteínas, enquanto que os animais dos grupos controles apresentaram um aumento do peso corpóreo (gráfico 1C).

Gráfico 1. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão (A) do consumo de ração por dia, (B) do consumo de proteínas por dia e (C) da variação de peso dos animais dos grupos **controles** (n=20 animais) e **desnutridos** (n=27 animais) que receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para $p \leq 0,05$. ** Valores significativos para $p \leq 0,01$. *** Valores significativos para $p \leq 0,001$.

5.3. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA SÉRICA E PRÉ ALBUMINA

Camundongos Balb/c submetidos as rações hipoprotéicas apresentaram valores séricos de proteínas totais, albumina, pré-albumina significativamente menores que os animais dos grupos controles (tabela 2), caracterizando o quadro de desnutrição protéica.

Tabela 2. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão de proteínas totais, albumina e pré-albumina dos animais dos grupos controles e desnutridos.

Parâmetros	Controle	Desnutrido
Proteínas totais (g/dL)	5,49 $\pm$ 0,19	4,22 $\pm$ 0,25**
Albumina (g/dL)	2,22 $\pm$ 0,07	1,95 $\pm$ 0,08*
Globulina (g/dL)	3,26 $\pm$ 0,21	2,26 $\pm$ 0,23**
Pré-albumina (mg/dL)	11,21 $\pm$ 0,12	5,41 $\pm$ 0,20**

Os animais dos grupos controles (n=20 animais) e desnutridos (n=27 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para $p \leq 0,05$. ** Valores significativos para $p \leq 0,01$.

5.4. HEMOGRAMA

5.4.1. Leucograma

A avaliação do leucograma compreendeu a contagem total de leucócitos e diferenciação dessas células. Os animais submetidos à dieta 2% de proteína, quando comparados aos animais dos grupos controles, apresentaram leucopenia com linfopenia e neutropenia absolutas estatisticamente significativas (gráfico 2). Eosinófilos e basófilos, raramente foram observados.

Gráfico 2. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão do número absoluto de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos (/mm³) e da contagem diferencial das células leucocitárias dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=20 animais) e desnutridos (n=27 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para $p \leq 0,05$. *** Valores significativos para $p \leq 0,001$.

5.4.2. Eritrograma

Com a dieta hipoprotéica os animais apresentaram-se anêmicos, ou seja, redução significativa de eritrócitos totais, hemoglobina e hematócrito em relação ao grupo controles (gráfico 3).

Gráfico 3. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão do número de eritrócitos da dosagem de hemoglobina e do volume do hematócrito dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=20 animais) e desnutridos (n=27 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para $p \leq 0,05$. ** Valores significativos para $p \leq 0,01$.

5.4.3. Plaquetas

Os animais desnutridos não diferem dos grupos controles na contagem total de plaquetas em relação ao grupo controles (gráfico 4).

Gráfico 4. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da contagem total de plaquetas dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=20 animais) e desnutridos (n=27 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II.

5.5. CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E MIELOGRAMA

Animais desnutridos apresentaram redução significativa na contagem de células totais da MO se comparados com grupos controles (gráfico 5), demonstrando que a desnutrição protéica proporcionou uma hipoplasia medular, o que justificaria a bicitopenia periférica observadas no leucograma e eritrograma.

Gráfico 5. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da celularidade da medula óssea e contagem diferencial das células medulares dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=20 animais) e desnutridos (n=27 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para $p \leq 0,05$.

5.6. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA

Animais dos grupos controles apresentaram MO normocelular com predomínio da série granulocítica (figuras 2 e 4). Já os animais desnutridos apresentaram redução na celularidade total da MO, apresentando depleção em todas as linhagens hematopoéticas e os seios venosos apresentaram-se dilatados (figuras 3 e 5).

Figura 2. Fotomicrografia de corte histológico de medula óssea de animais dos grupos controles apresentando imagem panorâmica do tecido, mostrando tecido normocelular com população heterogênea de células em diferentes estágios de maturação (H/E, 4x).

Figura 3. Fotomicrografia de corte histológico de medula óssea de animais dos grupos desnutridos apresentando imagem panorâmica do tecido, evidenciando-se medula óssea hipocelular com comprometimento das linhagens hematopoéticas, presença de lagos medulares determinados pela dilatação da luz dos vasos sinusais (H/E, 4x).

Figura 4. Fotomicrografia de corte histológico de medula óssea de animais dos grupos controles apresentando imagem do tecido, mostrando distribuição da população de polimorfonucleados (H/E, 10x).

Figura 5. Fotomicrografia de corte histológico de medula óssea de animais dos grupos desnutridos apresentando imagem do tecido, evidenciando-se hipocelularidade (H/E, 10x).

5.7. DIFERENCIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CTMs

A células depois de isoladas da MO foram submetidas a diferenciação para adipócitos, condrócitos e osteoblastos sendo que as células isoladas de ambos os grupos apresentaram capacidade de diferenciação.

Após a terceira passagem as células foram tripsinizadas e submetidas à análise imunofenotípica. Nossos resultados evidenciaram populações de células em ambos os grupos com marcação positiva para CD90, CD271, Sca1, CD49e, CD13, baixa marcação para CD34 e negativa para CD14, CD45 (gráficos 6, 7 e 8).

Os resultados encontrados demonstram que as células isoladas possuem características imunofenotípicas compatíveis com as das CTMs, tanto nos animais dos grupos controles como desnutridos. A marcação para CD49e foi mais evidente no grupo desnutrido quando comparado com o respectivo controle.

Gráfico 6. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da imunofenotipagem da população total de CTMs dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=5 animais) e desnutridos (n=5 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. A aquisição de 104 células foi realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm, FACS Calibur – Becton Dickinson. * Valores significativos para $p \leq 0,05$.

Gráfico 7. Imunofenotipagem da população total de CTMs dos grupos controles. A aquisição de 10^4 células foi realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm, FACS Calibur – Becton Dickinson. A imunofenotipagem mostra a região selecionada da população celular não marcada com fluorocromos. SSC na ordenada vs. FCS na abscissa. Dispersão lateral (side scatter channel – SSC – ângulo reto de 90°) e Dispersão frontal (forward scatter channel – FSC – ângulos pequenos $0,5$ a $1,0^\circ$). A partir da região selecionada os resultados do CD34, CD45, CD14, CD13, CD90, CD271, Sca1, CD49e foram expressos em histogramas. Os valores referem-se à porcentagem de eventos marcados em relação ao “gate” selecionado. Resultado de um experimento representativo de cinco experimentos independentes.

Gráfico 8. Imunofenotipagem da população total de CTMs dos grupos desnutridos. A aquisição de 10^4 células foi realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm, FACS Calibur – Becton Dickinson. A imunofenotipagem mostra a região selecionada da população celular não marcada com fluorocromos. SSC na ordenada vs. FCS na abscissa. Dispersão lateral (side scatter channel – SSC – ângulo reto de 90°) e Dispersão frontal (foward scatter channel – FSC – ângulos pequenos $0,5$ a $1,0^\circ$). A partir da região selecionada os resultados do CD34, CD45, CD14, CD13, CD90, CD271, Sca1, CD49e foram expressos em histogramas. Os valores referem-se a porcentagem de eventos marcados em relação ao “gate” selecionado. Resultado de um experimento representativo de cinco experimentos independentes.

5.8. CONTAGEM DE CFUS

A quantificação de colônias com mais de 50 células fibroblastóides foi realizada em microscópio de contraste de fase. As unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) foram quantificadas no 14º dia de cultivo (figura 6). Não observamos diferenças estatísticas entre os grupos (gráfico 9 e 10).

Figura 6. Fotomicrografia das culturas de CTM. (A) grupo controle com aumento de 10X; (B) grupo controle com aumento de 20X; (C) grupo desnutrido com aumento de 10X; (D) grupo desnutrido com aumento de 20X.

Figura 7. Fotomicrografia da caracterização morfológica das CTMs. (A) CTMs de animal controle, aumento de 100x e (B) CTMs de animal controle, aumento de 400x, (C) CTMs de animal desnutrido, aumento de 100x e (D) CTMs de animal desnutrido, aumento de 400x. As células a partir da 3ª passagem começam a perder a aparência fibroblastóide e aumentar significativamente o tamanho do citoplasma. No grupo desnutrido (D, seta) observa-se mais frequentemente formação de uma estrutura afilada e azurófila. Coloração May-Grünwald Giemsa modificado por Rosenfeld (aumento 100x). Amostra representativa de cinco experimentos independentes.

Gráfico 9. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da quantificação das unidades formadoras de colônias fibroblastóides de CTMs dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=6 animais) e desnutridos (n=6 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II.

