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

**Efeito da desnutrição protéica experimental
na hemopoese medular**

Solange Lúcia Blatt

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Orientador:
Profa. Dra. Primavera Borelli

SÃO PAULO
2004

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

**Efeito da desnutrição protéica experimental
na hemopoese medular**

Solange Lúcia Blatt

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profª. Dra. Primavera Borelli

SÃO PAULO
2004

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

Blatt, Solange Lúcia
B644e Efeito da desnutrição protéica experimental na hemopoese
medular / Solange Lúcia Blatt. -- São Paulo, 2003.
215p. ⁴

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

Orientador: Borelli, Primavera

I. Análise clínica 2. Desnutrição proteico-calórica :
Medicina I. T. II. Borelli, Primavera, orientador.

616.0756-9 CDD

Solange Lúcia Blatt

Efeito da desnutrição protéica experimental
na hemopoese medular

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Primavera Borelli
orientador/presidente

Profa. Dra. Juliana Pereira

Prof. Dr. José Salvador Rodrigues de Oliveira

Profa. Dra. Beatriz Beitler de Maurino

Prof. Dr. Julio Orlando Tirapegui Toledo

São Paulo, 01 de abril de 2004.

*Dedico este trabalho aos
meus pais, Lothar e Dyva e
aos meus irmãos, por estarem
presentes em minha vida*

*Ao Prof. Dr. Reinaldo
Naoto Takahashi e a
Profa. Dra. Primavera
Borelli por me ensinarem a
fazer ciência*

*Ao companheiro, Pedro
Gilberto, pelo incentivo
constante ao exercício do
amor e da ciência*

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

*"Deixe com que as coisas vão se desenrolando por si mesmas.
Elas são como as águas dos rios cujas rumam as vezes rápido demais,
outras mais vagarosas um pouco, bem como outras se acomodam e
tranqüilamente descansam formando um grande lago,
mas não deixam de prosseguir seu próprio rumo.
Deslizam vagarosamente formando um leito estreitinho
o qual vai, aos poucos, alargando, alargando, alargando, formando,
a cada instante, uma imagem linda, alegre e gratificante,
pois fazem do leito seu próprio espetáculo
e do caminho percorrido e a percorrer a sua alegria,
por que contudo olharem para traz,
vêem que não estão paradas.
Estas são as águas que formam o nosso rio,
o qual chamamos de Amor e que extraímos a energia necessária
para estarmos juntos lado a lado, contra tudo e todos,
superarmos os obstáculos e sacrifícios que a vida nos oferece.
Quando desanimarmos lembraremos sempre que temos o nosso rio,
o "Rio Amor", cujas águas jamais secarão,
pois a nascente onde ele se origina
é a fonte maior e chama-se DEUS - a nossa própria vida."*

Pedro Gilberto Ferreira

Agradecimentos Especiais

Ao Pedro Gilberto foste presença em meu caminhar e respeitaste profundamente a minha maneira única de amar; a tua presença, a tua companhia, o teu sorriso, as tuas palavras e mesmo a tua ausência foram expressão de amor profundo. O tempo passou e com ele o sofrimento das horas tristes, das despedidas e da ausência. Esta conquista se estende também a ti, sempre presente com um sorriso e um beijo na hora do adeus. As alegrias de hoje também são tuas, pois o teu amor, estímulo e carinho foram as armas desta vitória.

À “*Família Blatt*” é difícil por em palavras as lembranças do nosso convívio. Foram tantas lutas e delas carregamos a marca da experiência. A vocês que compartilharam os meus ideais e os alimentaram, incentivando a prosseguir na jornada, mostrando que o caminho deveria ser percorrido sem medo, fossem quais fossem os obstáculos. E, principalmente, obrigado por ensinarem que o importante não é só tornarmos *homens de sucesso*, mas também *homens de valor*.

Ao Laboratório de Imunopatologia da Fundação Pró- Sangue Hemocentro São Paulo que, através de sua direção e funcionários, me acolheu e oportunizou o aprendizado da *arte da citometria de fluxo*.

A Dra. Beatriz Beitler de Maurino e Dra. Juliana Pereira, do Laboratório de Imunopatologia, por terem permitido a realização dos experimentos, pelo constante apoio para a realização deste trabalho, agradeço de forma imensurável pela maneira compreensiva, humana e carinhosa a qual me senti tratada.

À Profa. Primavera Borelli pela lição de saber, pela orientação constante, pela dedicação e renúncia pessoal, por repartir sua experiência de vida e auxiliar a trilhar este caminho, manifesto meu reconhecimento e estima.

A Maristela Tsujita, que desde o estágio na Imunopatologia colaborou com seu valioso conhecimento, em todos os momentos da realização deste trabalho, de forma incondicional. Agradeço pela sua incansável dedicação aos experimentos solicitados, pelo seu profissionalismo, apoio e solidariedade, não só manifesto minha gratidão como também sinto-me honrada, pois ao longo deste trabalho, obtive o fruto de uma saudável e duradoura amizade.

Aos novos amigos, Ricardo Ambrósio Fock, Mariana Ferreira, Sabrina Peres, Karina Prestes, Maria Emília Fávero, Marco Aurélio Ramires Vinolo, Cristiane Bürger, Antônio Altair Magalhães pelos anos de convivência, os momentos de trabalho, estudo e diversão, divisão das alegrias, tristezas, dificuldades e vitórias fazem de vocês pessoas impossíveis de esquecer.

Ao Prof. Dr. Henri Stuker, pelo apoio estatístico e atenção dedicada, compartilhando experiência para que minha formação fosse também um aprendizado de vida.

À Profa. Clarmi Regis, àquela que soube ser mestre e, acima de tudo, grande amiga.

A FAPESP pelo apoio financeiro

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Análises Clínicas da USP que contribuíram para a realização deste trabalho..

A Universidade do Vale do Itajaí pela oportunidade da realização deste doutorado, o que me possibilitou adquirir conhecimentos que, certamente poderá refletir na qualidade de ensino desta renomada Instituição.

Ao Curso de Farmácia da Universidade do Vale do Itajaí, coordenado pelo Prof. José Roberto Bresolin, por ter permitido buscar o conhecimento e, tenho certeza de que demos um grande passo nesta busca e carregamos juntos a marca da experiência.

Ao Prof. Rogério Corrêa pela confiança e apoio para a conclusão deste trabalho, que com sua experiência me fez ver que poderia encontrar o caminho certo.

À Nemair Corrêa Hoffmann que conhece meus momentos bons e ruins, minhas dores, minhas alegrias, meus desapontamentos e esforços, muito obrigado por estar sempre presente.

Finalmente à todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização desta tese.

" Quando olhamos para trás , vemos um longo caminho percorrido, o quanto realizamos e sentimos orgulho do que fizemos. Quando olhamos para frente, vemos uma longa estrada, com uma imensidão de coisas por fazer, para que tudo se torne melhor. Essa estrada não tem fim, o importante é podermos sempre olhar para trás com orgulho e para frente com coragem, confiança e determinação. "

(Abílio Diniz)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
3. OBJETIVOS	30
4. MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Animais	31
4.2 Rações	31
4.3 Indução da desnutrição	33
4.4 Determinação das proteínas totais	33
4.5 Avaliação hematológica	34
4.5.1 Determinação do hemograma e reticulócitos	34
4.5.2 Obtenção de células da medula óssea	34
4.5.3 Viabilidade celular	35
4.5.4 Mielograma	35
4.6 Avaliação histopatológica medular	35
4.6.1 Determinação imunocitoquímica das regiões nucleolares marcadas pela prata	36
4.6.2 Determinação imunohistoquímica do antígeno celular de proliferação nuclear	37
4.7 Imunofenotipagem	38
4.7.1 Determinação das populações hematopoéticas da medula óssea	38
4.7.2 Aquisição e análise de células da M.O. por citometria de fluxo	41
4.7.3 Determinação da apoptose	43
4.8 Cultura de células	44

4.8.1 Fatores de crescimento hematopoéticos	44
4.8.2 Sistema de cultura líquida	45
4.8.3 Ensaio clonogénico em meio semi-sólido	45
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
6. RESULTADOS	48
6.1 Avaliação da Concentração Protéica das Rações	48
6.2 Consumo de ração, Consumo diário de Proteína e Peso corporal	48
6.3 Avaliação da Concentração de Proteínas Totais	48
6.4 Avaliação Hematológica do Sangue Periférico	50
6.5. Avaliação do Mielograma .	50
6.6 Resultado dos marcadores de proliferação celular em ensaios <i>ex vivo</i>	56
6.7 Análise imunofenotípica em ensaios <i>ex vivo</i>	59
6.8 Resultados da apoptose em ensaios <i>ex vivo</i>	83
6.9 Resultados da avaliação morfológica de cultura líquida	84
6.10 Análise imunofenotípica em cultura líquida	92
6.11 Resultados da avaliação morfológica de ensaios clonogénicos	104
6.12 Análise imunofenotípica em cultura semi-sólida	114
7. DISCUSSÃO	119
8. CONCLUSÃO	146
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	147
10. ANEXOS	199

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da Hemopoese	17
Figura 2: Esquema da expressão de antígenos de superfície de células hematopoéticas	20
Figura 3: Esquema da expressão de antígenos de superfície celular durante diferenciação mielóide	21
Figura 4: Esquema da expressão de antígenos de superfície celular durante diferenciação de linfócito B.	23
Figura 5: Esquema da expressão de antígenos de superfície celular durante diferenciação de linfócito T.	24
Gráfico 6: Resultado do consumo diário de proteínas e consumo diário de ração	49
Gráfico 7: Resultado da variação do peso corporal dos animais nutridos e desnutridos	49
Gráfico 8: Resultado do leucograma de animais nutridos e desnutridos	51
Gráfico 9: Resultado do eritrograma de animais nutridos e desnutridos	52
Gráfico 10: Resultado da contagem de reticulócitos e plaquetas de animais nutridos e desnutridos	53
Gráfico 11: Resultado do mielograma de animais nutridos e desnutridos	54
Figura 12: Fotomicrografia de células da medula óssea de animais nutridos e desnutridos	55
Gráfico 13: Resultados do AgNOR em animais nutrido e desnutrido	56
Gráfico 14: Resultados do PCNA em animais nutridos e desnutridos	56
Gráfico 15: Resultados do PCNA da região endosteal, paratrabecular e sinusoidal de animais nutridos e desnutridos	57
Figura 16: Fotomicrografia de corte histológico de esterno de animais nutridos e desnutridos (H.E.)	58
Figura 17: Resultados da imunofenotipagem da população total de células não marcadas da M.O. de camundongos nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	59
Figura 18: Representação gráfica da população total celular medular em R1, R2 e R3 de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	60
Figura 19: Imunofenotipagem do antígeno CD45 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	62
Figura 20: Imunofenotipagem do antígeno CD34 da população celular medular	

de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	63
Figura 21: Imunofenotipagem do antígeno CD117 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	64
Figura 22: Imunofenotipagem dos painéis CD34/CD45, CD38/CD45 CD38/CD117 e CD34/CD117 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> em R1	66
Figura 23: Imunofenotipagem dos painéis CD34/NK1-1; CD34/CD19; CD 117/CD19; CD 34/CD14 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> R1	67
Figura 24: Imunofenotipagem dos painéis CD34/CD45, CD38/CD45 CD38/CD117 e CD34/CD117 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> em R2	68
Figura 25: Imunofenotipagem dos painéis CD34/CD19; CD117/CD19, CD 34/CD14 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> em R2	69
Figura 26: Imunofenotipagem do antígeno CD11a da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	71
Figura 27: Imunofenotipagem dos antígenos Ter 119; CD71; CD2/CD71 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	72
Gráfico 28: Representação gráfica da porcentagem celular medular de células positivas para TER-119 e CD71, de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> , em região selecionada R1	73
Figura 29: Imunofenotipagem dos antígeno CD19 e CD 22.2 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	74
Gráfico 30: Representação gráfica da porcentagem de células positivas para os antígenos CD19 e CD 22.2, de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> , em região selecionada R1	75
Figura 31: Imunofenotipagem dos antígeno CD5 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	76
Figura 32: Imunofenotipagem dos antígenos CD2; CD3; CD3/CD8 e CD4 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i>	77
Gráfico 33: Representação gráfica da porcentagem celular medular de células positivas para os antígenos CD2, CD5, CD3, CD4 e CD3/CD8, de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> , em região selecionada R1	78
Figura 34: Imunofenotipagem dos antígenos NK1-1/CD2; NK1-/CD 3 e NK1-	

/CD5 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> em R1	79
Figura 35: Imunofenotipagem dos antígenos com co-expressão CD19/CD3; CD22/CD3; CD19/CD2;CD22/CD2; CD19/CD5; CD 22/CD5 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> em R1	81
Figura 36: Imunofenotipagem dos antígenos com co-expressão CD19/CD3; CD22/CD3; CD19/CD2;CD22/CD2; CD19/CD5; CD 22/CD5 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos <i>ex vivo</i> em R2	82
Figura 37: Avaliação da apoptose por citometria de fluxo <i>ex vivo</i>	83
Gráfico 38: Resultados da padronização, do número total celular medular na cultura líquida de camundongos “normais” na presença e ausência de citocinas	84
Gráfico 39: Resultados, do número de células totais e do número de blastos na cultura líquida, de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos na presença de citocinas	86
Gráfico 40: Resultados do número de formas jovens e formas em anel na cultura líquida, de células da medula óssea de animais nutridos e desnutridos na presença e ausência de citocinas	87
Gráfico 41 Resultados do número de formas segmentadas e eritroblastos na cultura líquida, de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos na presença de citocinas	88
Gráfico 42: Resultados do número de linfócitos monócitos na cultura líquida, de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos na presença de citocinas	89
Figura 43: Fotomicrografia de células presentes no quinto dia da cultura líquida com células de medula óssea de camundongos nutrido e desnutridos na presença e ausência de citocinas	90
Figura 44: Fotomicrografia de células presentes no quinto dia da cultura líquida com células de medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos coradas com Rosenfeld	91
Figura 45: Imunofenotipagem da população celular total da medula óssea de animais nutridos e desnutridos, de cultura líquida de 3 e 5 dias, na presença de citocinas	92
Figura 46: Imunofenotipagem do antígeno CD45 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos de cultura líquida de 3 dias, na presença de citocinas	93