Gráfico 10. Resultados em valores médios da porcentagem de confluência a partir do plaqueamento de 1×10^6 célula/mL dos animais dos grupos controles e desnutridos que receberam, respectivamente, ração I e a ração II. Não foi observada diferença estatística, entre os grupos, em todos os tempos avaliados.

5.9. QUANTIFICAÇÃO DOS FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM CTMs

5.9.1. Avaliação da expressão de fatores de transcrição CEBP α , PPAR γ

Os fatores de transcrição relacionados à adipogênese: CEBP α , PPAR γ total e PPAR γ fosforilado foram avaliados por western blot.

Para a expressão de CEBP α em culturas de Células Tronco Mesenquimais de animais desnutridos observou-se que estes animais não diferem dos grupos controles (gráfico 11). Avaliando a expressão de PPAR γ total e fosforilado neste modelo experimental, foi constatado que grupo desnutrido apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada com o grupo controle para PPAR γ total e que não apresenta diferença estatisticamente significativa para PPAR γ fosforilado se comparado ao grupo controle (gráfico 12).

Gráfico 11. Resultados da média $\pm$ o erro padrão da quantificação de CEBP α em cultura de Células Tronco Mesenquimais dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=10 animais) e desnutridos (n=12 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II.

Gráfico 12. Resultados da média $\pm$ o erro padrão da quantificação de PPAR γ total e PPAR γ fosforilado (p-PPAR γ) em cultura de Células Tronco Mesenquimais dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=10 animais) e desnutridos (n=12 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para $p \leq 0,05$.

5.9.2. Avaliação da expressão de fatores de transcrição Osterix, RUNX2 e Sox9

Para a avaliação da expressão de fatores relacionados a osteogênese e condrogênese foram quantificados por Western Blot os fatores de transcrição Osterix, RUNX2 e Sox9.

A expressão de Osterix e Sox9 não apresentou diferenças estatisticamente significativas quando comparado o grupo desnutrido com controles (gráfico 13). Avaliando o **gráfico 14** da expressão de RUNX2 em Células Tronco Mesenquimais de animais desnutridos, pode-se observar que a desnutrição protéica aumentou significativamente a expressão deste fator de transcrição quando comparado ao grupo controle.

Gráfico 13. Resultados da média $\pm$ o erro padrão da quantificação de Osterix e Sox9 em cultura de Células Tronco Mesenquimais dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=10 animais) e desnutridos (n=12 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II.

Gráfico 14. Resultados da média $\pm$ o erro padrão da quantificação de RUNX2 em cultura de Células Tronco Mesenquimais dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=10 animais) e desnutridos (n=12 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. * Valores significativos para $p \leq 0,05$.

5.9.3. Avaliação da expressão de fatores de transcrição NFκB total e fosforilado

As culturas de Células Tronco Mesenquimais de animais desnutridos não apresentam alterações significativas na expressão de NF-κB total e NF-κB fosforilado em relação grupo controle (gráfico 15).

Gráfico 15. Resultados da média $\pm$ o erro padrão da quantificação de NFκB total e NFκB fosforilado (p-NFκB) em cultura de Células Tronco Mesenquimais dos animais dos grupos controles e desnutridos. Os animais dos grupos controles (n=10 animais) e desnutridos (n=12 animais) receberam, respectivamente, a ração I e a ração II. n representa o número de animais avaliados.

5.10. DOSAGEM DE CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO NAS CULTURAS DE CTMs

A partir das culturas de Células Tronco Mesenquimais, foi coletado o sobrenadante para a quantificação de citocinas e fatores de crescimento que são produzidas por estas células e possuem capacidade de atuar sobre a complexa cascata de regulação da hematopoese.

5.10.1. Quantificação de SCF e IL-3 nas culturas de CTMs

Nos resultados apresentados no **gráfico 16** observa-se que os sobrenadantes obtidos de animais dos grupos desnutrido não apresentaram diferença significativa em nenhum dos dias avaliados se comparado ao grupo controle, porém em relação à cinética de produção, avaliando a área sob a curva, pode-se observar que animais desnutridos apresentaram significativamente maior capacidade de produção de SCF quando comparados com animais dos grupos controles.

Em relação à interleucina 3 o grupo desnutrido não apresentou diferença significativa em nenhum dos dias avaliados, bem como na concentração final, quando avaliado área sob a curva e comparado aos animais do grupo controle (gráfico 17).

Gráfico 16. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de SCF produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4) no 3º, 7º e 14º dia e resultado da área sob a curva, em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de SCF produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4).

Gráfico 17. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de IL-3 produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4) no 3º, 7º e 14º dia e resultado da área sob a curva, em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de IL-3 produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 3) e desnutridos (n= 3).

5.10.2. Quantificação de GM-CSF e G-CSF nas culturas de CTMs

Os animais submetidos à desnutrição protéica não apresentaram diferenças significativas em relação à produção de GM-CSF. Entretanto, avaliando a cinética de produção observa-se que animais desnutridos apresentam uma área sob a curva inferior aos animais controles, concluindo que em 14 dias, as culturas de Células Tronco Mesenquimais dos animais desnutridos apresentam menor capacidade de produzir GM-CSF quando comparado com animais dos grupos controles (gráfico 18).

Assim como GM-CSF, os animais dos grupos desnutridos só diferiram significativamente na área sob a curva, apresentando menor capacidade de produzir GM-CSF quando comparado com animais dos grupos controles (gráfico 19).

Gráfico 18. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de GM-CSF produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4) no 3º, 7º e 14º dia e resultado da área sob a curva, em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de GM-CSF produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4).

Gráfico 19. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de G-CSF produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4) no 3º, 7º e 14º dia e resultado da área sob a curva, em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de G-CSF produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4). * Valores significativos para $p \leq 0,05$.

5.10.3. Quantificação de $TNF-\alpha$, $IL-1\alpha$ e $IL-6$ nas culturas de CTMs

Avaliando-se a capacidade de CTMs produzir $TNF-\alpha$ observamos que células de animais dos grupos desnutridos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparada com células de animais dos grupos controles (gráfico 20). Em relação à

capacidade de produção de IL-1 e IL-6 encontramos resultados semelhantes à produção de TNF- α onde não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos avaliados (gráfico 21 e 22).

Gráfico 20. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de TNF- α produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4) no 3º, 7º e 14º dia e resultado da área sob a curva, em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de TNF α produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4).

Gráfico 21. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de IL-1 α produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4) no 3º, 7º e 14º dia e resultado da área sob a curva, em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de IL-1 α produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles (n= 4) e desnutridos (n= 4).

Gráfico 22. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de IL-6 produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles ($n=4$) e desnutridos ($n=4$) no 3º, 7º e 14º dia e resultado da área sob a curva, em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de IL-6 produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles ($n=4$) e desnutridos ($n=4$).

5.10.4. Quantificação de TGF- β nas culturas de CTMs

Avaliando-se a capacidade de CTMs produzir TGF- β não observamos diferenças estatisticamente significativas, em nenhum dos dias avaliados nem na área sob a curva, quando comparado animais dos grupos desnutridos com animais dos grupos controles (gráfico 23).

Gráfico 23. Resultados em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de TGF- β produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles ($n=4$) e desnutridos ($n=4$) no 3º, 7º e 14º dia e resultado da área sob a curva, em valores médios $\pm$ o erro padrão da concentração de TGF- β produzido por Células Tronco Mesenquimais de camundongos dos grupos controles ($n=4$) e desnutridos ($n=4$).

6. DISCUSSÃO

A desnutrição, nos mais variados graus, ainda constitui sério problema de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento, porém não está restrita a estes, apresentando elevados índices de mortalidade e morbidade (SCHOFIELD; ASHWORTH, 1996; WHO, 2000).

Nas últimas décadas tenta-se compreender a inter-relação doença-desnutrição e, embora muitos conhecimentos tenham sido obtidos, os mecanismos envolvidos em seu todo, ainda estão por serem esclarecidos. A literatura contém dados obtidos tanto em seres humanos – abrangendo crianças e adultos; indivíduos originários de locais onde a fome é endêmica e indivíduos voluntariamente desnutridos; pessoas hospitalizadas – onde frequentemente associam-se processos inflamatórios e/ou infecciosos das mais diversas origens; indivíduos desnutridos, onde múltiplas deficiências nutricionais estão presentes ou ainda, em pacientes com doenças sistêmicas crônicas, nas quais os efeitos da doença e da terapia são difíceis de serem distinguidos daqueles devidos à deficiência nutricional.

A experimentação em animais também apresentam um universo de situações: diferenças entre as espécies, isogenicidade ou não das espécies, sexo, idade, tipos e formas de desnutrição e os mais variados estímulos infecciosos. Dessa forma, torna-se muitas vezes difícil definir o perfil de como a desnutrição influencia algumas das respostas do organismo originando assim, dados conflitantes na literatura. Estudos em animais experimentalmente desnutridos permitem o controle de variáveis como sexo, idade e a utilização de animais não inflamados e/ou infectados e camundongos definidos geneticamente são universalmente aceitos como o principal modelo para analisar e entender doenças humanas. Embora as diferenças físicas sejam óbvias, os genes entre camundongos e humanos são aproximadamente 99% idênticos (LINDER; DAVISSON, 2004).

Em nosso estudo, optamos por trabalhar com camundongos Balb/C, adultos e machos, visando maior uniformidade dos grupos, evitando-se as flutuações hormonais e, em decorrência, sua influência na cinética de células sanguíneas. Além disso, optou-se por animais adultos, devido à estabilização do sistema hematopoético, reduzindo-se, assim, a

interferência das modificações fisiológicas relacionados à idade na hematopoese (BANNERMAN, 1993).

Optamos pela indução de uma desnutrição protéica devido a sua elevada endemicidade em países em desenvolvimento e que não coincidentemente, são as áreas em que predominam doenças infecciosas e altos índices de mortalidade. Também a desnutrição protéica e protéico-energética são as formas mais frequentes de desnutrição em pacientes hospitalizados e submetidos à alimentação parenteral, pacientes portadores de neoplasias ou doenças crônicas, pacientes sob quimioterapia ou ainda indivíduos que fazem dietas radicais (WAITZBERG et al., 1999; MARCOS, 2000; BRUNDTLAND, 2000; GADDUCCI et al., 2001; AKNER et al., 2001; NOVA et al., 2002; KEUSCH, 2003).

Neste modelo de desnutrição as rações 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 da ração ofertada (ração hipoprotéicas) (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997). A dieta é um dos mais importantes fatores na experimentação animal. A dieta controle e hipoprotéica foram preparadas em nosso laboratório de acordo com Instituto Americano de Nutrição, AIN 93M sendo as rações isocalóricas.

Na elaboração das rações utilizamos caseína, proteína de alto valor biológico. Em nosso estudo os camundongos que receberam a dieta deficiente em proteínas (ração hipoprotéicas, contendo 2% de proteínas), *ad libitum*, consumiram menor quantidade de proteínas, determinando uma significativa perda de peso. A perda de aproximadamente 20% do peso corpóreo inicial pelos animais dos grupos desnutrido, associados aos valores do hemograma, da concentração de proteínas totais e da albumina e pré-albumina séricas, mostraram-se como bons indicadores na avaliação da desnutrição protéica.

Em relação aos dados hematológicos os animais desnutridos apresentaram redução quantitativa e significativa tanto no compartimento periférico quanto central. Em suma, os animais desnutridos apresentaram anemia e leucopenia importantes, com comprometimento medular, no qual observamos importante hipoplasia. Em estudos anteriores, do nosso grupo (BORELLI; MARIANO; BOROJEVIC, 1995; BORELLI et al., 2007; XAVIER, 2007,

BLATT, 2004), ficou demonstrado que a leucopenia e a anemia estão associadas a uma hipolasia medular e esplênica especialmente importante no setor mielóide.

Segundo Borelli et al. (2007) a anemia encontrada no nosso modelo de desnutrição protéica não é devido à deficiência de ferro, pois ferro sérico, saturação de transferrina e ferritina na MO, fígado e baço estão aumentadas nestes animais. Reissman, 1964, sugeriu que a anemia era proveniente de uma menor síntese protéica nas células eritróides e/ou redução na síntese de eritropoetina, enquanto Aschkenasy, 1975, mostrou em ratos uma diminuição de eritropoetina devido à menor ingestão de proteínas. Dados do nosso grupo utilizando administração de eritropoetina *in vivo* demonstram que a anemia instalada na desnutrição protéica não é revertida, sugerindo alterações celulares nos precursores desta linhagem: diminuição no número de células tronco, alterações no tamanho do *pool* de células precursoras comissionadas para diferenciação e/ou alterações nos receptores ou no número de receptores necessário para a ligação da eritropoietina, desencadeando a indução dos mecanismos transducionais (BORELLI et al., 2009)

Leucopenia e leucocitose são situações descritas na literatura em processos de desnutrição, especialmente em seres humanos, visto encontrar-se geralmente acompanhada de processos infecciosos ou de doenças crônicas (ROSEN et al., 1974; GROSS et al., 1980). Os primeiros relatos sobre leucopenia em desnutrição protéica devem-se a Aschkenasy (1957) e a Kornberg et al., (1946). Embora a resposta leucocitária seja variável, as evidências indicam que situações em que a desnutrição não esteja associada a outras doenças, a leucopenia é a regra (ASCHKENASY, 1966). Dietas hipoprotéicas ou com composição inadequada de aminoácidos têm efeito neutropênico (ASCHKENASY, 1966) e eosinopênico (KAMPSCHMIDT et al., 1977). A aparente dificuldade da resposta leucocitária em infecções bacterianas em desnutrição protéica seria devido à redução no compartimento de reserva da MO e não à dificuldade primária no processo de mobilização dos leucócitos do sangue para os tecidos (CHANDRA et al., 1975). Entretanto, os dados sobre a mobilização celular também são divergentes (GOYAL et al, 1981).

A desnutrição produz vários efeitos celulares. Alguns desses resultados estão relacionados com a perda ou redução da proliferação celular em vários órgãos internos (ORTIZ; BETANCOURT, 1984). Tecidos com altas taxas de renovação celular em indivíduos desnutridos apresentam comprometimento da proliferação celular (DEO; MATHUR; RAMALINGASWAMI, 1967; DEO; RAMALINGASWAMI, 1970).

Os órgãos hematopoéticos têm capacidade de aumentar produção e acelerar a maturação de uma ou várias populações de células, como mecanismo de adaptação a condições fisiológicas ou patológicas. O tecido hematopoético apresenta alta taxa de proliferação e renovação celular e, conseqüentemente, elevado consumo, o que o torna susceptível a alterações em condições de desnutrição (LORENZI, 2006).

Segundo Winick e Noble, 1966, células de animais desnutridos apresentam redução da quantidade de DNA, RNA e proteínas. Sabe-se que estes componentes são essenciais para a proliferação celular e, portanto, alterações hematológicas como pancitopenia e hipoplasia medular na desnutrição protéica podem ser justificadas por deficiência protéica no processo de renovação celular. Gómez e colaboradores, em 1996, mostraram que células provenientes da MO de ratos desnutridos apresentaram um aumento na duração do ciclo celular. Dados do nosso grupo demonstraram que as células progenitoras de animais desnutridos apresentam uma parada maturativa, evidenciada por número elevado de células em fase G0/G1 do ciclo celular (BORELLI et al., 2009).

De acordo com Stohlman (1972), Borelli et al., (2007) a atrofia medular pode ser resultante de alterações da célula tronco ou defeitos em células estromais os quais alterariam o microambiente hematopoético. Vituri et al., (2000) encontraram hipoplasia medular e esplênica com alterações estruturais no microambiente. Assim, somando alterações evidenciadas em diferentes estudos com animais desnutridos podemos sugerir que hipoplasia medular presentes nestes animais pode ser decorrente de alterações em células tronco/progenitoras acrescidas de alterações no microambiente medular já que temos uma pancitopenia periférica.

Para avaliação do microambiente medular, isolamos e cultivamos Células Tronco Mesenquimais de animais desnutridos. As culturas de CTM são bem estabelecidas a partir de MO, sangue de cordão umbilical, trabécula óssea, periósteo, sinóvia, placenta, pâncreas, tecido adiposo, pele, pulmão, e timo (MUSINA; BEKCHANOVA; SUKHIKH, 2005). Sendo que a medula óssea é vista como a mais rica reserva de CTM, porém suas características apresentam resultados conflitantes, fenotipicamente ainda não há um marcador específico ou uma combinação destes que identifiquem esta célula *in vivo* ou *ex vivo*. Assim, as CTM atualmente são definidas por uma combinação de critérios físicos, morfológicos, fenotípicos e propriedades funcionais (JAVAZON et al., 2004). Sendo atualmente aceito para caracterizá-

la: a) capacidade de aderência ao plástico nas condições usuais de cultivo; b) expressão antigênica para os antígenos CD105, CD73, CD90, CD13, CD49e, CD271 e $\leq 2\%$ (ausência de expressão) para os antígenos CD45, CD34 e CD14; c) diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrócitos (DOMINICI et al., 2006; KUÇI et al., 2010; LI; WU, 2011).