Figura 47: Imunofenotipagem do antígeno CD45 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos de cultura líquida de 5 dias, na presença de citocinas	94
Figura 48 Imunofenotipagem do antígeno CD117 e CD 34 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos de cultura líquida de 5 dias, na presença de citocinas	96
Figura 49: Imunofenotipagem do antígeno TER 119, CD5/CD71 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos de cultura líquida de 3 e 5 dias, na presença de citocinas	98
Figura 50: Imunofenotipagem do antígeno CD2 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos de cultura líquida de 3 e 5 dias, na presença de citocinas	99
Figura 51: Imunofenotipagem do antígeno CD4, CD8, CD3,CD19 e CD3/CD19 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos de cultura líquida de 3 e 5 dias, na presença de citocinas em R1	100
Figura 52: Imunofenotipagem do antígeno CD4, CD8,CD3,CD19 e CD3/CD19 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos de cultura líquida de 3 e 5 dias, na presença de citocinas em R2	101
Figura 53: Imunofenotipagem do antígeno CD11a população celular medular de animais nutridos e desnutridos de cultura líquida de 3 e 5 dias, na presença de citocinas	103
Gráfico 54: Resultados da padronização, do número total celular medular em ensaios clonogênicos de células obtidas da medula óssea de camundongos "normais" na presença e ausência de citocinas	104
Gráfico 55: Resultados, do número de "clusters" e do número de colônias em ensaios clonogênicos de células obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos na presença e ausência de citocinas	106
Gráfico 56: Resultados, do número de células totais e de blastos em ensaios clonogênicos de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos na presença e ausência de citocinas	108
Gráfico 57: Resultados, do número de formas jovens e formas em anel em ensaios clonogênicos de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos na presença e ausência de citocinas	109
Gráfico 58: Resultados, do número de formas segmentadas e de eritroblastos em ensaios clonogênicos de células da medula óssea de camundongos	

nutridos e desnutridos na presença e ausência de citocinas	110
Gráfico 59: Resultados, do número de linfócitos e monócitos e formas macrofágicas em ensaios clonogênicos de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos na presença ausência de citocinas	111
Figura 60: Fotomicrografia de Colônias CFU-MIX e CFU-GM presentes nos ensaios clonogênicos em metilcelulose de células de medula óssea de camundongos nutrido e desnutrido	112
Figura 61: Fotomicrografia de células de camundongos nutrido e desnutrido presentes nos ensaios clonogênicos	113
Figura 62: Imunofenotipagem da população celular total da medula óssea de animais nutridos e desnutridos em ensaios clonogênicos de 7 e 14 dias, na presença de citocinas	116
Figura 63: Imunofenotipagem dos antígenos celulares CD117, CD34, CD11a CD3 e CD3/CD8 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos em ensaios clonogênicos de 7 dias, na presença de citocinas	117
Figura 64: Imunofenotipagem dos antígenos celulares CD117, CD34 CD11a CD3 e CD3/CD8 da população celular medular de animais nutridos e desnutridos em ensaios clonogênicos de 7 dias, na presença de citocinas	118
Figura 65: Esquema das vias funcionais e os mecanismos de transdução de sinais, de proliferação celular e proteínas envolvidas na ativação e supressão da apoptose	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição percentual as rações I e II	33
Tabela 2: Anticorpos monoclonais para análise imunofenotípica	41
Tabela 3: Controles Isotípicos de cadeia	41
Tabela 4: Resultado da concentração de proteínas totais, albumina, globulina expresso presentes no soro de animais nutridos e desnutridos	49
Tabela 5: Resultados do Mielograma	53
Tabela 6: Resultados da correlação das colônias GM; BFU-E e CFU-E; e MIX nos ensaios clonogênicos com as células progenitores GM, BFU e CFU-E e GEMM oriundas do grupo nutrido	106
Tabela 7 Resultados da correlação das colônias GM; BFU-E e CFU-E; e MIX nos ensaios clonogênicos com as células progenitores GM, BFU e CFU-E e GEMM oriundas do grupo nutrido e desnutrido	106

LISTA DE ABREVIATURAS

7-AAD	7-amino-actinomicina
AcMo	anticorpos monoclonais
APC	aloficocianina
BFU-E	formação unidades eritróides grandes multicêntricas ("burst")
BRDU	bromodeoxiuridina
CD	grupos de diferenciação
CD 11 a	marcador de adesão hematopoético
CD 71	marcador de ativação hematopoético
CD117	marcador primitivo hematopoético
CD14	marcador mielomonocítico
CD19	marcador de célula B
CD2	marcador de células T
CD22.2	marcador de célula B
CD3	marcador de células T
CD34	marcador primitivo hematopoético
CD4	marcador de células T
CD45	marcador panleucocitário
CD7	marcador de células T
CD8	marcador de células T
CFU-E	formação unidades eritróides pequenas
CFU-GEMM	unidade formadora de colônia de granulócito, eritrócito, macrófago e megacariócito
CFU-MIX	unidade formadora de colônia mistas
CFU-S	unidade formadora de colônia no baço
CSF	fatores estimuladores de colônia
DNA	ácido desoxirribonuclêico
DPE	desnutrição protéico energética
FACS	separação de células ativadas por fluorescência

Fase G1	fase pré-síntese
Fase G2	fase pós-síntese
Fase S	fase síntese
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FL-1,2 e3	fotodetectores de fluorescência-1,2 e 3
FSC	dispersão da luz frontal
Gate	região selecionada
G-CSF	fator estimulante de colônia granulocítica
GM-CSF	fator estimulante de colônia grânulo-monocítica
HE	hematoxilina e eosina
HIV	vírus da imunodeficiência adquirida
HSC	stem cell hematopoiética
IL-3	interleucina-3
Lin ⁻	ausência de antígenos em células hematopoiéticas em maturação e maduras
LL	células não coradas (negativas), no quadrante inferior esquerdo
LLA	leucemias agudas linfóides
LMA	leucemias agudas mielóides
LR	células coradas com AcMo conjugados a FITC , no quadrante inferior direito
LTC	cultura de longa duração
M	mitose
M-CSF	fator estimulante de colônia monocítica
MEC	matriz extra celular
MIP-1 α	fatores de crescimento inibitórios proteína inflamatória macrófágica alfa
NOR	região organizadora de nucléolo.
PBSC	células-tronco progenitoras no sangue periférico
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
PE	ficoeritrina
PerCP	proteína da clorofila

PI	iodeto de propídeo
Progenitor G	progenitor granulocítico
Progenitor GM	progenitor grânulo-monocítico
Progenitor M	progenitor monocítico
Progenitor Meg-E	progenitor megacariocítico e eritrocítico
rmG-CSF	fator estimulador de colônia granulocítica recombinante murino
rmGM-CSF	fator estimulador de colônia grânulo-monocítica recombinante murino
RNA	ácido ribonuclêico
Sca-1	antígeno stem cell
SCF	fator de célula tronco
SCI	inibidor de stem cell
SSC	Dispersão da luz lateral
Stem cell	célula tronco hematopoiética
TdT	deoxinucleotidiltransferase
TER-119	marcador eritrocítico
TGF- β	fator de transformação beta
Thy-1	marcador de superfície de célula tronco na medula óssea de camundongos e ratos
TNF	fator de necrose tecidual
UL	células coradas com AcMo conjugados ao PE, no quadrante superior esquerdo
UR	células duplamente coradas com AcMo a FITC e PE, no quadrante superior direito

RESUMO:

A desnutrição protéico-energética (DPE) é a forma de desnutrição mais encontrada em áreas subdesenvolvidas, atingindo principalmente recém-nascidos de baixo peso para sua idade gestacional, pacientes hospitalizados sob alimentação parenteral, idosos, crianças pré-escolares, indivíduos com distúrbios alimentares como na anorexia nervosa e bulimia e pacientes portadores de neoplasias, doenças crônicas e sob quimioterapia. No sistema hematopoético, a proliferação e diferenciação celular ocorrem de forma constante e equilibrada, sensível às demandas de linhagens celulares específicas. O comportamento medular da população de cada linhagem hematopoética é controlado pelo equilíbrio entre auto-renovação das células tronco, a diferenciação e a morte celular. Alterações estruturais e celulares em órgãos hematopoéticos têm sido relatadas na DPE, com redução da celularidade de medula óssea e da sua capacidade de resposta a estímulos inflamatórios e/ou infecciosos em indivíduos desnutridos. Neste trabalho estudamos o efeito da deficiência protéica experimental em diferentes linhagens hematopoéticas, através da realização do hemograma e do mielograma; avaliamos a capacidade proliferativa *ex vivo* por técnicas imunocitoquímica (detecção de regiões organizadoras de nucléolo marcadas pela prata - AgNOR) e de imunohistoquímica (detecção do antígeno de proliferação nuclear - PCNA) e, em ensaios de cultura líquida e clonogênicos em metilcelulose. Paralelamente, avaliamos o perfil imunofenotípico e estudos morfológicos de células da medula óssea em DPE. Células não-derentes foram cultivadas em meio líquido (CL), avaliando-se durante 1,3 e 5 dias, e células totais foram cultivadas em metilcelulose, avaliando-se durante 7, 14 e 21 dias, em ambos os ensaios, a proliferação celular em hemocítomos e por imunofenotipagem as populações celulares presentes nesses ensaios, sendo ambos suplementados com IL3, EPO, GM-CSF e G-CSF. Os resultados mostraram que a hemopoese é afetada pela desnutrição protéica, pois encontramos hipoplasia medular, destacando-se depleção dos setores eritróides, grânulo-monocíticos e megacariocítico e bloqueio maturativo. A anemia e leucopenia demonstradas são decorrentes da hipoplasia medular e, esta parece não ser dependente da apoptose. Os resultados da análise imunofenotípica evidenciaram que as células da medula óssea de animais desnutridos, apresentam redução na expressão de CD 45, CD34, CD38, CD117, TER 119 e CD71. As populações linfóides também foram afetadas pela desnutrição, destacando-se a depleção de células linfóides primitivas e maduras. Além disso, foi verificado que animais desnutridos apresentam menor produção de células sob ação e estímulo de fatores de crescimento externo, nos ensaios de CL e CSS. A análise morfológica revelou redução no número de células viáveis e de progenitores grânulo-monocíticos e eritróide, sugerindo alterações intrínsecas nestas células. Os resultados obtidos tanto com PCNA e AgNOR em amostras da medula óssea foram similares: os animais desnutridos apresentaram menor número de células em atividade proliferativa. O presente trabalho sugere proliferação celular medular reduzida na desnutrição protéica, ocasionando uma hipoplasia, principalmente do setor mielóide, decorrente da diminuição da existência de células primitivas e de progenitores bem como de sua capacidade proliferativa, da disfunção da ação regulatória de fatores de crescimento, de alterações nos receptores transmembrana e os mecanismos transduccionais, modificações histológicas da MO e modificações dos componentes do microambiente e da relação arquitetural desse microambiente.

Palavras chaves: desnutrição, hemopoese, proliferação, apoptose, imunofenotipagem.

ABSTRACT:

The protein-energy malnutrition (PEM) is the most disseminated kind of malnutrition in underdeveloped areas and the most common kind of malnutrition in newborns who are underweight according to their gestation age, hospitalised and receiving parenteral feeding patients, elderly people, individuals with nutrition problems such as anorexia nervosa and bulimia, patients who have neoplasia or chronic diseases, patients undergoing chemotherapy. In the haematopoietic system, the cellular proliferation and differentiation occur in a constant and balanced way, sensitive to specific cellular lineage demands. The stem cells auto-renewing, differentiation and cellular death control the population rate of each haematopoietic lineage. Structure and cellular alterations in haematopoietic organs have been mentioned in PEM. The reduction of the cell number of bone marrow and the incapacity to increase its production in answer to inflammatory and/or infectious stimulus may be important mechanisms responsible for the rising in the number of infections in individuals with malnutrition. The aim of this essay is to study the effect of the experimental protein deficiency in different haematopoietic lineages, as well as on the proliferation capacity *ex vivo* by immunocytochemical techniques (detection of silver stained organizer regions -AgNOR) and immunohistochemical (detection of proliferating cell nuclear antigen- PCNA), and *in vitro* cultivated in liquid culture (CL) and clonogenic assays (EC). Besides that, it evaluates the immunophenotyping profile and morphological studies in DPE. Cells with no adhesion were cultivated in liquid culture (CL), evaluating during 1, 3 and 5 days while the clonogenic assays (EC), evaluating during 7, 14 and 21 days the cellular proliferation, in analysis of cell number and by immunophenotyping the present cellular populations, being both the assays supplemented with IL3, EPO, GM-CSF, G-CS. The results showed that the haemopoiesis is affected by the protein malnutrition: marrow hypoplasia increasing was found depletion of the erythroid and granulo-monocytic components, and in more severe degrees of malnutrition, also the depletion of the megacaryocytic component and a blockage of maturation. The demonstrated anaemia and leucopenia are due to the marrow hypoplasia at least, after the malnutrition process installation the hypoplasia is not a result of the apoptosis increase in medulla cells. The results made evident that the marrow cells of animals with malnutrition, showed reduction in the number and expression of CD45, CD34, CD117, TER 119 and CD71. Lymphoid populations were also affected by malnutrition, standing out the depletion of primitive and mature lymphoid cells. Moreover, it was found out that animals with malnutrition show cell production under action and stimulus of external growth factors in assays of the CL and CSS. The morphological analysis revealed reduction in the cells number and erythroid and granulo-monocytic progenitors, suggesting intrinsic changes in these cells. The obtained results, with PCNA and AgNOR in bone marrow were similar: the animals with malnutrition showed a low number of cells in proliferation activity. This present essay allowed the analysis revealed reduction in the cells number in DPE with marrow hypoplasia of the different hemopoietics populations, and the possible mechanisms may be: reduction in the existence of primitive cells and progenitors as well as their proliferation capacity; regulatory action of growth factors, of the transmembrane receptors and the signaling mechanisms and of the components of the microenvironment and of the architectural structure of this microenvironment.