Nossos resultados demonstraram que as células isoladas classicamente pela metodologia descrita por Friedenstein et al. (1976) e popularizada por Caplan (1991), a qual utiliza a propriedade física de aderência ao plástico apresentaram capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condrócitos e na citometria de fluxo apresentaram marcação positiva para CD90, CD271, CD49e, CD13 e Sca-1, baixa marcação para CD34 e marcação negativa para CD45 e CD14, demonstrando que o isolamento de CTMs foi efetivo, por não observarmos quantidade significativas de células hematopoéticas.

As culturas apresentaram morfologia heterogênea, contendo células que variaram desde células fibroblastóides afiladas e pontiagudas, a células largas e poligonais como descrito por Javazon et al. (2004). Em relação à fase de crescimento e expansão não observamos diferenças significativas entre os grupos. Entretanto as células obtidas de animais desnutridos apresentaram uma maior tendência em formar CFU-F em 14 dias. Analisando-se as colônias individualmente, nota-se a heterogeneidade da população em cultura relacionada à taxa de proliferação e à morfologia.

A taxa de proliferação celular está relacionada ao tempo de cultura para se obter a confluência. Culturas de tecido adiposo, timo e pele atingem a confluência num período de 10 dias, enquanto CTM obtidas de MO e placenta são necessários 2- 4 semanas, pois se dividem mais lentamente. O tecido com menor taxa de proliferação são células do sangue de cordão umbilical aonde uma monocamada só é obtida após 2 meses (MUSINA; BEKCHANOVA; SUKHIKH, 2005).

As três fases da cinética de expansão celular, tanto nos grupos desnutridos como controles, foram claramente percebidas durante o cultivo. Durante a fase inicial, aproximadamente três dias de cultivo, o crescimento celular foi muito lento e, à microscopia de luz, foram visualizadas poucas células aderidas. Dessa maneira as células não aderentes foram removidas após 3 dias de cultivo. Também foram trocados os meios de cultura em sua totalidade nos dias 7 e 14.

Sabe-se que a proliferação e diferenciação de progenitores hematopoéticos e estromais assim como a sobrevivência destas células podem ser induzidas pela combinação de um grupo heterogêneo de glicoproteínas denominado citocinas. Essas proteínas podem ter efeitos endócrinos, parácrinos e autócrinos. Algumas exercem efeito ativador e, ou de proliferação (como por exemplo, o GM-CSF, G-CSF e SCF), enquanto outras aparentemente apresentam efeito inibitório sobre a proliferação hematopoética (TNF- α e IFN- γ , por exemplo). As citocinas podem pelo ao menos, *in vitro*, ser produzidas por diversos componentes do microambiente hematopoético, exercendo seus efeitos por meio de ligação a receptores específicos associados à membrana celular (LORENZI, 2006).

Acredita-se que o microambiente indutivo possa controlar a hematopoese pela produção e secreção local dessas citocinas pelas células do estroma, co-localização de citocinas para a célula tronco nos locais de contato célula-célula e, ou célula-matriz extracelular ou ainda, por estímulo direto pelo contato celular (RIOS; WILLIAMS, 1990; METCALF, 1992; OPAS, 1994).

Quanto à produção de citocinas em condições de desnutrição não há consenso na literatura. Bradley et al. (1990) encontraram concentrações normais para IL-1 e TNF- α em mulheres desnutridas, Vaisman e Hahn (1991) observaram aumento da síntese de TNF- α em pacientes anoréticos e em pacientes com grau severo de subnutrição, enquanto Doherty et al. (1994) encontrou uma redução na produção de TNF- α em cultura de macrófagos estimulados com LPS (lipopolissacarídeo) obtidos de crianças malnutridas. Anstead et al. (2003) investigaram a síntese de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos residentes em líquido peritoneal em um modelo de camundongos malnutridos e observou menos TNF- α , IL-10 e NO; mais IL-6 e níveis equivalentes de IL-1 α após estímulo com INF- γ e LPS.

No nosso grupo de pesquisa, Fock, et al. (2007) demonstraram que macrófagos de animais desnutridos apresentam comprometimento na produção de TNF- α , IL-1 α e IL-6 e Nakajima (2010) demonstrou a partir da cultura de CFU-F, uma diminuição em IL-6, IL-3, GM-CSF e IL-10. Evidências tem indicado que CTMs são capazes de suportar a expansão e diferenciação de CTH, por produzir fatores de crescimento e citocinas que fazem partes das vias de sinalização e regulação de CTHs. Estes fatores de crescimentos e citocinas já identificados são: CXCL12, SCF, TPO, IL-6, M-CSF, TNF- α e TGF- β (LI; WU, 2011). As Células Tronco Mesenquimais apresentam características imunossupressoras e é possível que

suas funções supressoras possam sofrer alterações de acordo com seu microambiente. A função imunossupressora de CTMs pode ser mediada por fatores solúveis ou através do contato células-células (ABUMAREE et al., 2011). Entre os diversos fatores solúveis, SCF, IL-6, IL-10, IL-8, IL-12, VEGF, M-CSF, TGF- β são produzidas nas culturas de CTMs (JIANG et al., 2005; NAUTA, 2006; DJOUAD et al, 2007; ABUMAREE et al., 2011).

Nesse trabalho, os nossos experimentos, não demonstraram diferenças significativas na produção de IL-3, IL-6, IL-1 α , TNF- α e TGF- β em culturas de CTMs de animais desnutridos quando comparado com os respectivos controles. Já para fatores de crescimento celular observamos que CTMs de animais controles e desnutridos, *in vitro*, apresentaram cinética de síntese de SCF, G-CSF e GM-CSF similares, porém quando analisamos a área sob a curva, observamos que células de animais desnutridos apresentam maior capacidade de sintetizar SCF e menor capacidade em sintetizar G-CSF e GM-CSF, sendo esse mais um dos possíveis mecanismos que poderiam explicar, em um primeiro momento, a tentativa de expansão celular medular as custas do aumento de SCF, uma vez que o aumento de SCF pode ocorrer como estímulo para CTH que se encontra parada no ciclo em situação de desnutrição (BORELLI et al., 2009) e a diminuição do G-CSF e GM-CSF poderiam explicar principalmente o comprometimento do setor mielóide comumente observado em situações de desnutrição (BORELLI et al., 2007, 2009), uma vez que esses fatores de crescimento atuam na proliferação e diferenciação de células progenitoras hematopoéticas mais diferenciadas.

Bernstein et al. (1991), mostraram que a falta de SCF produzido por células assessorias ou a falta de receptores para este fator de crescimento em CTHs provoca falência hematopoética, indicando que CTMs possuem um papel essencial na função do nicho hematopoético (LI; WU, 2011). SCF e ligante Flt-3 estão envolvidos na manutenção da proliferação e auto renovação de CTHs e regulação da hematopoese (MISHIMA et al., 2010; LI; WU, 2011).

Algumas citocinas podem atuar no processo de diferenciação e proliferação celular de CTMs. TNF- α é um regulador da diferenciação em osteoblasto, mas os efeitos deste na diferenciação osteogênica são ainda controversos (CHO, 2010; LI; STASHENKO, 1992; TSUKAHARA et al., 2006; LI et al., 2007). Cho et al. (2010), demonstraram que o TNF- α aumenta a mineralização das CTMs aumentando a expressão da fosfatase alcalina, do RUNX2 e da osteopontina. Nessa mesma linha de pensamento Tokawa et al. (2005),

demonstraram que a IL-1 e o TNF- α inibem a adipogênese por ativar vários transdutores de sinais, entre eles, NF- κ B via sinalização TAK-1 (TGF- β ativado por kinase 1)/ TAB-1. Entretanto Ding et al. (2009) reportaram efeitos contrários aos reportado por Cho et al. (2010), dessa forma Ding et al. (2009) observaram que a IL-1 e o TNF- α inibem a diferenciação de osteoblastos, uma vez que essas citocinas atuam diminuindo os níveis de RUNX2.

No nosso trabalho não encontramos diferenças estatisticamente significativa na quantificação de TNF- α , IL-1 α e IL-6, apesar de existir uma tendência de células de animais desnutridos produzirem maior quantidade de IL-1 α . Entretanto a expressão de NF- κ B, tanto total como fosforilado, não apresentaram diferenças entre os grupos estudados. Segundo Kosaka et al. (2000) o aumento da expressão de NF- κ B está correlacionada com o aumento do RUNX2 e diminuição de PPAR γ , sugerindo que a ativação de NF κ B pode aumentar a diferenciação em osteoblastos.

Tokawa et al. (2005) mostraram que NF κ B aparenta interagir diretamente com o domínio de DNA ligante de PPAR γ , bem como com o domínio AF-1 A/B ligante de PGC-2 (PPAR gamma coactivator-2), resultando num bloqueio da ligação do gene alvo do DNA com heterodímeros PPAR γ /RXR.

O link entre a formação da MO e o desenvolvimento ósseo demonstra que o aumento de osteoblastos esta correlacionado diretamente com o número funcional de CTHs, indicando que osteoblastos são essenciais no nicho hematopoético, e evidencias morfológicas mostram que CTHs estão próximas ao endóstio na região trabecular de ossos longos, enquanto que progenitores mais diferenciados estão próximos da região central da MO (WILSON; TRUMPP, 2006). Durante a diferenciação em osteoblasto o fator de transcrição RUNX2 tem importante papel no comprometimento de CTMs para a linhagem osteoblástica (KOMORI, 2006) sendo um regulador positivo que pode estimular a expressão gênica de proteínas envolvidas na matriz óssea incluindo Colla1, Colla2, Spp1, Ibsp, Bglap e fibronectina 1 (DUCY et al., 1997, LEE et al., 2000; KOMORI, 2010). Nossos resultados demonstram que CTMs de animais desnutridos apresentam maior expressão de RUNX2, fato este que pode estar correlacionado com remodelamento do endóstio e com o aumento de proteínas de matriz como fibronectina, dados esses já demonstrados por nosso grupo (BORELLI et al., 2007, FAVERO, 2003; SILVA, 2011).

Experimentos *in vitro* com CTMs derivadas da medula óssea têm demonstrado que os fatores que induzem a adipogênese inibem a formação de osteoblastos, e vice-versa, envolvendo diferentes vias de sinalizações. Wnt 5a suprime PPAR γ em CTMs com indução concomitante de RUNX2 (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009) enquanto a sinalização por BMP é envolvida nos estágios precoces de diferenciação e é um importante determinante do comprometimento de CTMs com a linhagem de adipócitos. Vários membros de BMP são secretados por osteoblastos e regulam a massa óssea em ação autócrina ou parácrina induzindo diretamente a diferenciação de CTMs em osteoblastos e aumentando a função de osteoblastos na produção de matriz (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009). TAZ induz CTMs a diferenciarem-se na linhagem osteoblástica através da co-ativação da transcrição dependente de RUNX2 e repressão transcrição dependente de PPAR γ (HONG et al., 2005)

A ativação de fatores de transcrição como C/EBPs e o PPAR γ induzem o comprometimento das CTMs para a linhagem adipogênica (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009). Fatores agonistas da adipogênese como insulina, a isometilbutilxantina, a indometacina e os glicocorticóides são capazes de induzir ativação transcricional de muitos genes, entre eles o PPAR γ e C/EBP α (TAGAMI et al., 2003; AMORUSO et al., 2007). C/EBP α ativa diretamente vários genes adipogênicos necessários para o desenvolvimento de adipócitos maduros, incluindo PPAR γ (MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009) e a redução da expressão de C/EBP α acarreta em significativa diminuição do potencial adipogênico com diminuição também da expressão de PPAR γ , os quais são reversíveis com a adição de PPAR γ . Entretanto, células que não expressam PPAR γ não possuem potencial adipogênico, sugerindo que C/EBP α promove adipogênese PPAR γ dependente (RMAJI; FOKA, 2002; MURUGANANDAN; ROMAN; SINAL, 2009).

O PPAR γ possui um papel crítico na regulação da diferenciação do adipócito, estimulando a transcrição de muitos genes específicos dessa célula, assim como os passos iniciais da adipogênese. Mudanças no número de adipócitos ocorrem mediante um complexo arranjo de eventos que envolvem proliferação e diferenciação de pré-adipócitos provenientes das CTMs. Fatores de transcrição adipogênicos, entre eles o PPAR γ desempenham importantes funções na complexa cascata transcricional que ocorre durante a adipogênese

(TONTONNOZ; HU; SPIEGELMAN, 1995; KLETZIEN et al., 1992, KRALISCH et al., 2007).

Nos nossos resultados observamos que, CTMs isoladas da MO de animais desnutridos apresentaram maior expressão de PPAR γ quando comparados ao grupo controle, indicando um possível aumento no potencial adipogênico. Quando analisamos a expressão de RUNX2 e PPAR γ observamos em CTMs de animais desnutridos um aumento da expressão de ambos os fatores quando comparados com animais controles.

Conforme a literatura, o aumento da adipogênese, ativação de PPAR γ , está relacionado com a diminuição da osteogênese, inibição de RUNX2 (BERESFORD et al., 1992; DUQUE 2008; LIU et al., 2010; WAN, 2010), fato este que pode ocorrer na desnutrição aonde temos uma CTH alterada com diminuição da hematopoese (BORELLI et al., 2009) e uma possível reconstituição da MO vermelha por amarela, sendo este um processo dinâmico e reversível (NAVEIRAS et al., 2009).

Dessa forma, o encontro desses resultados nos levou a levantar duas hipóteses: a primeira seria que apesar de os protocolos de isolamento para CTMs estarem de acordo com a literatura, existiria a possibilidade de estarmos trabalhando com populações não homogêneas, dificuldade essa de difícil resolução, uma vez que não existem marcadores específicos para o isolamento e caracterização de CTMs; a segunda seria que a desnutrição por si própria, poderia estar influenciando o aumento tanto da expressão de PPAR γ quanto RUNX2, porém com uma maior expressão de PPAR γ em relação ao RUNX2.

Assim, poderíamos relacionar que na desnutrição protéica as CTMs na MO apresentam um maior favorecimento para a diferenciação adipogênica em relação a osteoblástica, porém se comparadas as CTMs de animais desnutridos com controles encontraremos uma maior capacidade tanto de diferenciação adipogênica como osteoblástica.

O aumento da expressão de PPAR γ estaria influenciando adipogênese e consequentemente a hematopoese, vindo de encontro com dados do nosso grupo, aonde observamos uma CTH alterada com comprometimento da hematopoese (BORELLI, et al., 2009) e com Naveiras et al. (2009) que demonstraram uma predominante influencia supressiva de adipócitos no microambiente medular sobre a hematopoese, regulando

negativamente o número e proliferação de CTHs. Ao mesmo tempo o aumento de RUNX2 estaria levando ao aumento de osteoblastos e favorecendo um remodelamento ósseo (AKUNE et al., 2004; BARAK et al., 2009; WAN, 2010) e consequentemente teríamos na MO de animais desnutridos, CTMs com aumento de RUNX2 para favorecer a osteogênese e um possível restabelecimento de hematopoese.

7. CONCLUSÕES

No nosso modelo experimental obtivemos animais desnutridos após a indução com ração 2% de caseína. Esses animais apresentaram alterações na hematopoese, sendo esta regulada por célula tronco hematopoética e microambiente medular.

Em relação ao microambiente medular constituído por células diferenciadas das Células Tronco Mesenquimais a partir da avaliação de fatores de transcrição e a presença de citocinas em culturas de Células Tronco Mesenquimais de animais desnutridos podemos concluir que:

- Há aumento significativo na presença de PPAR γ total e RUNX2 indicando uma alteração na presença de fatores de transcrição que estão envolvidos na etapa da diferenciação celular para formação de adipócitos, condrócitos e osteócitos.
- Estas células além da participação na formação do microambiente medular apresentam alterações na quantificação de citocinas: SCF, GM-CSF, G-CSF, em animais desnutridos que estão envolvidas na etapa de proliferação tanto quanto na diferenciação de células hematopoéticas na intenção de regular e modular e reestabelecer a MO.

Estes desequilíbrios observados parecem estar intimamente relacionados com alterações observados na hematopoese, já que juntos e ainda na presença de outros elementos constituem o microambiente medular e relacionam-se entre si.