Key words: malnutrition, hemopoiesis, proliferation, apoptosis, immunophenotypic.

1. INTRODUÇÃO

Alterações qualitativas e/ou quantitativas da dieta podem originar desordens nutricionais. A etiologia destas desordens pode ser multifatorial, no entanto, freqüentemente estão associadas às condições sócio-econômicas e culturais, que contribuem para uma dieta inadequada de uma determinada população (SMITH e JAMES, 1992). Dentre as alterações nutricionais que ocorrem em termos mundiais, a desnutrição é a mais freqüente, sendo ainda uma das principais causas de morbidade e mortalidade, principalmente em países subdesenvolvidos ou em via de desenvolvimento.

O termo desnutrição protéico-energética ou protéico-calórica (DPE) refere-se a um conjunto de condições clínicas decorrentes da deficiência protéica e/ou de carboidratos que ocorrem em vários graus de severidade. Nos países em desenvolvimento a principal causa da DPE é primária, acometendo principalmente lactentes e crianças, enquanto que nos países industrializados a DPE, geralmente é secundária, estando associadas a outras doenças e acometendo tanto crianças como adultos (BARON, 1997).

São apresentados dados da literatura de observações epidemiológicas e experimentais evidenciam que indivíduos desnutridos freqüentemente apresentam maior susceptibilidade às infecções, comprometendo órgãos linfohematopoéticos e modificando a resposta imune, a resposta inflamatória e outros mecanismos de proteção.

Os órgãos hematopoéticos têm capacidade de aumentar a produção celular e acelerar a maturação de uma ou várias populações de células como mecanismo de adaptação a condições fisiológicas ou patológicas. Assim, o tecido hematopoético apresenta alta taxa de proliferação e renovação celular e elevada exigência de nutrientes, susceptível a alterações em condições de desnutrição.

São descritas alterações hematológicas, especialmente as alterações estruturais e ultra-estruturais da medula óssea, baço e timo na DPE; alterações funcionais - redução da migração celular do espraioamento,

fagocitose, atividade bactericida e fungicida -; bem como alterações na produção de espécies reativas do oxigênio (BORELLI *et al.*, 1995; 1998, XAVIER, 1999).

Dessa forma, a necessidade de nutrientes para a hemopoese (um indivíduo adulto, normal, produz cerca de 1×10^{11} células/dia/Kg) poderia justificar, por si só, a alta incidência de anemia e leucopenia observada em seres humanos, em situações de desnutrição. Os achados na literatura, entretanto, são muitas vezes conflitantes, relatando, não raro, leucocitoses. Tais controvérsias podem dever-se à presença de um quadro multicarenal, freqüentemente associado a outros processos patológicos. As alterações hematológicas quantitativas, como leucopenia, alterações na produção de eritrócitos, linfocitopenia, e neutropenia são, ao menos em parte, reflexo do comprometimento da hemopoese em condições de desnutrição (BORELLI *et al.*, 1995; BARON, 1997).

O controle do balanço entre auto-renovação, proliferação, sobrevivência, maturação e diferenciação da população de células tronco é o resultado de processos múltiplos regulatórios envolvendo interação célula-célula e fatores específicos de crescimento hematopoéticos (BENDER *et al.*, 1992; BURGESS e METCALF, 1980). As citocinas são glicoproteínas solúveis produzidas pelas células da imunidade inata e adquirida, atuando em receptores específicos, presentes tanto em células hematopoéticas como de origem não- hematopoética, sendo que suas ações podem ser locais ou sistêmicas. O papel das citocinas está diretamente relacionado com o comportamento das células envolvidas na imunidade e na inflamação, proporcionando resposta à estimulação da medula óssea nessas situações (ABBAS *et al.* 2003).

A desnutrição produz diversos efeitos a nível celular e resultados experimentais indicam perda ou redução na proliferação celular de vários órgãos. Além disso, estudos têm demonstrado que a capacidade proliferativa de células da medula óssea em camundongos desnutridos diminuiu, havendo redução no número de células pluripotentes (CSF-U),

ocorrendo, também, prolongamento no tempo de proliferação das células da medula óssea (FRIED, 1978; BORSATTO, 1999).

A anemia, a leucopenia e a hipoplasia medular, bem como as implicações das modificações no microambiente hematopoético, nos estados de desnutrição, nos parecem ser responsáveis por uma hemopoese e, particularmente uma mielopoese ineficaz que, aparentemente, não é reversível em curto espaço de tempo. As implicações das modificações da hemopoese na DPE, identificando o perfil imunofenotípico associado à avaliação da capacidade proliferativa de célula hematopoéticas com a ação regulatória do microambiente nos estados de desnutrição permanecem ainda obscuras. Entende-se que é fundamental conhecer todas as consequências da deficiência calórico protéica, uma vez que o índice desta deficiência entre a população ainda é elevado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Desnutrição

A desnutrição protéico-calórica ou protéico-energética (*DPE*) é definida pela Organização Mundial da Saúde como "condição(ões) patológica(s) que provém da menor ingesta, em várias proporções, de proteínas e calorias", ocorrendo mais freqüentemente em crianças com idade inferior a cinco anos e comumente associada a infecções (WHO *et al.*, 1973).

Ainda hoje, a desnutrição protéico-energética continua sendo o tipo mais comum de desnutrição: aproximadamente 800 milhões de pessoas apresentam algum tipo e, ou grau de desnutrição (CHANDRA, 1992; WATERLOW, 1996; GOLDEN, 2002; TOMKINS, 2000). Crianças com idade inferior a cinco anos, especialmente nos países do terceiro mundo, apresentam deficiência superior a dois desvios padrão relativos aos valores de referência da WHO/NCHS do peso esperado para idade (193 milhões), da altura esperada para a idade (230 milhões) e da relação peso para altura (50 milhões) (TOMKINS, 2000).

No Brasil, há uma distribuição desigual nos índices de desnutrição: na região Norte e Nordeste, há elevados índices de desnutrição, entre 23% e 27,3%, que se assemelham aos países pobres da África; nas regiões Sudeste e Sul o percentual de crianças desnutridas diminui para 8% a 9% (MONTEIRO *et al.*, 1997).

A desnutrição protéica e protéico-energética é geralmente encontrada em crianças, em recém-nascidos abaixo do peso para sua idade gestacional, em idosos, em pacientes sob alimentação parenteral, em indivíduos com distúrbios alimentares como os resultantes da anorexia nervosa e bulimia, em portadores de neoplasias ou doenças crônicas, sob quimioterapia ou, ainda, indivíduos que fazem dietas radicais (WAITZBERG *et al.*, 1999; AKNER e CEDERHOLM, 2000; MARCOS, 2000; BRUNDTLAND, 2000; GADDUCCI *et al.*, 2001; NOVA *et al.*, 2002; KEUSCH, 2003).

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, por excreção excessiva de nutrientes. Várias formas de desnutrição podem ocorrer simultaneamente (STINNETT, 1983) com quadros carenciais decorrentes de dietas alteradas quantitativamente ou qualitativamente (CHANDRA, 1992; WATERLOW, 1996).

Dependendo do grau de *DPE*, podem surgir diversas formas clínicas, o que pode ocasionar dificuldades na comparação de casos sendo as mais características o *Kwashiorkor* e o *Marasmus* (WILLIAMS et al., 1935; WATERLOW e ALLEYNE, 1971; DE ANGELIS, 1977; FERO-LUZZI e SPADONI, 1978; WATERLOW, 1996).

As formas clínicas características são *Kwashiorkor*, causado por carência essencialmente protéica, uma vez que o aporte de carboidratos encontra-se normal ou mesmo em excesso; e o *Marasmus*, decorrente da deficiência prolongada tanto de proteínas quanto de carboidratos. Quadros clínicos intermediários podem surgir pela associação de vários graus de privação protéica com diversos graus de deficiência calórica (DE ANGELIS, 1986). Embora existam diferenças clínicas entre ambas, a fisiopatologia dessas síndromes freqüentemente se sobrepõem, sendo comum denominar-se o *Marasmus* de *Kwashiorkor-marasmático* ou forma clínica de *Kwashiorkor* sem edema.

Em 1976, Suskind et al. verificaram que a desnutrição protéico-energética primária ocorria em 25 a 40% das crianças do mundo, números estes confirmados por Chandra em 1992 com dados epidemiológicos da África e da Ásia. Dados obtidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) confirmam que mais de um terço das crianças do mundo é mal nutrida, sendo que os piores índices se localizam na Ásia (80% das crianças afetadas), África (15%) e América Latina (5%) (DE ONIS et al., 1993).

Cotran *et al.* (2000) relata que dois terços dos pacientes internados nos Estados Unidos apresentavam *DPE* devido à dificuldade de ingerir ou de absorver alimentos. Apesar dos relatos de que a principal causa de *DPE* seja a dieta insuficiente, existem relatos de outros fatores que podem estar na modulação da desnutrição, como o baixo peso ao nascimento (WHARTON, 1991), parasitoses (LUNN e NORTHROP-CLEWES, 1993) e infecções recorrentes (KEUSCH, 2003).

Observações de caráter epidemiológico e experimental evidenciam que indivíduos desnutridos, especialmente crianças, apresentam maior susceptibilidade frente a processos infecciosos e índices mais elevadas de morbidade e mortalidade (BERKOWITZ, 1992; LESOURD, 1997).

O binômio desnutrição-infecção pode ser visto sob dois aspectos: alteração dos mecanismos de defesa do indivíduo causada pela desnutrição e agravamento, em decorrência da infecção, do estado carencial previamente instalado ou ainda, a doença desencadeando-o (BEISEL, 1984; KEUSH e FARTHING, 1986; POWANDA e BEISEL, 2003; SCRIMSHAW, 2003). Nessas condições, a desnutrição pode facilitar a invasão do agente, favorecer sua proliferação no organismo, facilitar infecções secundárias e modificar o curso e a evolução da enfermidade (LAMUS, 1975; BRUNDTLAND, 2000).

A restrição protéica modifica as respostas fisiológicas podendo induzir lesão celular. Contudo, existem diferenças na extensão e no tempo da lesão: tecidos que exibem elevada *turnover* de proteínas são primeiramente afetados em relação aos que apresentam baixo *turnover* protéico. Mecanismos envolvidos com a proliferação, diferenciação e morte celular podem, portanto, alterar-se na desnutrição, afetando diferentemente os distintos tecidos do organismo (DEO *et al.*, 1975; WATERLOW, 1996).

A elevada e constante necessidade de proteínas por parte do tecido hematopoético faz com que seja comum o encontro de alterações qualitativas e quantitativas em desnutrição protéica.

Hemopoese

A hemopoese compreende os processos que envolvem a origem, proliferação, maturação e a destruição das células sanguíneas. É um fenômeno complexo, altamente regulado e influenciado por vários estímulos, caracteriza-se pela contínua produção e liberação de células hematopoéticas maduras na circulação sanguínea. O compartimento de células maduras consiste em uma variedade de células responsáveis pelo transporte do oxigênio (eritrócitos), hemostasia (plaquetas), imunidade inata contra infecções (granulócitos e monócitos) e imunidade adquirida (linfócitos T e B) (LORENZI, 2003). A compreensão deste processo e da biologia das células tronco hematopoéticas são importantes para o desenvolvimento e tratamento de desordens onco-hematológicas, desordens congênitas, citopenias pós quimioterapia e transplante de medula óssea (TMO) (WEISSMAN, 2000; LEMISCHKA, 2001; SMITH, 2003).

As células hematopoéticas presentes na medula óssea podem ser classificadas quanto a sua capacidade proliferativa em três compartimentos funcionais: (I) compartimento das células tronco ou progenitores hematopoéticos pluripotenciais, compreendendo pequena população de células indiferenciadas com capacidade de gerar todos os tipos de células sanguíneas e alta capacidade de auto-renovação (SMITH, 2003); (II) de células progenitoras com potencial limitado de gerar células de diferentes linhagens sanguíneas e células progenitoras unipotenciais com capacidade restrita de desenvolvimento de uma única linhagem celular e (III) células reconhecidas morfológicamente, que ainda apresentam capacidade proliferativa como na série granulocítica que compreende a fase de mieloblasto a mielócito.

O tecido sanguíneo caracteriza-se por sua alta taxa de renovação, tendo em vista que as células maduras apresentam tempo de vida na circulação relativamente curto (OGAWA, 1993) e por sua flexibilidade e adaptação à diferentes situações fisiológicas e patológicas (QUESENBERRY, 1995). Fisiologicamente, em humanos adultos, a hemopoese ocorre na medula óssea. A produção de células sanguíneas em

um padrão constante depende do microambiente medular, estrutura organizada que regula a fisiologia da célula tronco hemopoética (COWLING e DEXTER, 1995; McKENNA e COTTER, 1997).