REFERÊNCIAS

- ABUMAREE, M.; AL JUMAH, M.; PACE, R. A; KALIONIS, B. Immunosuppressive Properties of Mesenchymal. **Stem cell reviews**, 2011.
- AKNER, G., T. Treatment of protein-energy malnutrition in chronic nonmalignant disorders. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, p. 6-24, 2001.
- ALVES, D. C. Desnutrição. In: AUGUSTO, A. L. P.; ALVES, D. C.; MANNARINO, I. C., eds. **Terapia nutricional**. São Paulo: Atheneu, 1995. p. 220-229.
- AMORUSO, A.; BARDELLI, C.; GUNELLA, G.; FRESU, L. G.; FERRERO, V.; BRUNELLESCHI, S. Quantification of PPAR-gamma protein in monocyte/macrophages from healthy smokers and non-smokers: a possible direct effect of nicotine. **Life sciences**, v. 81, n. 11, p. 906-915, 2007.
- ANDERSEN, M. L.; ALMEIDA, V. D.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S. Camundongos. In: ANDERSEN, M. L.; ALMEIDA, V. D.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F.; MAGALHÃES, L. E.; TUFIK, S, eds. **Princípios étnicos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: Unifesp, 2004. cap. 4 p. 121-134.
- ANSTEAD, G. M.; CHANDRASEKAR, B.; ZHANG, Q.; MELBY, P. C. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network , nuclear factor- B activation , and nitric oxide production. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 74, n. 6, p. 982-91, 2003.
- ASCHKENASY, A. On the pathogenesis of anemias and leukopenias induced by dietary protein deficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 5, n. 1, p. 14-25, 1957.
- ASCHKENASY A. Influence of dietary protein deficiency on intestinal absorption and on the tissue distribution of absorbed Fe59 in male rats. Effects of erythropoietin injections. **Revue Française d'études Cliniques et Biologiques**, v. 1, n. 10, p. 1010-22, 1966.
- ASCHKENASY, A. Effect of a protein-free diet on lymph node and spleen cell response *in vivo* to blastogenic stimulants. **Nature**, v. 254, n. 5495, p. 63-65, 1975.
- AUGUSTO, A. P. Avaliação nutricional. In: AUGUSTO, A. L. P.; ALVES, D. C.; MANNARINO, I. C., eds. **Terapia nutricional**. São Paulo: Atheneu, 1995. p.28-34.
- AKUNE, T.; OHBA, S.; KAMEKURA, S.; YAMAGUCHI, M.; CHUNG, U. I.; KUBOTA, N.; TERAUCHI, Y.; HARADA, Y.; AZUMA, Y.; NAKAMURA, K.; KADOWAKI, T.; KAWAGUCHI, H. PPARgamma insufficiency enhances osteogenesis through osteoblast

formation from bone marrow progenitors. **The Journal of clinical investigation**, v. 113, n. 6, p. 846-855, 2004.

BACIGALUPO, A. Mesenchymal stem cells and haematopoietic stem cell transplantation. **Best Practice and Research. Clinical Haematology**, v. 17, n. 3, p. 387-99, 2004.

BANNERMAN, R. M. Hematology. In: FOSTER, H. L.; SMALL, J. D.; FOX, J. G. **The mouse in biomedical research: normative biology, immunology, and husbandry**. (American College of Laboratory Animal Medicine Series). New York: Academic Press, 1983. v.3, p.293-304.

BARAK, Y.; NELSON, M. C.; ONG, E. S.; JONES, Y. Z.; RUIZ-LOZANO, P.; CHIEN, K. R.; KODER, A.; EVANS, R. M. PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. **Molecular Cell**, v. 4, p. 585–595, 1999.

BARON, R. B. Desnutrição protéico-calórica. In: BENNETT, J. C.; PLUM, F., eds. **Cecil Tratado de Medicina Interna**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. v. 1, p. 1273-1277.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry Cell Biology**, v. 36, n. 4, p. 568-84, 2004.

BERNSTEIN, I. D.; LEARY, A. G.; ANDREWS, R. G; OGAWA, M. Blast colony-forming cells and precursors of colony-forming cells detectable in long-term marrow culture express the same phenotype (CD33- CD34+). **Experimental Hematology**, v. 19, n. 7, p. 680-682, 1991.

BLACK, R.; MORRIS, S.; BRYCE, J. Where and why are 10 million children dying every year? **Lancet**, v. 361, p. 2226–2234, 2003.

BLATT, S. L. **Efeito da desnutrição protéica experimental na hematopoese medular**. 2004. 215f. Dissertação de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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, n12, p. 1110-49. 1999. Review.

BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutrition Research**, v.15, n. 10, p. 1477-85, 1995.

- BORELLI, P.; BLATT, S. L.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A. Haematological alterations in protein malnutrition. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 1, p. 49-56, 2004.
- BORELLI, P.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; MAURINO, B. B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G.; FOCK, R. A. Reduction of erythroid progenitors in protein energy malnutrition. **The British The Journal of Nutrition**, v.97, n.2, p. 307-314, 2007.
- BORELLI, P.; BARROS, F. E. V.; 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. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.42, n. 6, p. 523-530, 2009.
- BRACH, M. A.; HERRMANN; F. Hematopoietic growth factors: interactions and regulation of production. **Acta Haematologica**, v. 86, n. 3, p.128-37, 1991.
- BRADLEY, S. F.; VIBHAGOLL, A.; FABRICK, S.; TERPENNING, M. S.; KAUFFMANN, C. A. Monokine production by malnourished nursing home patients. **Gerontology**, v.36, p. 165-170, 1990.
- BRUNDTLAND, G., H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. **Nutrition of Review**, v. 58, p. S1-S4, 2000.
- CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-50, 1991.
- CHANDRA, R. K. Food antibodies in malnutrition. **Archives of Disease in Childhood**, v. 50, p. 532-534, 1975.
- CHO H. H.; SHIN K.K.; KIM Y. J.; SONG J. S.; KIM J. M.; BAE Y. C.; KIM C. D.; JUNG J. S. NF-kappaB activation stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue by increasing TAZ expression. **Journal of Cellular Physiology**, v. 223, n. 1, p. 168-77, 2010.
- CHOI, K. Y.; LEE, S. W.; PARKMH, B. A. E. Y. C.; SHIN HI, N. A. M. S.; KIM, Y. J.; KIM, H. J.; RYOO, H. M. Spatio-temporal expression patterns of RUNX2 isoforms in early skeletogenesis. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 34, p. 426-433, 2002.
- 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.7, p. 3213-8, 2000.
- DE ANGELIS, R. C. **Fisiologia da nutrição**. 3. ed. São Paulo: Nobel, v. 2, 1986. p. 38-56

DEANS, R. J.; MOSELEY, A.B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Experimental Hematology**. v. 28, n. 8, p. 875-884, 2000.

DEO M. G.; MATHUR, M.; RAMALINGASWAMI, V. Cell regeneration in protein deficiency. **Nature**, v. 216, n. 5114, p. 499-500, 1967.

DEO, M. G.; RAMALINGASWAMI, V. Regulatory mechanisms of cellular proliferation in a protein-deficient organism. In: Wolstenholme, G. E. W.; Knight, J., eds. **Control Processes in Multicellular Organisms** London: Churchill, 1970. pp. 321-337

DE ONIS, M.; MONTEIRO, C.; AKRE, J.; GLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth. **Bulletin of the World Health Organization**. v. 71, n. 6 p. 703-712, 1993.

DE ONIS, M.; FRONGILLO, E. A.; BLÖSSNER, M. Is malnutrition declining? An analysis of changes in levels of child malnutrition since 1980. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 78, p. 1222- 1233, 2000.

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

DING, J.; GHALI, O.; LENCEL, P.; BROUX, O.; CHAUVEAU, C.; DEVEDJIAN, J. C.; HARDOUIN, P.; MAGNE, D. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. **Life Sciences**, v. 84, n. 15-16, p. 499-504, 2009.

DJOUAD, F.; CHARBONNIER, L. M.; BOUFFI, C.; LOUIS-PLENCE, P.; BONY, C.; APPARAILLY, F.; CANTOS, C.; JORGENSEN, C.; NOËL, D. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. **Stem cells**, v. 25, n. 8, p. 2025-32, 2007.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-7, 2006.

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

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

DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V.; RIDALL, A. L.; KARSENTY, G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell** v. 89, n. 5, p. 747-754, 1997.

EAVES, C. J.; CASHMAN, J. D.; EAVES, A. C. Methodology of long-term culture of human hematopoietic cells. **Methods in Cell Science**, v. 13, n. 2, p. 56-62, 1991.

EMERY, P. W. Metabolic changes in malnutrition. **Eyes**, v. 19, p. 1029-1034, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **The State of Food Insecurity in the World 2010**. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/013/i1683e/i1683e.pdf>. Acesso: 12 de Janeiro de 2011.

FAVERO, M. E. **Avaliação imuno-histoquímica e ultra-estrutural da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica**. 2003. Dissertação de Mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

FOCK R. A.; SILVA, O. P. P. S.; BORELLI, P. Desnutrição protéica modifica a síntese de óxido nítrico em macrófagos. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 3, p.115, 2003.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Experimental Hematology**, v. 4, n. 5, p. 267-74, 1976.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: Stem Cells and their niche. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 769-778, 2004.

GADDUCCI, A.; COSIO, S.; FANUCCHI, A.; GENAZZANI, A. R. Malnutrition and cachexia in ovarian cancer patients: pathophysiology and management. **Anticancer Research**, v. 21, p. 2941-2947, 2001.

GARCIA, P. B. **Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica: análise da mobilização celular e da hematopoese**. 1992. Tese de Doutorado- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica- Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.

GOYAL, H. K.; KAUSHIK, S. K.; DHAMIEJA, J. P.; SUMAN, R. K.; KUMAR, K. K. A study of granulocyte adherence in protein calorie malnutrition. **Indian Pediatrics**, v. 18, n. 5, p. 287-292, 1981.

GORNAL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v.177, n. 2, p.751, 1949.