A hemopoese é influenciada por vários estímulos que atuam em diferentes níveis do processo: desta maneira, há que considerar: as interações célula-célula e célula-estroma, que ocorrem tanto no microambiente indutor da hemopoese como em outras localizações (MORANDAS e PRENANTT, 1978; TRENTIM, 1978); a ação dos diferentes fatores de crescimento e citocinas; a ação hormonal; a ação de mediadores plasmáticos e celulares da resposta inflamatória; e, obviamente, o estado nutricional do indivíduo (ATHENS *et al.*, 1961; PETER *et al.*, 1972; BORELLI *et al.*, 1995;1998; BORELLI e NARDELLI,2001).

O microambiente é constituído por células hematopoéticas em diferentes estádios de maturação, células estromais (células reticulares, macrófagos, células endoteliais, adipócitos), por uma matriz extracelular (MEC) e por substâncias solúveis (EAVES *et al.*, 1991; BRACH e HERMANN, 1991) apresentando-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica que fornece o parênquima de sustentação para as células hemopoéticas permitindo sua proliferação e diferenciação (OPAS, 1994, TRENTIM, 1978; DEXTER e TESTA, 1980). O termo microambiente indutivo é aplicado mais especificamente aos fatores que atuam em associação com o estroma do que aos fatores que atuam à distância, e que teriam papel permissivo ao invés de regulatório (BENTLEY, 1981).

Estudos *in vitro* sugerem que anormalidades do microambiente medular podem estar implicadas nas manifestações de certas doenças hematológicas, como anemia aplástica e leucemias agudas ou crônicas. Portanto, a caracterização da estrutura e função deste microambiente talvez possa ser importante na compreensão e tratamento destas doenças. (DEXTER e TESTA,1980).

A importância do microambiente indutor foi demonstrada também na hemopoese extramedular. Contrariamente ao rígido controle exercido pela

MO, existem situações patológicas em que se dá o deslocamento da hemopoese para sítios extramedulares, predominantemente fígado e baço. O fenômeno ocorre em patologias que alteram o microambiente indutivo medular, como o desenvolvimento de algumas neoplasias associadas à medula óssea (leucemias mielocíticas e metástases ósseas) que comprometem o desenvolvimento normal da hemopoese na medula óssea (KONSTANTOPOULOS *et al.*, 1995).

Desnutrição e Hemopoese

Lesões em órgãos com taxa de renovação protéica são uma característica em *Kwashiorkor* e algumas podem ser reproduzidas, experimentalmente, em animais (BORELLI *et al.*, 1995). Fried e Shapiro (1978) verificaram que camundongos submetidos a dieta isentas de proteínas e, após, irradiação apresentaram redução no número de unidades formadoras de colônias (CFU) no baço e na medula óssea, com subsequente redução das células maduras no sangue. Suda *et al.* (1976) sugeriram que, em condições basais, a cinética celular nos animais desnutridos era normal, apesar da redução do “pool” medular. Porém, sob estímulos inflamatórios, a resposta celular neutrofílica apresentou-se inferior nos animais desnutridos, sugerindo como um dos fatores responsáveis à redução no “pool” de reserva da medula óssea (BORELLI *et al.*, 1995; GARCIA e BARBIERI, 1986; BORELLI *et al.*, 1998).

A desnutrição produz diversos efeitos na célula, com resultados experimentais indicando perda ou redução na proliferação celular de vários órgãos. Betancourt *et al.* (1989) e Ortiz e Betancourt (1984) sugerem que a desnutrição possa prolongar o tempo de proliferação das células na medula. Chandra, (1977) encontrou em crianças desnutridas, diminuição da transformação blástica de linfócitos frente a mitógenos. Foi reportado que a capacidade de proliferação da MO e baço em camundongos desnutridos diminuí, com redução do número de células pluripotentes (CSF-U), e prolongamento no tempo de proliferação celular (FRIED, 1978). Porém, da mesma forma, as células intestinais de ratos desnutridos mostraram

prolongamento da fase de síntese de DNA (ROSE *et al.*, 1971). Células epidérmicas de ratos desnutridos prolongam as fases de síntese (S) e pós síntese do ciclo celular (G_2) (MATHUR *et al.* 1972); enquanto que as espermatogônias e as células de Sertoli de ratos desnutridos tiveram modificações nas fases de pré-síntese (G_1) e S do ciclo celular (BANSAL-RAJBANSHI e MATHUR, 1985).

Alguns trabalhos têm demonstrado que a desnutrição modifica a proliferação e a cinética de diferentes linhagens celulares. A recaptação de ferro e utilização de isótopos pelos eritrócitos estão reduzidas, indicando depressão da proliferação do setor eritróide (SINGHAL *et al.*, 1977). O número de células tronco apresenta-se reduzido em ratos (DEO *et al.*, 1975), o que sugere alterações na dinâmica da população destas células na MO e no baço de camundongos desnutridos (BELL *et al.*, 1976). Estudos em animais desnutridos mostraram uma redução de DNA (ácido dextrorribonucleico), RNA (ácido ribonucleico) e de conteúdo protéico (ORTIZ e BETANCOURT, 1984; 1990) e baixos valores de RNA polimerases (PERRETA *et al.*, 1981).

Em relação aos efeitos da desnutrição no ciclo celular de células hemopoéticas poucos são os trabalhos na literatura: a proliferação celular na MO influenciada por fatores externos está alterada na desnutrição (TICE e IVETT, 1985). Há deficiência de nutrientes causando prolongamento no tempo de geração, (ORTIZ e BETANCOURT, 1984; 1990). Dunki Jacobs e colaboradores avaliaram a influência da dieta na proliferação celular na MO óssea utilizando estudos de ciclo celular. A desnutrição em ratos foi utilizada para avaliar a distribuição das células em divisão na medula óssea, em especial as células tronco, e as fases do ciclo celular: os resultados mostram que, após 5 dias de desnutrição houve um aumento na porcentagem de células na fase G_0/G_1 do ciclo celular, o que foi confirmado após 14 dias de desnutrição experimental. Além disso, a recuperação nutricional, após 5 e 14 dias de restrição protéica, induzem recuperação na porcentagem de células em fase S e decréscimo na porcentagem de células em fase G_0/G_1 (DUNKI JACOBS *et al.*, 1989).

Borelli *et al.*, (1995) em estudos *in vivo*, e Borsatto e Borelli (2000), em trabalhos *in vitro*, avaliaram a capacidade proliferativa de progenitores granulocíticos e monocíticos da medula óssea de camundongos submetidos a desnutrição protéica e observaram que animais desnutridos têm menor produção de células. Além disso, na medula óssea, o número destes progenitores encontravam-se reduzidos nesses animais, sugerindo que seja este um dos fatores responsáveis pela hipoplasia observada *in vivo*. Estudando a matriz extracelular da medula óssea em camundongos desnutridos, têm sido encontradas alterações na proporção de proteínas da matriz, especialmente fibronectina, trombospondina e proteoglicanos, situação que também pode estar contribuindo para a hipoplasia observada (VITURI *et al.*, 2000; FÁVERO, 2003). As implicações das modificações do microambiente na proliferação celular na desnutrição permanecem obscuras.

Célula Tronco Hemopoética

Células tronco esplênicas foram inicialmente definidas por Till e McCulloch (1961), pela sua capacidade de gerar, após transplante, colônias hematopoéticas no baço de camundongos irradiados. Foram denominadas de unidade formadora de colônia esplênica (CFU-S). Eaves *et al.* (1991) avaliaram a presença de células tronco com capacidade de gerar todas as linhagens hematopoéticas em camundongos irradiados em culturas de longa duração *in vitro* e Nakahata e Ogawa (1982) de gerar colônias *in vitro* que contenham as células blásticas primitivas que se auto-renovam (B-CFC).

Fenotipicamente, *HSCs murino* são células morfologicamente pequenas, que apresentam alta relação núcleo citoplasma e expressam altos níveis de proteínas multi-resistentes a drogas e de aldeído desidrogenase. Estas células que não expressam marcadores de superfície vistos em células maduras, podem expressar baixos níveis de proteína de superfície *Thy-1^{low}* e relativamente altos níveis de marcador de superfície *Sca-1* (SMITH, 2003) Em *murinos* as *HSCs* estão presentes na frequência de 1/10.000 para 1/1.000.000 de células, na medula óssea e baço,

respectivamente, dependendo da espécie, idade e aspectos técnicos do modelo utilizado (HOLYOAKE *et al.*, 1999).

Em humanos o CD34 é denominada de célula tronco hematopoética. O primeiro anticorpo anti-CD34 denominado de *My10*, foi produzido por um hibridoma gerado em um camundongo sensibilizado com as células *KG1A* sendo posteriormente sete anticorpos agrupados no Fourth International Differentiation Workshop, em Vienna, 1989, recebendo a denominação de anti-CD34: *My10*, *BI-3C5*, *12.8*, *115.2*, *ICH3*, *TUK3*. Foram produzidos a partir de linhagem *KG1* e *KG1a*, enquanto o anticorpo *QBEND10* foi produzido contra as células endotéliais da placenta humana – sendo que os anticorpos reconhecem sítios distintos da molécula de CD34 (CIVIN *et al.*, 1989). Posteriormente, em Boston, 1993, *Leukocyte Typing V Workshop*, 15 anticorpos monoclonais foram reconhecidos para a molécula de CD34 (GREAVES *et al.*, 1995) e, outros 11 no *Leukocyte Typing VI Workshop* em Osaka, 1996 (NISHIO *et al.*, 1997).

Atualmente, a especificidade dos epitopos dos anticorpos monoclonais para CD34 divide-os em três classes, de acordo com a sensibilidade diferenciada à ação da neuroaminidase (sialidase), da glicoprotease derivada da *Pasteurella hemolytica* e da quimopapaína, reatividade tecidual e análise por Western Blotting: epitopos da classe I – sensíveis pela clivagem por neuraminidase, quimopapaína e glicoprotease derivada da *Pasteurella hemolytica*; epítomos da classe II – sensíveis à clivagem enzimática da quimopapaína e glicoprotease e resistente para a neuraminidase; epitopos da classe III – resistem à clivagem pelas três enzimas neuraminidase, quimopapaína e glicoprotease. (LANZA ET AL., 2001; MAINADIÉ ET AL., 2002). Na hemopoese normal, têm sido demonstrado, diferenças na expressão de CD34, entre imaturos e mais maduros progenitores hematopoéticos, sendo correlacionados com a expressão dos epitopos da classe II e III (BAUMHUETER *et al.*, 1994; RUDIN *et al.*, 1997; SOVALAT *et al.*, 1998).

Por outro lado, a aplicação clínica de anticorpos monoclonais CD34 e das células hematopoéticas CD34⁺ purificadas estão em rápida e ampla

expansão, sendo usadas tanto como marcador para o diagnóstico das classificações das leucemias, como marcador para a quantificação das células tronco progenitoras no sangue periférico (PBSC) e medula em transplante clínico (LANZA *et al.*, 2001).

Citocinas e Fatores de Crescimento

Citocinas constituem uma grande família de proteínas que podem modular positivamente e negativamente os efeitos nas células. Apontam-se funções como a manutenção do estado de repouso, apoptose, proliferação e diferenciação celular, atuando pela ligação a um receptor específico e ativando uma variedade de vias de sinalização (RANE e REDY, 2002). As citocinas podem facilitar a interação entre células tronco hematopoéticas e elementos do microambiente, incluindo componentes da matrix extracelular (EAVES *et al.*, 1991; SPIVAK *et al.*, 1992; NICOLA, 1994; METCALF e NICOLA, 1995; SPIVAK *et al.*, 1996). Algumas citocinas foram denominadas de fatores estimuladores de colônia (CSF), pela capacidade de estimularem a proliferação e formação de colônias *in vitro* (DEXTER *et al.*, 1990). O primeiro fator de crescimento hematopoético descrito foi a eritropoietina (EPO), um hormônio liberado quando a massa de células vermelhas se apresenta abaixo do nível normal, e posteriormente liberado quando sensores de hipóxia no rim ativam fatores de transcrição que aumentam sua produção (NAKATA e OGAWA, 1982; TESTA, 1991; FISCHER, 1997).

A necessidade do estroma medular para a manutenção da hemopoese demonstra que o microambiente pode conter as citocinas necessárias para a auto renovação e sobrevivência das células tronco pluripotentes, assim como sua diferenciação (BURGESS e METCALF, 1980; ARAI *et al.*, 1990; SMITH, 2003). Entre as principais citocinas regulatórias da hemopoese, encontram-se o fator de células tronco (SCF), interleucina 3 (IL-3), fatores estimulantes de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), de macrófago (M-CSF) e de granulócitos (G-CSF), eritropoietina (EPO) e, fatores provavelmente inibitórios, como fator de necrose tumoral

(TNF) e de transformação β (TGF- β) (CUTLER *et al.*, 1985; ARAI *et al.*, 1990; OGAWA, 1993; HAYLOCK *et al.*, 1994; SMITH, 2003).

Certos fatores de crescimento hematopoéticos estimulam a proliferação de células progenitoras comprometidas com mais de uma linhagem, ou mais primitivas como o GM-CSF e IL-3. A IL-3 estimula o crescimento, a diferenciação e a sobrevivência de célula tronco hemopoética e atua sobre ampla faixa de linhagens com atividade estimulante de colônia sobre as CFU-GM, BFU-E, CFU-Meg, CFU-GEMM, G-CSF, Eo-CSF e Ba-CSF. Este fator, denominado de multi-CSF, foi inicialmente purificado como um fator que estimula o crescimento dependente de linhagem celular (FDC-P1) *in vitro*. Embora sendo raramente detectado *in vivo*, é um potente fator estimulante de colônia *in vitro* e sua presença ou ausência *in vivo* tem mostrado efeitos no nível e atividade das células sanguíneas (METCALF e NICOLA, 1995).

A EPO promove proliferação e hemoglobinizacão de células progenitoras eritróides mais maduras (METCALF, 1992; 1993; 1995; 1997). Além disso, a eritropoietina promove a proliferação de células alvos e mantém sua viabilidade para se diferenciarem. O efeito do hormônio varia em particular com a célula alvo: para células progenitoras eritróides primitivas (BFU-E) que expressam um baixo número de receptores para eritropoietina (SAWADA *et al.*, 1990), sua atuação é como mitógeno, promovendo sua proliferação (SPIVAK *et al.*, 1991; SPIVAK *et al.*, 1996) enquanto para células progenitoras eritróides mais tardias, que expressam um alto número de receptores, são ativados ciclicamente pela EPO, para a sobrevivência celular (SPIVAK *et al.*, 1989; 1992; 1996).

Os fatores de crescimento hematopoéticos, assim como outras citocinas não apresentam atividade enzimática intrínseca, exercendo atividade através da ligação a receptores específicos associados à membrana celular. Os receptores para fatores de crescimento hematopoéticos possuem aspectos estruturais semelhantes, agrupados, portanto na superfamília dos receptores de citocinas Classe I (SOEDE-BOBOK e TOUW, 1997). Embora estes receptores não apresentem

atividade tirosina quinase intrínseca, estudos têm demonstrado que sua ação está freqüentemente associada com a fosforilação de proteínas celulares em resíduos de tirosina (WATANABE e ARAI, 1996).

A classe I envolve citocinas que possuem papel-chave em vários mecanismos de defesa do hospedeiro (interleucinas), na defesa antiviral (interferons) e na hemopoese (fatores estimulantes de colônias). São glicoproteínas com domínio extracelular N-terminal, um único domínio hidrofóbico transmembrana e um domínio citoplasmático C-terminal, apresentando, pelo menos uma região homóloga no domínio extracelular, necessária para a ligação do fator de crescimento (SOEDE-BOBOK e TOUW, 1997).

O primeiro evento produzido por uma citocina é a indução da interação entre as cadeias do receptor: alguns receptores de fatores de crescimento hematopoéticos formam complexos heterodiméricos envolvendo duas ou três cadeias diferentes com IL-2, IL-3, IL-5 e GM-CSF enquanto os receptores para G-CSF e EPO, quando ativados, formam complexos homodiméricos. Além disso, para os receptores heteroméricos, a associação da citocina com a primeira cadeia do receptor resulta em uma ligação de baixa afinidade com uma conversão para uma ligação de alta afinidade ocorrendo após a interação deste primeiro complexo com a segunda cadeia do receptor, ou altas concentrações de determinada citocina pode resultar em uma atividade antagonista (BURGESS e METCALF, 1980; DANOVA e AGLIETTE, 1997).

Estudos de deleção gênica em modelos animais têm revelado que vários desses fatores de crescimento são relativamente específicos em suas ações em células maduras e são um dos maiores reguladores fisiológicos dos níveis de granulócitos, eosinófilos, células eritróides e plaquetas (G-CSF, IL-5, eritropoietina e trombopoietina, respectivamente). Tais estudos destacem a especificidade em termos de produção final de células - trombopoietina e G-CSF e, também, pelo efeito de manutenção do número e mobilização de células tronco e de células progenitoras da medula óssea para o sangue periférico (METCALF e NICOLA, 1995; SMITH, 2003).

Os fatores de crescimento hemopoéticos exercem múltiplas ações em células alvo: podem atuar nos mecanismo da apoptose, estimular a proliferação celular, induzir a diferenciação e ativação funcional das células.

Existem vários sistemas de cultura para estudar *in vitro* a hemopoese: a maioria das colônias contém células-tronco indicando que as células que originam a colônia são capazes de auto-manutenção; as células-tronco encontradas em qualquer colônia são multipotenciais e capazes de produzir unidade formadora de colônia (CFU) de todos os tipos morfológicos; com o crescimento contínuo, a maioria das colônias contém células eritróides, mielóides e megacariocíticas reforçando, assim, a natureza multipotencial da célula-tronco (BECKER *et al.*, 1963; BRADLEY e METCALF, 1996).

Existem dois tipos de procedimentos para se detectar as células hemopoéticas humanas primitivas *in vitro*: uma, pela formação de colônias de blasto (culturas de curta duração); a outra, a iniciação da hemopoese em cultura de longa duração. As colônias de blasto são definidas como colônias que, quando examinadas após um período de tempo suficiente, apresentam colônias de células sanguíneas diferenciadas a partir de células clonogênicas conhecidas. A análise da formação de colônias de blasto documenta a existência de células primitivas, tanto em medula óssea de camundongo como em humana que pode ser estimulada *in vitro* para se gerarem células filhas clonogênicas. A análise dos números e dos tipos de progenitores clonogênicos gerados nas colônias primárias tem fornecido informação importante sobre a heterogeneidade do potencial proliferativo e de diferenciação expresso pelos progenitores individuais multipotentes estimulados aparentemente sob condições similares (BRADLEY e METCALF, 1996; MASSUMOTO *et al.*, 2001).

As culturas de longa duração (LTC ou culturas de Dexter) representam um sistema cuja hemopoese pode ser mantida por várias semanas, devido à associação de progenitores hematopoéticos primitivos a uma camada de células aderentes do estroma, que elimina a necessidade de adicionar, exogenamente, fatores de crescimento. Essa camada de estroma de apoio pode ser gerada num período de 2 a 3 semanas a partir de

células não-hematopoéticas presentes em aspirado de medula óssea normal. A única distinção do sistema de cultura de longa duração sobre a análise clonogênica padrão (de curta duração) é que ela suporta a manutenção e proliferação de célula hematopoética, que é distinta e mais primitiva do que a maioria, se não de todas, das células detectadas no ensaio da célula clonogênica padrão (DEXTER *et al.*, 1977; MASSUMOTO *et al.*, 2001).

Figura 1: Esquema da Hemopoese: desenvolvimento das células hematopoéticas a partir da *stem cell*, denominada célula tronco hematopoética, sob a influência dos fatores de crescimento. Progenitor Meg-E: Progenitor megacariocítico e eritrocítico; Progenitor GM: progenitor granulocítico e monocítico; IL-3: interleucina-3; SCF: stem cell factor; EPO: eritropoietina, TPO: trombopoietina; GM-CSF: fator estimulante de colônia grânulo-monocítica; G-CSF: fator estimulante de colônia granulocítica; GM-CSF: fator estimulante de colônia monocítica.

Fonte: Adaptado de Hoffbrand e Pettit, 1994.

Caracterização Imunofenotípica de Células Hemopoéticas

A necessidade de identificar subpopulações linfocitárias após o aparecimento da epidemia causada pelo vírus da imunodeficiência adquirida

(HIV) foi fundamental para o avanço da citometria de fluxo. Sendo outras aplicações clínicas da citometria de fluxo em hematologia assim determinadas: imunofenotipagem em doenças não-malignas; caracterização das doenças malignas do sistema hematopoiético: leucemias agudas mielóides e linfóides (LMA e LLA), doenças linfoproliferativas crônicas e mieloma múltiplo, enumeração das células CD34⁺ no sangue periférico, caracterização de células eritróides, avaliação plaquetária e análise do ciclo celular (BENNET *et al.*, 1976; BENNET *et al.*, 1990; BENE *et al.*, 1995, JENNING e FOON, 1997; CRISPIN *et al.*, 2000; BUCCHERI, 2003).

A imunofenotipagem permitiu o aprimoramento do diagnóstico e classificação das doenças malignas do sistema hematopoético. O diagnóstico de uma doença maligna hematopoética não se baseia em um único marcador específico, mas essa análise deve ser realizada utilizando-se um painel de anticorpos monoclonais (AcMo) adequadamente selecionados para a determinação da linhagem B, T, NK e de células mielomonocíticas. Além disso, permite determinar o grau de diferenciação celular, a expressão antigênica aberrante nas populações celulares malignas e a presença ou não de clonalidade (apenas nas células de linhagem B (BENNET *et al.*, 1976; 1981; 1986; 1990; BENE *et al.*, 1995, JENNING e FOON, 1997; CRISPIN *et al.*, 2000; BUCCHERI, 2003).

Dependendo do estágio de diferenciação, as células normais expressam moléculas em membrana, núcleo ou citoplasma, as quais podem ser identificadas por estudo imunofenotípico, sendo possível identificar o estágio de diferenciação de determinada célula, de acordo com a expressão de antígenos genéricos e linhagem específico presentes em determinados graus de diferenciação celular (MATUTS, 1995; JENNING e FOON, 1997; CRISPIN *et al.*, 2000; BENE *et al.*, 1995; RUIZ-ARGUELLES, 1992).

O antígeno CD45 é uma proteína transmembrana tirosina fosfatase expresso em todas as células nucleadas hematopoiéticas leucocitárias, exceto plasmócitos, eritrócitos e plaquetas (MAJETI *et al.*, 2000). A atividade fosfatase do antígeno CD45 é essencial para a atividade do receptor de célula T e os mecanismos transducionais subsequentes (TCHILIAN *et al.*,

2001), como demonstrado em linhagens celulares denominadas de CD45⁻ e CD45⁻ deficiente, nos quais camundongos são severamente imunodeprimidos, com desenvolvimento tímico bloqueado e disfunção de células T, mas com desenvolvimento de células B inalterado, porém com resposta proliferativa reduzida (MAJETI et al., 2000; TCHILIAN et al., 2001).

A função biológica da glicofosfoproteína CD34 ainda não estar totalmente elucidada, essa é uma molécula transmembrana glicosilada tipo I, que pode ser fosforilada por uma variedade de quinases, incluindo proteína quinase C e tirosina quinase. Detalhes da análise estrutural e estudos clonais confirmam que CD34 é uma sialomucina e sugerem que a composição de moléculas carboidratos contém uma extensa região N-terminal importante para determinar esta interação com uma variedade de ligantes como L selectina/ P-selectina e E-selectina, laminina B2 (LANZA et al., 2001; MAINADIÉ et al., 2002).

Estudos experimentais têm demonstrado pelo método de purificação de célula tronco de camundongos por apresentam homogeneidade baseado na expressão do antígeno *stem cell* (Sca-1), baixos níveis de expressão de *Thy-1* e a ausência de antígenos encontrados em células hemopoéticas em maturação e maduras denominadas de células *Lin*⁻ (SZILVASSY & CORI, 1993). *Thy-1* é um marcador de superfície de célula tronco na medula óssea de camundongos e ratos. *Thy-1*^{low}, *Lin*⁻, também conhecido como *Thy-1*^{low} T⁻ B⁻ M⁻ G⁻, ou células da medula óssea sem a expressão dos marcadores de superfície para a linhagem B (B220), granulócitos (Gr-1), células mielomonocíticas (Mac-1) e células T (CD4/CD8) e uma baixa expressão de *Thy-1*. Posteriormente demonstrou-se que células *Thy-1*^{low}, *Sca-1*⁺, *Lin*⁻ podem ser subdivididas com base na expressão rodamina 123 fluorescente: as de baixa expressão foram capazes de reconstituir hemopoese *in vivo*, enquanto as de alta expressão não foram capazes de reconstituir número similares de população de CFU-S (SPANGRUDE & JOHNSON, 1990; SZILVASSY & CORY, 1993). Por outro lado, tem sido reportado que uma única subpopulação de células fetais do fígado humana (CD34⁺, CD38⁻, HLA-DR⁻), purificada por citometria de fluxo tem originado ambos: célula

tronco hematopoética e do microambiente da medula óssea (HUANG & TERSTAPPEN, 1992; SMITH, 2003).

Figura 2: Representação esquemática da expressão sequencial de antígenos na superfície celular durante diferenciação de células hematopoéticas. As células progenitoras são divididas em quatro estágios e indicados com PI, PII, PIII e PIV, respectivamente. Expressão de CD34 e CD38 indica linhagem primitiva; CD33 comprometimento mielóide; CD7 comprometimento com células T; CD19 comprometimento com linhagem B e CD71 comprometimento eritróide. FONTE: adaptado de www.labmed.washington.edu/division/hematology

O antígeno CD117 é o receptor transmembrana tirosina quinase para a ação do fator *stem cell* (*c-kit*), ou seja, na medula óssea é expresso em progenitores hematopoéticos primitivos: célula tronco hematopoética multipotente; progenitores comissionados para linhagens mielóide e/ou eritróide, precursores de linfócitos B e linfócitos T (OGAWA, 1993; PAYNE et al., 1997).

A maioria das células tronco está em repouso (G_0) e é capaz de autorenovação. Quando estimuladas pelo fator de crescimento de célula tronco e pelo fator de diferenciação *flt3*, começam elas a se dividir e se diferenciam em células comprometidas com a linhagem mielóide (CFU_{GEMM}) e para a linfóide ($CFU-L$). A CFU_{GEMM} expressa os marcadores CD34 e CD33 (mielóide imaturo), assim como a CFU_{GM} e o mieloblasto. O promielócito não expressa CD34 e começa a perder o antígeno CD33 e a expressar os antígenos mielóides maduros CD13 e CD15. Os neutrófilos

mielócitos, metamielócitos, bastonetes e segmentados expressam apenas estes últimos antígenos. A linhagem monocítica macrofágica e os monócitos maduros expressam os antígenos CD11b, CD14 e CD64 e CD68 (BENNET *et al.*, 1976; 1981; 1986; 1990; MATUTS, 1995; JENNING e FOON, 1997; BENE *et al.*, 1995; RUIZ-ARGUELLES, 1992; CRISPIN *et al.*, 2000).