GROSS, R. L.; NEWBERNE, M. P. Role of nutrition in immunologic function. **Physiological Reviews**, v.60, p.188–302, 1980.

- HESS, K.; USHMOROV, A.; FIEDLER, J.; BRENNER, R. E.; WIRTH, T. TNF α promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway. **Bone**, v. 45, n. 2, p. 367-376, 2009.
- HONG, J. H.; HWANG, E. S.; MCMANUS, M. T.; AMSTERDAM, A.; TIAN, Y.; KALMUKOVA, R.; MUELLER, E.; BENJAMIN, T.; SPIEGELMAN, B. M.; SHARP, P. A.; HOPKINS, N.; YAFFE, M. B. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. **Science**, v. 309, n. 5737, p.1074-1078, 2005.
- JANG, Y. K.; JUNG, D. H.; JUNG, M. H.; KIM, D. H.; YOO, K. H.; SUNG, K. W.; KOO, H. H.; OH, W.; YANG, Y. S.; YANG, S. E. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for *ex vivo* expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. **Annals of Hematology**, v. 85, n. 4, p. 212-225, 2006.
- JAVAZON, E. H.; BEGGS, K. J.; FLAKE, A. W. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. **Experimental Hematology**, v. 32, n. 5, p. 414-425, 2004. Review
- JIANG, X. X.; ZHANG, Y.; LIU, B.; ZHANG, S. X.; WU, Y.; YU, X. D.; MAO, N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. **Blood**, v. 105, n. 10, p. 4120-6, 2005.
- KAMPSCHMIDT, R. F.; UPCHURCH, H. F. Possible involvement of leukocytic endogenous mediator in granulopoiesis. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 155, n. 1, p. 89-93, 1977.
- KASSEM, M.; ABDALLAH, B. M. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. **Cell and Tissue Research**, v. 331, n.1, p. 157-163, 2008.
- KEUSCH, G.T. History of nutrition: malnutrition, infection and immunity. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 1, p. 336S-340S, 2003.
- KLETZIEN RF, FOELLM LA, HARRIS PK, WYSE BM, CLARKE SD. Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. **Molecular Pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 558-62, 1992.
- KOMORI, T.; KISHIMOTO, T. Cbfa1 in bone development. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 8, p. 494-499, 1998.
- KOMORI, T. Requisite roles of RUNX2 and Cbfb in skeletal development. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 193-197, 2003.
- KOMORI, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 99, p. 1233-1239, 2006.
- KOMORI, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by Runx 2. **Cell and Tissue Research**, v. 339, p.189- 195, 2010.

KONDO, M.; WAGERS, A. J.; MANZ, M. G.; PROHASKA, S. S.; SCHERER, D. C.; BEILHACH, G. F.; SHIZURU, J. A.; WEISSMAN, I. L. Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. **Annual Review of Immunology**, v. 21, p. 759-80, 2003.

KOSAKA, T.; IMAKIIRE, A.; MIZUNO, F.; YAMAMOTO, K. Activation of nuclear factor kappaB at the onset of ossification of the spinal ligaments. **Journal of Orthopaedic Science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association**, v. 5, n. 6, p. 572-578, 2000.

KORNBERG, A.; DAFT, F. S.; SEBRELL, W. H. Granulocytopenia and Anemia in Rats Fed Diets of Low Casein Content. **Science**, v. 103, n. 2682, p. 646-8, 1946.

KUÇI, E.; KUÇI, Z.; KREYENBERG, H.; DEAK, E.; PÜTSCH, 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. 651-659, 2010.

LANDGRAF, M. A.; TOSTES, R. D. E. C.; BORELLI, P.; ZORN, T. M.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. **Nutrition**, v. 23, n. 2, p. 145-156, 2007.

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

LEE, K. S.; KIM, H. J.; LI, Q. L.; CHI, X. Z.; UETA, C.; KOMORI, T.; WOZNEY, J. M.; KIM, E. G.; CHOI, J. Y.; RYOO, H. M.; BAE, S. C. RUNX2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between RUNX2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 23, p. 8783-8792, 2000.

LI, Y. P.; STASHENKO, P. Proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and IL-6, but not IL-1, down-regulate the osteocalcin gene promoter. **The Journal of Immunology : official journal of the American Association of Immunologists**, v. 148, n. 3, p. 788-794, 1992.

LI, Y.; LI, A.; STRAIT, K.; ZHANG, H.; NANES, M. S.; WEITZMANN, M. N. Endogenous TNFalpha lowers maximum peak bone mass and inhibits osteoblastic Smad activation through NF-kappaB. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 22, n. 5, p. 646-655, 2007.

LI T.; WU, Y. Paracrine molecules of mesenchymal stem cells for hematopoietic stem cell niche. **Bone marrow research**, v. 2011, 2011.

LINDER, C. C.; DAVISSON, M. T. Strains, Stocks, and Mutant Mice. In: HEDRICH, H. J.; BULLOCK, G., eds. **The laboratory mouse**. Oxford: Elsevier, 2004. cap.3 p. 25-44.

LIU, L. F.; SHEN, W. J.; ZHANG, Z. H.; WANG, L. J.; KRAEMER, F. B. Adipocytes decrease Runx2 expression in osteoblastic cells: roles of PPAR γ and adiponectin. **Journal of cellular physiology**, v.225, n. 3, p. 837-845, 2010

LORENZI, T. F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

MARUYAMA, Z.; YOSHIDA, C. A.; FURUICHI, T.; AMIZUKA, N.; ITO, M.; FUKUYAMA, R.; MIYAZAKI, T.; KITaura, H.; NAKAMURA, K.; FUJITA, T.; KANATANI, N.; MORIISHI, T.; YAMANA, K.; LIU, W.; KAWAGUCHI, H.; NAKAMURA, K.; KOMORI, T. RUNX2 determines bone maturity and turnover rate in postnatal bone development and is involved in bone loss in estrogen deficiency. **Developmental Dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 236, n. 7, p. 1876–1890, 2007.

MARTINS, G.L. , et al., Padrões hematológicos em grupos de população da zona da mata de Pernambuco. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.; São Paulo; v. 4 n. 4; 1971.

MAYANI, H.; GUILBERT, L. J.; JANOWSA-WIECZOREK, A. Biology of the hematopoietic microenvironment. **European Journal of Haematology**, v. 49, n. 5, p. 225-33, 1992.

METCALF, D. The 1993 Burnet Lecture. The colony stimulating factors-discovery to clinical use. **Australasian Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 337-40, 1992.

MISHIMA, S.; NAGAI; ABDULLAH, S.; MATSUDA, C.; TAKETANI, T.; KUMAKURA, S.; SHIBATA, H.; ISHIKURA, H.; KIM, S. U.; MASUDA, J. Effective ex vivo expansion of hematopoietic stem cells using osteoblast-differentiated mesenchymal stem cells is CXCL12 dependent. **European journal of haematology**, v. 84, n. 6, p. 538-546, 2010.

MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; DE SOUZA, A. L.; POPKIN, B. M. The nutrition transition in Brazil. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, n. 2, p. 105-113, 1995.

MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; TORRES, A.M.; DOS REIS, I.M. Patterns of intra-familial distribution of undernutrition: Methods and applications for developing societies. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 51, n. 12, p. 800-803, 1997.

MONTEIRO, C.A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. **Estudos Avançados**. 48, p. 7-20, 2003.

MONTEIRO, C.A.; BENICIO, M.H.; KONNO, S.C.; SILVA, A.C.F.; CONDE, W.L. Causas do declínio da desnutrição infantil no Brasil 1996-2007. **Revista de Saúde Pública**, v. 43 n. 1, p. 35-43, 2009.

MÜLLER-SIEBURG, C. E.; DERYUGINA, E. The stromal cells: guide to the stem cell universe. **Stem Cells**, v. 13, n. 5, p. 477-486, 1995.

MURUGANANDAN, S.; ROMAN, A. A.; SINAL, C. J. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. **Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS**, v. 66, n. 2, p. 236-253, 2009. Review.

MUSINA, R. A.; BEKCHANOVA, E. S.; SUKHIKH, G. T. Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues. **Bulletin of experimental biology and medicine**, v. 139, n. 4, p. 504-9, 2005.

NANES, M. S. Tumor necrosis factor-alpha: molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. **Gene**, v. 321, p. 1-15, 2003. Review

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

NARDINELLI, L.; BORELLI, P. Protein calorie-malnutrition a decreased in the macrophage's respiratory burst capacity. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.37, n. 1, p.51-60, 2001.

NAUTA, A. J.; KRUISSELBRINK, A. B.; LURVINK, E.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. **Journal of immunology**, v. 177, n. 4, p. 2080-7, 2006.