Figura 3: Representação esquemática da expressão sequencial de antígenos na superfície celular durante diferenciação mielóide. As células progenitoras mielóides são divididas em quatro estágios e indicados com MI, MII, MIII e MIV, respectivamente. A CFU_{GEMM} expressa os marcadores CD34 e CD33. A linhagem monocítica expressa os antígenos CD11b, CD14 e CD64 e CD68 enquanto a linhagem neutrófila expressa CD 13 e CD15.

FONTE: adaptado de www.labmed.washington.edu/division/hematology

As células eritróides mais diferenciadas expressam CD71 (receptor de transferrina) e α -glicoforina, sendo em camundongos denominado o antígeno de TER-119 (OSAWA *et al.*, 1996). O proeritroblasto é o primeiro precursor eritróide reconhecido por morfologia medular se diferenciando e formando a hemácia normal, porém não apresenta atividade em CFU-E e BFU-E (KEMP *et al.*, 1987).

O CD 71, receptor celular para transferrina diférrico, é expresso em células progenitoras eritróides (HUEBERS, 1987). Wognum *et al.* (1990) têm demonstrado uma baixa expressão de receptores para eritropoietina estimada em 50 a 1000 receptores por progenitor eritróide, enquanto 300 a 800 receptores para transferrina por célula estão presentes em células

progenitoras eritróides em atividade proliferativa (IACOPETTA *et al.*, 1982); sendo esta alta expressão de receptores para transferrina em progenitores eritrocíticos associada à rápida proliferação e requerimento de ferro para síntese de hemoglobina. Além disso, tem sido demonstrado que a expressão de CD71 é diferenciada nas células eritróides: células eritróides primitivas expressam CD71, esta expressão diferenciada dentro das células precursoras e a ausência de expressão em eritrócitos (LOKEN *et al.*, 1987; GUBIN *et al.*, 1999). Por outro lado, o CD71 tem sido referido pela literatura como marcador de ativação ou proliferação celular, regulado após ativação mitogênica de linfócitos B e linfócitos T e não dependente do ciclo celular, mas não está expresso em linfócitos B ou T (KEMP *et al.*, 1987). As células comprometidas com a linhagem megacariocítica expressam os marcadores CD41, CD42 e CD61; durante o processo de maturação dos megacariócitos, dá-se a duplicação do DNA, sem divisão celular.

A primeira fase de maturação do linfócito B acontece na MO e independe da interação com antígenos, por isso chamada de maturação antígeno-independente. Nesta fase, haverá a formação completa da imunoglobulina e sua conseqüente exposição na superfície celular. Durante a maturação há expressão de várias moléculas na membrana, núcleo ou citoplasma da célula e sua identificação através de estudo imunofenotípico nos permitem identificar a fase na qual se encontra determinada população de células. As células linfóides B-I são as células tronco comprometida com a linhagem linfóide B (pró-B); expressam CD34 e deoxinucleotidiltransferase (TdT). Expressam ainda marcadores da linhagem linfóide B (CD19, CD22, CD79a) e ainda não apresentam o antígeno comum (CD10) ou imunoglobulinas, enquanto as células linfóides B-II mantêm os marcadores linfóides B CD19, CD22 e CD79a e passam a expressar o antígeno CD10. Na fase linfóide B-III, inicia-se a recombinação gênica para a formação das cadeias leves da Ig (κ ou λ), que são expressas na fase seguinte, B-IV ou B madura. Nesta última fase, o linfócito está pronto para interagir com o antígeno (BENNET *et al.*, 1976; 1981; 1986; RUIZ-ARGUELLES, 1992; BENE *et al.*, 1995; MATUTS, 1995; JENNING e FOON, 1997; CRISPIN *et al.*, 2000;).

A sinalização via complexo receptor antígeno de linfócito B (BCR) controla o desenvolvimento de linfócitos B, resposta imune humoral, indução de tolerância e produção de auto anticorpo. Os mecanismos transduccionais do BCR também são regulados por outras moléculas de superfície celular, incluindo o receptor do CD22 e o complexo CD19/CD21. A expressão do CD19 e CD22 regula fosforilação de tirosina, sinalizando *Lyn*, como o fosfatidilinositol-3 quinase e da proteína *Vav* durante sinalização de linfócitos B (SATO *et al.*, 1997; TSITSIKOV *et al.*, 1997; HASEGAWA *et al.*, 2001). Em murinos, o antígeno CD19 é uma glicoproteína transmembrana de 95 k-DA, membro da superfamília de imunoglobulina, restrito à linhagem B, sendo o primeiro a aparecer durante a ontogênese da célula B, seguido do HLA-DR, e está expresso por toda diferenciação desta célula, mas não sendo expresso em células plasmáticas e células B – linhagem B1 conhecidas como células B CD5⁺. No entanto, CD22.2, também membro da superfamília de imunoglobulina e associado ao receptor de antígeno de célula B para mediar adesão intercelular, está expresso em altos níveis em células B maduras, células B-1 (células B CD5⁺) e células plasmáticas. O subtipo de célula B CD5⁺, estão comissionadas a produção de anticorpos IgM, IgG e IgA (HASEGAWA *et al.*, 2001).

Figura 4: Representação esquemática da expressão sequencial de antígenos na superfície celular durante diferenciação de linfócito B. Os linfócitos B são divididos em quatro estágios e indicados com BI, BII, BIII e BIV, respectivamente. Expressão de CD 19 e CD 10 concomitante com CD34 e Tdt indicam células primitivas B e CD20 e CD 21 e CD22 aparecem durante maturação de linfócito B.

FONTE: adaptado de www.labmed.washington.edu/division/hematology

A célula precursora comprometida com a linhagem T expressa os antígenos CD34, *TdT* e CD7; esta deixa a MO e vai para o timo onde sofre o processo de maturação e diferenciação. Durante a maturação, o linfócito adquire moléculas de CD4 ou CD8, as quais funcionam como adjuvantes do complexo TRC-CD3 (receptor de célula T) no momento da ligação com o antígeno estranho. Dentro do córtex tímico, a célula passa a expressar CD3 no citoplasma e mantém a expressão de CD7 e de *TdT*, sendo denominada de timócito I enquanto o timócito II expressa moléculas de CD2, CD5 e CD4 e CD8. Entretanto, na fase de timócito III a célula mantém as moléculas do estágio anterior e adquire a molécula CD1a. No timócito IV, a molécula de CD3 está expressa na membrana ligada à molécula do TCR; a maioria expressa as cadeias $\alpha\beta$ e somente 10% as cadeias $\gamma\delta$. O timócito IV também expressa *TdT* e, à medida que amadurece, perde esta enzima e vai para a medula do timo onde ganha a circulação sanguínea (BENNET *et al.*, 1976; 1981; 1986; RUIZ-ARGUELLES, 1992; BENE *et al.*, 1995; MATUTS, 1995; JENNING e FOON, 1997; CRISPIN *et al.*, 2000;).

Figura 5: Representação esquemática da expressão seqüencial de antígenos na superfície celular durante diferenciação de linfócito T. Os linfócitos T são divididos em quatro estágios e indicados com TI, TII, TIII e TIV, respectivamente. Expressão de CD 7 e alta densidade de L-selectina concomitante com CD 34 indicam precursor linfóide T e pode ser encontrado em medula óssea fetal e timo. A maioria dos timócitos coexpressam CD4/CD8 enquanto a expressão de CD4 sem a expressão de CD8 ocorre mais tarde na maturação de células T quando expressam alta densidade antigênica de L-selectina e CD3.

FONTE: adaptado de www.labmed.washington.edu/division/hematology

Em murinos, o CD2 é um dos antígenos mais precoce da ontogênese de células T, estando presente durante todo o desenvolvimento da ontogenia tímica de camundongos, exceto para distinguir subtipos CD4/CD8 em timócitos. Na medula óssea, CD2 é expresso em células pré-B, linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK, mas não em células pro-B (KATO et al., 1992; DAVIS et al., 1996). CD3 é o antígeno restrito da linhagem de células pan-T: expresso em timócitos e linfócitos T maduros, em todas as espécies de camundongos testadas (ISAKOW ET AL., 1995). O CD4 está expresso na maioria das células T maduras e timócitos: o CD4 e CD8 aparecem, ao mesmo tempo, na ontogênese da célula T-CD4 expresso no subtipo auxiliar/indutor (helper), e CD8, expresso no subtipo das células T supressora/citotóxica (supressor). Nas células NK (natural-killer) ocorre expressão de CD8 de baixa intensidade (LEDBETTER e HERZENBERG, 1979).

A adesão dos leucócitos é um processo fundamental para a fisiologia e função leucocitária, a citotoxicidade de linfócitos T e NK, a síntese de imunoglobulinas por linfócitos B e quimiotaxia e a fagocitose de granulócitos e macrófagos. A expressão das integrinas dos leucócitos difere com o tipo celular: em geral, todos os leucócitos expressam CD 11a e CD18 enquanto CD11 b, c e d são predominante para a linhagem mielóides (específicos para granulócitos e monócitos). Os ligantes celulares para integrinas dos leucócitos são os ICAMs, membros da superfamília de imunoglobulinas, contendo o domíneo Ig característico, sendo atualmente cinco ICAMs descritos na literatura ICAM 1 a ICAM 5. Em murinos, o CD11a é uma glicoproteína expressa em todos os leucócitos, mediando adesão intercelular com ICAM-1(CD54) e ICAM 2 (CD102), cujo complexo é $\alpha_L\beta_2$, sendo distribuído nos leucócitos, timócitos, macrófagos, células T e micróglia .

Marcadores de Proliferação Celular

O ciclo de divisão celular é coordenado e finamente regulado através de eventos em que células duplicam (replicam) seu material genético (DNA) e posteriormente entram em fase de divisão. Formalmente, o ciclo celular

tem sido dividido em quatro fases distintas: G_1 (gap 1 ou fase pré-síntese), S (fase de síntese), G_2 (gap2 ou fase pós- síntese) e M (mitose). Após o término dos eventos celulares mitóticos, as células podem entrar em fase de repouso (G_0) ou iniciar um novo ciclo celular. Além disso, cada etapa do ciclo celular tem sido caracterizada por um típico conteúdo de DNA: na fase G_0 e G_1 as células apresentam um conteúdo diplóide de DNA, na fase G_2 e M têm $4N$ e na fase S um conteúdo intermediário de DNA. O ciclo é completado na mitose, que tradicionalmente é dividida em cinco fases: prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase e, posteriormente, a citocinese (SCHAFFER, 1998). Fatores de crescimento extracelulares, denominados fatores celulares específicos, determinam a manutenção da célula no estado de repouso ou a sua entrada no ciclo celular, operando durante a fase de G_1 (RAGIONE et al., 1996), pois as etapas após a entrada na fase S são independentes de fatores extracelulares e dependentes de fatores intracelulares (O'FARRELL et al., 1989).

Uma sequência de sinais para iniciar a replicação do DNA é transmitida da célula para o núcleo (ROZENBURG, 1986). Os fatores de crescimento por estimularem a proliferação celular via tirosina quinase, iniciam a transição de células de um estado de G_0 – repouso para o início da fase de G_1 . Vários dos receptores pertencentes a esta família também estimulam migração celular, mudanças na forma de célula, produção de matriz extracelular e transcrição de genes específicos (BASERGA, 1989; WILLIAMS et al., 1991). Outras proteínas aparecem tardiamente em G_1 , incluindo enzimas da síntese de DNA: ribonucleotídeo redutase, dihidrofolato redutase, timidilato sintetase, timidina quinase, DNA polimerase e *ciclina* (também denominada *antígeno nuclear de proliferação celular* (PCNA) (BASERGA, 1989).

As proteínas chamadas de ciclinas e ciclina dependente de quinase (*cdks*) têm sido relacionadas como proteínas chaves reguladoras do ciclo celular: tal denominação, "ciclina", tem sido empregada pelo fato que estas proteínas são ciclicamente sintetizadas e degradadas em cada ciclo celular, enquanto que as *cdk* enzimas só são nomeadas devido serem inativas

sozinhas e, portanto ligarem-se a um membro da família ciclina. As *cdks* são individualmente responsáveis por dirigem células nas fases M e S, são respectivamente, *cdk1* e *cdk2*. As ciclinas são responsáveis pela ativação das enzimas *cdks* sendo identificadas atualmente diferentes classes de ciclinas. As ciclinas mitóticas ativam *cdk1*, células vão se dirigir para a fase M, o grupo de G₁ ciclinas ativam a transição de G₁-S.

O ciclo celular pode ser utilizado para estudar proliferação de células hemopoéticas e a influência do conteúdo protéico neste processo (RAGIONE et al., 1997; BANKER ET AL., 1997). A síntese de DNA aparece em células em proliferação e alguns métodos vêm sendo aplicados por preparações histológicas, com uma variedade de marcadores do ciclo: (1) auto-radiografia de tumores exposto a timidina tritiada radioativa; (2) utilização de anticorpo monoclonal para bromodeoxiuridina (BRDU) - análogo da timidina incorporado durante síntese de DNA e utilizado para avaliar fase S do ciclo mitótico; (3) antígenos expresso durante o ciclo mitótico: como a expressão de Ki-67 e expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA); (4) Regiões organizadoras de nucléolo (NOR) e (5) poliploidia de DNA por citometria de fluxo (SCHAFER, 1998).

A imunohistoquímica enzimática introduzida em 1966 (Nakane & Pierce, 1966) como método diagnóstico em patologia de tumores tem sido aplicada de modo crescente, após o considerável ganho de sensibilidade oferecido pelos sistemas de amplificação atuais. Tal método permite a caracterização de numerosos antígenos em amostras teciduais, permitindo correlações morfológicas da arquitetura tecidual e de padrões celulares com os marcadores celulares característicos. O advento da tecnologia de anticorpos monoclonais trouxe, também neste campo, considerável progresso na identificação de determinantes antigênicos específicos, bem mais caracterizados, aumentando a reprodutibilidade das detecções (KOHLE & MILSTEIN, 1976). Por outro lado, a proliferação celular está, muitas vezes, relacionada com a agressividade de certas neoplasias e mensurá-las pode ser um parâmetro prognóstico importante.

O ciclo celular é caracterizado por uma complexa sucessão de eventos bioquímicos envolvendo a síntese e degradação de proteínas que sinalizam e regulam a passagem de uma fase para a outra do ciclo, constituindo-se a identificação dessas proteínas, por meio da marcação utilizando anticorpos e protocolos adequados de imunohistoquímica, uma importante ferramenta para a identificação das células dentro do ciclo celular. O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear não histona de 36Kd altamente conservada, que participa como co-fator da DNA polimerase δ e ξ , tendo importante papel na síntese do DNA da fita líder e da fita descontínua. A interação dessa proteína com as DNA polimerases δ e ξ é diferente. No caso da DNA polimerase δ , a proteína PCNA aumenta a estabilidade do complexo DNA polimerase com primer (EINOLF, 2000); já no caso da DNA polimerase ξ , o PCNA aumenta tanto a taxa de associação da enzima com o primer como a taxa de incorporação de nucleotídeos, sem afetar o passo de dissociação (MAGA *et al.*, 1995, 1999).

Estudos recentes têm demonstrado que o PCNA também interage com várias outras proteínas envolvidas em diversas funções, tais como, processamento dos fragmentos de Okazaki, reparo do DNA, metilação do DNA, controle do ciclo celular, etc. A interação do PCNA com as proteínas se dá pela ligação do PCNA a seqüências consenso presentes nas mesmas (WARBRICK *et al.*, 1998; 2000; TSURIMOTO, 1999). O antígeno nuclear de proliferação celular é expresso no final da fase G₁ do ciclo celular, atingindo na fase S sua concentração máxima (BRAVO *et al.*, 1987). Sua expressão tem sido associada ao processo de divisão celular e/ou processo de reparo de DNA (HATTONI *et al.*, 1995).

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) são alças de DNA, contendo genes ribossômicos, associados com proteínas argirofílicas não-histonas (GALL e PARDUE, 1969). Essas proteínas ácidas não-histonas associadas às NORs são demonstráveis por meio de coloração pela prata, daí resultando a sigla AgNOR (HOWELL e BLACK, 1980; PLOTON *et al.*, 1986). sendo que o número de regiões marcadas (AgNORs) está intimamente relacionado com a proliferação celular, a síntese de proteínas,

ploidia e/ou defeitos na associação nucleolar (DA SILVA *et al.*, 1999). A expressão de NORs tem sido utilizada em citologia e histopatologia como marcador de proliferação e tem-se demonstrado de valor prognóstico em várias neoplasias humanas. No cariótipo humano normal, as regiões organizadoras de nucléolo (NORs) são observadas nos braços curtos dos cinco pares de cromossomos acrocêntricos (cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22), sendo constituídas por segmentos de DNA que contêm os genes para a produção do ácido ribonucleico ribossômico (RNAr) (KAJIWARA *et al.*, 1990). Um peculiar grupo de proteínas - altamente argirófilas - estão localizadas nas NORs, ligam-se à prata por meio de grupos carboxílicos e sulfídricos, adquirindo uma coloração castanho-escura (BUYS e OSINGA, 1980), o que permite que as NORs sejam claramente visualizadas. Vários trabalhos têm indicado a RNA polimerase I, a proteína C23 e a proteína B23 como sendo as proteínas presentes nas NORs marcadas pela prata, sendo que a proteína C23 é a única que foi claramente identificada como sendo uma proteína AgNOR (ROUSSEL *et al.*, 1992). A quantidade de regiões marcadas pela prata (AgNORs) em uma célula está diretamente ligada à taxa ou à rapidez de proliferação dessa célula. Quanto menor o tempo do ciclo (maior taxa de proliferação), maior é a quantidade de AgNORs.

Com base nas alterações estruturais e celulares em órgãos hematopoiéticos relatadas na DPE, os mecanismos responsáveis pela hipoplasia medular observado na desnutrição protéica não estão ainda totalmente esclarecidos. As modificações na proliferação celular, a expressão dos marcadores imunofenotípicos e o envolvimento da apoptose podem estar relacionados com o desenvolvimento desta hipoplasia.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi caracterizar o imunofenótipo das populações celulares presentes na medula óssea e avaliar o efeito da desnutrição sobre a proliferação de células hematopoéticas

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss Webster (*Mus domesticus*), machos, de 2 a 3 meses de idade, adultos, provenientes de colônias do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Em nosso modelo de desnutrição experimental foram utilizados no total 650 camundongos, sendo que para a análise hematológica, mielograma e imunohistoquímica foram utilizados individualmente, porém para a obtenção do número de células hematopoéticas necessário para cada ensaio de cultura e imunofenotipagem, foi proveniente do *pool* de 2 animais controle e 6 animais desnutrido.

4.2 Rações

As rações foram produzidas na forma de granulado, no Laboratório de Desenvolvimento e Produção Farmacêuticas do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. A caseína comercial (IKAB Chemical B.V., Germany) foi utilizada como fonte protéica das rações, sendo as mesmas complementadas com 0,15% de metionina e 0,2% de colina (GARCIA, 1992). Prepararam-se dois tipos de rações: Ração I (FRIED *et al.*, 1978; BORELLI *et al.*, 1995), contendo 20% de proteína, destinada a alimentar os animais do grupo controle ou nutrido e a Ração II (BORELLI *et al.*, 1995; MUÑOZ *et al.*, 1981), contendo 4% de proteína, destinada a alimentar o grupo desnutrido (Tabela 1). As misturas salínica e vitamínica utilizadas foram as recomendadas pela AIN-93 (REEVES *et al.*, 1993).

A concentração protéica presente nas rações foi analisada pela determinação do nitrogênio através do método de micro-Kjedahl, realizadas no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Tabela 1: COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DAS RAÇÕES I e II

COMPONENTES	RAÇÃO I (%) Normoprotéica	RAÇÃO II (%) Hipoprotéica
CASEÍNA	20	4
MISTURA SALÍNICA	4	4
MISTURA VITAMÍNICA	1	1
SACAROSE	10	10
ÓLEO DE MILHO	8	8
CELULOSE	1	1
AMIDO q.s.p.	100	100

As rações I e II foram complementadas com 0,15% de metionina, 0,2% de colina e 1% de ácido bórico.

Mistura salínica:

Carbonato de Cálcio* 357,0 g; Fosfato de potássio monobásico* 250,0 g; Cloreto de sódio*, 74,0; Sulfato de potássio* 46,6 g; Citrato de potássio monohidratado* 28,0 g; Óxido de magnésio* 24,0 g; Citrato férrico* 6,06 g; Carbonato de zinco* 1,65 g; Carbonato manganoso* 0,63g; Carbonato cúprico* 0,30 g; Iodato de potássio* 0,01 g; Selenato de sódio anidro* 0,01025 g; Paramolibdato de amônio tetra hidratado* 0,00795; Metassilicato de sódio monohidratado* 1,45 g; Sulfato de crômio e potássio doceca hidratado* 0,275g; Ácido bórico* 0,0815; Fluoreto de sódio* 0,0635; Carbonato de níquel* 0,0318; Cloreto de lítio* 0,0174; Venadato de amônio* 0,0066g; Sacarose* em pó 209,806g.

Mistura Vitamínica:

Ácido nicotínico* 3,0g, D-Pantotenato de Cálcio** 1,6 g; Cloridrato de piridoxina* 0,7g; Cloridrato de tiamina* 0,6 g; Riboflavina** 0,6g; Ácido Fólico** 0,2g; D-biotina** 0,02g; Vitamina B₁₂** 2,5 g; Vitamina E* 7500 U (30g); Vitamina A** 400.000 U (1,6g); Vitamina D3* 100.000 U (0,25 g); Vitamina K* 0,075g; Sacarose q.s.p. 1000,0g.

* Merck Chemical S.A.

** Sigma Chemical Company, U.S.A.

4.3 Indução da Desnutrição

Os animais foram distribuídos e alocados em gaioleiro metabólico sendo mantidos por um período de adaptação em que receberam ração I e água *ad libitum* e pesados a cada 72 horas (BORELLI *et al.*, 1995; ZUCAS *et al.*, 1969). Após a estabilização do peso corporal, os animais foram, aleatoriamente, separados em dois grupos: nutrido (N) ou Controle (C), que continuou a receber ração I e o grupo Desnutrido (D), que passou a receber ração II, hipoprotéica (BORELLI *et al.*, 1995; MUÑOZ *et al.*, 1981). Durante o período de indução da desnutrição, ambos os grupos permaneceram sob as mesmas condições ambientais (temperatura de 22° a 25°C, ciclo de luz claro-escuro, de 12 horas, recebendo água e as respectivas rações *ad libitum*).

O estado nutricional dos animais foi avaliado através da determinação do peso corporal, do consumo de ração e da determinação das concentrações de proteínas e albumina plasmática. O peso dos animais foi determinado a cada 72 horas em balança semi-analítica. O consumo de ração foi obtido através da diferença entre a quantidade de ração fornecida e a quantidade de ração não ingerida. Os animais do grupo experimental foram considerados desnutridos após a perda de 20 a 30% do peso corpóreo inicial (BORELLI *et al.*, 1995; ZUCAS *et al.*, 1969).

4.4 Determinação de Proteínas totais e albumina plasmática

A determinação da concentração plasmática de proteínas totais e albumina foi realizada em alíquotas de sangue colhido do plexo axilar dos animais, anestesiados previamente em câmara saturada com éter etílico. As amostras foram centrifugadas a 400 g, durante 10', em centrífuga para Eppendorf (MC-CV CELLM®). Após a centrifugação, o plasma foi separado, aliquotado e congelado a -20°C, para posterior análise. As proteínas totais foram determinadas pelo método do Biureto (GORNAL *et al.*, 1949) e a determinação da albumina foi realizada pelo método do Verde de Bromo Cresol (DOUMAS, 1971), sendo utilizado o sistema automatizado Cobas Mira Plus - ROCHE®.

4.5 Avaliação Hematológica

4.5.1 Determinação do Hemograma e Reticulócitos

Amostras de sangue foram obtidas por punção do plexo axilar de camundongos, previamente anestesiados com éter etílico, utilizando-se E.D.T.A. como anticoagulante. Essas amostras foram empregadas para a realização do hemograma e a contagem de reticulócitos, de acordo com as técnicas utilizadas no Laboratório de Hematologia Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (BAUER, 1980).

4.5.2 Obtenção de Células da Medula Óssea

Para a obtenção de células da medula óssea os animais controles e desnutridos foram previamente anestesiados em cuba saturada com éter etílico, exsanguinados e sacrificados por deslocamento cervical, sendo então levados até ambiente de fluxo laminar imersos em cuba contendo álcool iodado. Em condições assépticas, as células da medula óssea foram obtidas pela lavagem da cavidade femoral com meio Fischer (GIBCO®, USA) complementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab do Brasil®) e com 100 UI/mL de penicilina G sódica e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma® Chemical Company, EUA) e heparina a 50U (Liquemine®, Roche do Brasil). A suspensão celular foi colocada em tubos Falcon cuidadosamente homogeneizada com pipeta Pasteur e mantida em banho de gelo. As células obtidas foram utilizadas para realizar o mielograma, cultura de células, determinação citoquímica e imunofenotipagem.

Para os ensaios de proliferação em sistema de cultura líquida, as células não aderentes da medula óssea foram obtidas após a suspensão celular ter sido mantida em placa de 90 mm de diâmetro (Corning® Glass Works, USA), em estufa a 36,8°C e em atmosfera contendo 5% de CO₂, durante 50'. Enquanto que para realizar o mielograma, reações citoquímicas, ensaios clonais de células formadoras de colônias em meio semi-sólido e os

experimentos de imunofenotipagem, no entanto, não foi realizada a separação prévia de células aderentes, utilizando-se células totais de M.O.

4.5.3 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo teste de exclusão do azul de Tripiano 1%. Os resultados obtidos foram superiores a 90% de células viáveis para todos os ensaios.

4.5.4 Mielograma

Utilizando-se citocentrífuga (Incibrás®) prepararam-se lâminas com amostras da suspensão total das células, que foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) e peroxidase (método de Graham modificado). As células foram analisadas sob microscopia óptica convencional, efetuando-se a contagem de, no mínimo, 200 células por lâmina. As células obtidas da medula óssea foram quantificadas em hemocítmetro de Neubauer, após diluição de 1:20 em líquido de Türk, composto por solução de 1% de ácido acético glacial.