NAVEIRAS, O.; NARDI, V.; WENZEL, P. L.; HAUSCHKA, P. V.; FAHEY, F.; DALEY, G. Q. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. **Nature**, v. 460, n. 7252, p. 259-263, 2009.

NISHIMURA, R.; HATA, K.; IKEDA, F.; ICHIDA, F.; SHIMOYAMA, A.; MATSUBARA, T.; WADA, M.; AMANO, K.; YONEDA, T. Signal transduction and transcriptional regulation during mesenchymal cell differentiation. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 26, n. 3, p. 203-212, 2008.

NOVA, E.; SAMARTÍN, S.; GÓMEZ, S.; MORANDÉ, G.; MARCOS, A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. S34-S37, 2002.

- NOVOTNY, N. M.; MARKEL, T. A.; CRISOSTOMO, P. R.; MELDRUM, D. R. Differential IL-6 and VEGF secretion in adult and neonatal mesenchymal stem cells: role of NFkB. **Cytokine**, v. 43, n. 2, p.215-219, 2008.
- OPAS, M. Substratum mechanics and cell differentiation. **International Review of Cytology**, v. 150, p. 119-37, 1994.
- ORTIZ, R.; BETANCOURT, M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. **The Journal of nutrition**, v. 114, n. 3, p. 472-6, 1984.
- OTTO, T. C.; LANE, M. D. Adipose development: from stem cell to adipocyte. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40, n. 4, p. 229-242, 2005. Review.
- PHINNEY, D.G. Building a consensus regarding the nature and origin of mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular Biochemistry. Supplement**, v. 38, n. 7-12, 2002.
- PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, p. 71-74, 1997.
- RAMJI, D. P.; FOKA, P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. **The Biochemical Journal**, v. 365, p. 561-575, 2002. Review.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the Ain-76 Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 123, n.11, p.1939-1951, 1993.
- REEVES, P.G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. **The Journal of Nutrition**, v. 127, p. 838S-841S, 1997.
- REISSMANN, K. R. Protein metabolism and erythropoiesis. II. Erythropoietin formation and erythroid responsiveness in protein-deprived rats. **Blood**, v. 23, p. 146-53, 1964.
- 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*. **Journal of Cellular Physiology**, v. 145, n. 3, p. 434-443, 1990.
- ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Patologia estrutural e funcional**. 4.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. cap. 2, p. 33-72.
- RODKEY, F.L. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. **Clinical Chemistry**, v. 11, p. 478- 487, 1965.
- ROSEN, S. D.; SIMPSON, D. L.; ROSE, J. E.; BARONDES, S. H. Carbohydrate-binding protein from Polysphondylium pallidum implicated in intercellular adhesion. **Nature**, v. 252, n. 5479, p. 149-50, 1974.

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

SCHOFIELD, C.; ASHWORTH, A. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high? **Bulletin of the World Health Organization**, v. 74, n.2, p. 223-229, 1996.

SCRIMSHAW, N.S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. **Journal of Nutrition**, 133: 316S-321S, 2003.

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

STINNETT, J. D. Nutrition and the immune response. 1. ed. Boca Raton: **CRC Press**, 1983. 150 p

STOHLMAN, F. Aplastic anemia. **Blood**, v. 40, n. 2, p. 282-6, 1972

SUZAWA, M.; TAKADA, I.; YANAGISAWA, J.; OHTAKE, F.; OGAWA, S.; YAMAUCHI, T.; KADOWAKI, T.; TAKEUCHI, Y.; SHIBUYA, H.; GOTOH, Y.; MATSUMOTO, K.; KATO, S. Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. **Nature cell biology**, v. 5, n. 3, p. 224-230, 2003.

TAGAMI, M; ICHINOSE, S; YAMAGATA, K; FUJINO, H; SHOJI, S; HIRAOKA, M; KAWANO, S. Genetic and ultrastructural demonstration of strong reversibility in human mesenchymal stem cell. **Cell and Tissue Research**, v. 312 n. 1 p. 31-40, 2003.

TAVARES, V.; HIRATA, M. H.; HIRATA, R. D. C. Receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (Ppargama): estudo molecular na homeostase da glicose, metabolismo de lipídeos e abordagem terapêutica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 51, n. 4, p. 526-533, 2007.

TAVASSOLI, M.; MIGUELL, J. J. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 196, n. 4, p. 367-373, 1991.

TESTA, N. G.; DEXTER, T. M. Haemopoietic growth factors and haematological malignancies **Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 4, n. 1, p. 177-89, 1990.

TRENTIN, J. J. Hemopoietic microenvironments. **Transplantation Proceedings**, v. 10, p. 77-82, 1978.

- TOMKINS, A.M.. Protein-energy malnutrition and risk of infection. **Proceedings Nutrition Society**. v. 45; p.289-304; 1986.
- TONTONOZ, P.; HU, E.; SPIEGELMAN, B. M. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. **Current opinion in genetics and development**, v 5, p. 571-576, 1995.
- TSUKAHARA, S.; IKEDA, R.; GOTO, S.; YOSHIDA, K.; MITSUMORI, R.; SAKAMOTO, Y.; TAJIMA, A.; YOKOYAMA, T.; TOH, S.; FURUKAWA, K.; INOUE, I. Tumour necrosis factor alpha-stimulated gene 6-inhibits osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells induced by osteogenic differentiation medium and BMP-2. **The Biochemical Journal**, v. 398, p. 595- 603, 2006.
- ULSAMER, A.; ORTUÑO, M. J.; RUIZ, S.; SUSPERREGUI, A. R.; OSSES, N.; ROSA, J. L.; VENTURA, F. BMP-2 induces Osterix expression through up-regulation of Dlx5 and its phosphorylation by p38. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 7, p. 3816-3826, 2008.
- VAISMAN, N.; HAHN, T. Tumor necrosis factor-alpha and anorexia--cause or effect? **Metabolism**, v. 40, n. 7, p. 720-723, 1991.
- VICTORIA, J.W.; HERNANDEZ, V.Q.; Efecto del estado nutricional de los pacientes sometidos a cirugía eletiva. **Revista de Gastroenterología de Mexico**, v. 55; p. 207-210; 1990.
- VITURI, C. L.; BORELLI, P.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A.Z. Alterations of the bone marrow in extracellular matrix in undernourished mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 889-895, 2001.
- XAVIER, J. G.; FAVERO, M. E.; VINOLO, M. A. R.; ROGERO, M. M.; DAGLI, M. L. Z.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; BOROJEVIC, R.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. **Histology and Histopathology**, v. 22, n. 6, p. 651-60, 2007.
- WAITZBERG, D. L.; CIFFA, W. T.; CORREIA, M. I. T. D. Inquérito Brasileiro de Avaliação Nutricional Hospitalar (IBRANUTRI). **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 14, p. 124-134, 1999.
- WHETTON, A. D.; GRAHAM, G. J. Homing and mobilization in the stem cell niche. **Trends in Cell Biology**, v. 9, p. 233-238, 1999.
- WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nature reviews. Immunology**, v. 6, n. 2, p. 93-106, 2006.
- WINICK, M.; NOBLE, A. Cellular response in rats during malnutrition at various ages. **The Journal of nutrition**, v. 89, n. 3, p. 300-6, 1966.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Dept of Nutrition for Health and Development: Nutrition for health and development: a global agenda for combating malnutrition. **Geneva World Health Organization**, 2000.

WORLDHUNGER. **2012 World Hunger and Poverty Facts and Statistics**. Disponível em: http://www.worldhunger.org/articles/Learn/world%20hunger%20facts%202002.htm#Hunger_concepts_and_definitions. Acesso em: 18 de dezembro de 2011.

ZHANG, Y.; LI, C.; JIANG, X.; ZHANG, S.; WU, Y.; LIU, B.; TANG, P.; MAO, N. Human placenta-derived mesenchymal progenitor cells support culture expansion of long-term culture-initiating cells from cord blood CD34⁺ cells. **Experimental Hematology**, v. 32, p. 657-64, 2004.

ZUCAS, S. M.; LAJOLO, F. M.; BARBÉRIO, J. C. Gaiola metabólica para ratos, testada por meio de zinco radiativo. **Revista da Faculdade de Farmacia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v.7, p. 353-359, 1969.

ANEXOS

Anexo I- Aprovação pelo Comitê de Ética.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF/36/2010

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 a expressão de fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação da célula tronco mesenquimal medular"** (Protocolo nº 277), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Mayara Caldas Ramos** sob a orientação do(a) Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA e foi APROVADO em reunião de 10 de maio de 2010.

São Paulo, 11 de maio de 2010.

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

Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - Bloco 13 A - Cidade Universitária - CEP 05508-900 - São Paulo - SP
Fone: (11) 3091-3677 / Fax: (11) 3813-5093 - e-mail: rtrigo@usp.br