As células foram classificadas de acordo com Garcia (1992) e Borelli *et al.* (1995) em: células de mitose, células blásticas, granulócitos neutrófilos jovens (promielócito e mielócito), granulócitos neutrófilos em fase anel (metamielócito, bastonete), granulócitos segmentados, granulócitos eosinófilos, monócitos, linfócitos e plasmócitos, proeritroblastos e eritroblastos basófilo, policromático e ortocromáticos.

4.6 Avaliação Histopatológica Medular

Para a obtenção do material histológico procedeu-se à retirada dos esternos dos animais controle e desnutrido. Os esternos foram fixados em paraformaldeído 4% por 1 hora e, posteriormente, transferidos para álcool 70% até a inclusão. O material foi incluído em parafina, seguindo-se o processamento histológico convencional. As preparações histológicas foram

realizadas no Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Os tecidos foram emblocados em parafina e os cortes, de aproximadamente 5µm, corados pela Hematoxilina e Eosina (H.E.). Para as técnicas de imunocitoquímica de AgNOR e imunohistoquímica de PCNA, o esterno foi fixado com paraformaldeído a 4%, preparado no momento do uso, e descalcificação em ácido nítrico 5% por 3h.

As lâminas do material citológico para o AgNOR foram preparadas por citocentrifugação da suspensão celular da medula óssea de camundongos nutrido e desnutrido fixadas com Carnoy por 10', enquanto que as lâminas dos cortes histológicos foram desparafinizados para o PCNA e AgNOR em xilol 1 (15'), xilol 2 (10') e xilol/álcool 1:1 v/v (5'), em seguida hidratados em álcool absoluto (5'), álcool 95% (5'), álcool 70 % (5') e água deionizada (5'). Logo após, ambas as lâminas foram coradas pelo nitrato de prata. A seguir, submetidas a desidratação, em álcool 70% (5'), álcool 95% (5') e álcool absoluto (5') e recobertas com lamínulas.

4.6.1 Determinação imunocitoquímica do AgNOR

Realizaram-se várias modificações na técnica de coloração de Ploton *et al.* (1986) e Roussel *et al.* (1992), durante o período de padronização, como o fixador utilizado, tempo de exposição à prata e temperatura devido a precipitação. Na literatura existem relatos da utilização de diferentes fixadores, como glutaraldeído 4%, formalina 4% e 10%, e fixadores a base de álcool (DERENZINE, 2000), sendo que os melhores resultados foram obtidos com a utilização de Carnoy, no caso de material citológico, e paraformaldeído 4%, no caso de material histológico. Muitos trabalhos também relatam que, para redução do precipitado, deveriam ser utilizados menores tempos de exposição ao nitrato de prata e temperaturas altas (acima de 60 °C) (HOWELL e BLACK, 1980). Porém os melhores resultados obtidos com relação à presença de precipitados foram com tempo de exposição ao nitrato de prata de 25 minutos à 22°C. Para a identificação dos tipos celulares, testamos diversos corantes para a contra-coloração das

lâminas, sendo que o verde de malaquita foi o corante que possibilitou melhor contraste, permitindo maior precisão no reconhecimento morfológico, sem ter afetado a marcação das regiões organizadoras de nucléolos pela prata, cuja metodologia encontra-se em anexo.

Para a realização do teste de AgNOR todo o material foi previamente desmineralizado, sendo a vidraria utilizada imersa em ácido nítrico 30% durante 24 horas e, posteriormente, lavada com água desmineralizada obtida em filtro milli-Q®. A contagem de AgNORs foi realizada sob microscopia óptica convencional, efetuando-se a contagem de, no mínimo, 200 células por lâmina levando-se em consideração o número de marcações por células.

4.6.2 Determinação imunohistoquímica do PCNA

A técnica imunohistoquímica de PCNA foi realizada segundo procedimento realizado por Hsu (1981) em material histológico sendo os cortes desparafinizados e hidratados submetidos à etapa de bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 10 volumes por 30' em câmara escura a TA e lavados em PBS.

O anticorpo primário anti-PCNA, clone PC10 (DAKO A/S, Denmark) foi diluído 1:100 em 0,5 mL de azida sódica, 0,25 mL de albumina 5% e 12 mL de PBS), colocado sobre os cortes, os quais foram mantidos em câmara úmida escura à 10°C durante 12 h.

A amplificação da reação foi realizada utilizando-se o sistema de detecção StreptABComplex/HRP duet mouse/rabbit (DAKO K0942). Nesta etapa, os cortes foram incubados com o anticorpo biotinilado para imunoglobulina de coelho e camundongo diluído 1:100 em PBS por 30 minutos em câmara escura à temperatura ambiente. A seguir as preparações foram lavadas com PBS e a seguir incubados com solução contendo streptavidina (reagente A) e peroxidase (reagente B) diluído 1:100 em PBS 0,02M (pH 7,2) (preparado 30 minutos antes de seu uso). Procedeu-se a nova lavagem em PBS e a revelação foi realizada empregando-se solução 0,05% DAB (diaminobenzidina) por 5 minutos,

seguida por lavagem com PBS. Os cortes foram contra-corados com Hematoxilina de Harris sendo a seguir desidratados em soluções com concentração crescente de etanol e montadas com Entelan (Merck). Controles negativos foram incluídos em todos os experimentos e foram obtidos pela omissão do anticorpo, na etapa de incubação do anticorpo primário.

Para se obter o índice de proliferação (porcentagem de células marcadas), analisaram-se as lâminas sob a microscopia óptica em aumento de 1000x. A contagem foi realizada em três regiões diferentes: endosteal, peritrabecular e sinusoidal, avaliando-se em cada uma delas, 10 campos, num total de cerca de 2200 células.

4.7 Imunofenotipagem

4.7.1 Determinação das Populações Hematopoéticas da M.O. por Anticorpos Monoclonais

Os antígenos de superfície das populações hematopoéticas foram detectados utilizando-se uma série de anticorpos monoclonais (AcMo) (Quadro 2) e, seus respectivos controles isotípicos (Quadro 3) conjugados ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou a ficoeritrina (PE).

Nos experimentos de imunofenotipagem, foram utilizados uma alíquota de 10^6 células/mL de suspensão celular de células totais da M.O. e, também, de células obtidas dos ensaios de proliferação em sistema de cultura líquida (3° e 5° dia) e dos ensaios clonais de células formadoras de colônias em meio semi-sólido (7° e 14° dia) de células da MO de camundongos nutrido e desnutrido.

As amostras e os controles negativo de cadeia foram incubadas com anticorpos monoclonais, conforme especificação do fabricante ($\leq 1 \mu\text{g}$ de AcMo/ 10^6 células/mL), ao abrigo da luz, durante 20 minutos à temperatura ambiente (TA). Após esse período, as hemácias foram lisadas, adicionando-se 2mL de solução de lise a 10% (Lysing Solution®-Becton Dickinson) e incubando-se novamente os tubos, ao abrigo da luz durante 10 a 15'. Em

seguida, os tubos foram centrifugados a 400 G por 10', o sobrenadante descartado e o sedimento celular lavado duas vezes com PBS azida a 0,1%. O sedimento foi ressuspensão em 500 μ L de paraformaldeído a 1% e adquirido em citômetro de fluxo. Foram adquiridos um total de 10.000 a 30.000 eventos com citômetro de fluxo contendo laser de argônio de 488nm e 15mW modelo FACSCalibur (Becton Dickinson) do Laboratório de Imunopatologia da Fundação Hemocentro (São Paulo – Brasil).

Após a padronização e marcação individual foram realizados alguns prováveis painéis encontrados na literatura de diagnóstico de desordens hematológicas (CIVIN *et al.*, 1984; FARAHAT *et al.*, 1994) com a finalidade de caracterizar os estádios de diferenciação, as linhagens de células hemopoéticas primitivas e comprometidas com linhagem e a co-expressão de marcadores nessas células.

Tabela 2: Anticorpos monoclonais para análise imunofenotípica

CD	Descrição	Clone	Isotipo	Fluorocromo
CD45(LCA,Ly-5)	panleucocitário	30-F11	IgG 2b kappa de rato	FITC
CD 34	stem cell	RAM 34	IgG 2a kappa de rato	FITC
CD 34	stem cell	RAM 34	IgG 2a kappa de rato	PE
CD 38	primitivo	90	IgG 2a kappa de rato	PE
CD117	c- kit	2B8	IgG 2b kappa de rato	FITC
CD14	Monocítico	rmC5-3	IgG 1 kappa de rato	PE
CD71	Transferrina	C2	IgG 1kappa de rato	PE
Ter-119	Glicoforina	C55BI	IgG 2b kappa de rato	PE
CD2	Linfóide T	RM2-5	IgG 2b kappa de rato	FITC
CD3 e	Linfóide T	145-2C11	IgG de hamster	FITC
CD19	Linfóide B	1D3	IgG 2 a kappa de rato	PE
CD5 (Ly-1)	Linfóide T	53-7.3	IgG 2 a kappa de rato	FITC
NK1-1	Natural killer	PK 136	IgG 2a kappa de rato	PE
CD22.2(Lyb-8.2)	Linfóide B	Cy34.1	IgG1 kappa de camundongo	PE
CD4 (L3T4)	Linfóide B	GK1.5	IgG 2 a kappa de rato	FITC
CD8a(Ly-2)	Linfóide T	53-6.7	IgG 2 a kappa de rato	PE
CD11 a	adesão	I21/7	IgG 2 a kappa de rato	FITC

CD - designação de diferenciação: CD45, marcador panleucocitário; CD34 e CD117, marcadores não-específicos primitivo; CD14, marcador mielomonocítico; CD3, CD7, CD2, CD4, CD8 marcadores de células T; CD19,CD22.2 marcador de célula B; CD 71, marcadores de ativação; CD 11 a, marcadores de adesão; TER-119, marcadores eritrocíticos.

Tabela 3: Controles Isotípicos de cadeia.

Controle isotípico de cadeia	Clone	Fabricante	Fluorocromo
IgG 2 a kappa de rato	R35-95	BD	FITC
IgG 1 kappa de camundongo (anti-KLH)	A112-2	BD	PE
IgG de Hamster (anti-TNP)	A112-2	BD	PE
IgG 2 b kappa de rato	A95-1	BD	FITC
IgG 1 kappa de rato	R 3-34	BD	PE
IgG 2 a kappa de rato	KLH/G2a-1-1	SBA	PE

Controles isotípicos de cadeia - IgG 2 a kappa de rato FITC: Controle negativo da cadeia isotípica IgG 2a kappa de rato conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína; IgG 2 a kappa de rato PE: Controle negativo da cadeia isotípica IgG 2a kappa de rato conjugado a ficoeritrina; IgG 2 b kappa de rato FITC: Controle negativo da cadeia isotípica IgG 2b kappa de rato conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína; IgG 1 kappa de rato PE: Controle negativo da cadeia isotípica IgG 1 kappa de rato conjugado a ficoeritrina; IgG de hamster FITC: Controle negativo da cadeia isotípica IgG de hamster conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína; IgG 1 kappa de camundongo PE: Controle negativo da cadeia isotípica IgG 1 kappa de camundongo conjugado a ficoeritrina.

4.7.2 Aquisição e análise de células por citometria de fluxo.

O citômetro de fluxo é constituído de quatro sistemas principais: (1) fluido - permite a introdução das células a serem estudadas em fila única circundadas por uma solução salina isotônica; (2) óptico – capaz de gerar e coletar os sinais de luz; (3) eletrônico - converte os sinais ópticos em eletrônicos; (4) microcomputador. Assim, todos os atributos celulares são medidos por um sistema óptico, e o sinal de luz gerado é registrado em um sistema eletrônico. O sistema de computadores acoplado, por sua vez, é responsável pela aquisição, armazenamento e análise dos dados obtidos.

Os sinais ópticos mais freqüentes utilizados são capazes de detectar informações sobre o tamanho e a granulosidade celular. Quando a dispersão de luz é medida em ângulo reto (90°) em direção ao feixe de luz do laser, é chamada de dispersão lateral (side scatter channel – SSC) e está correlacionada com a complexidade interna da célula. Por outro lado, quando a dispersão de luz é medida em ângulos pequenos (0 a 1°) do ponto do qual o feixe de luz do laser cruza a célula é chamado de dispersão frontal (forward scatter channel– FSC) e correlaciona-se com o tamanho celular. A caracterização apropriada das células está baseada na expressão dos seus antígenos de superfície, citoplasmáticos e nucleares, detectados por um sinal óptico especial. Esses sinais fluorescentes são gerados por meio de anticorpos marcados com fluorocromos que reagem especificamente com os antígenos celulares. As células marcadas com os fluorocromos absorvem a luz incidente do laser e emitem um comprimento de onda maior, denominado fluorescência.

O sistema eletrônico permite que os sinais fluorescentes emitidos pelas células sejam coletados e convertidos em pulsos eletrônicos; estes são então digitalizados e transformados em uma linguagem que pode ser prontamente interpretada pelo usuário. O sistema de computador acoplado ao citômetro, além de controlar todas as operações instrumentais, possibilita o armazenamento, a apresentação e análise dos dados coletados, utilizando programas (softwares) especiais. Na análise dos dados vale destacar o papel da janela eletrônica (gate). Essa janela, criada em um grupo de células

com características semelhantes, permite o isolamento e análise desse grupo de células; considerando-se o tamanho celular e granulosidade interna, são discriminados em amostras de sangue periférico: os linfócitos, os monócitos e granulócitos.

A calibração dos detectores do citômetro foi realizada utilizando-se partículas comerciais conhecidas como micro-esferas plásticas ou *beads* sendo usualmente sensibilizadas com fluorocromos. São empregadas para ajustar os parâmetros dos detectores de dispersão da luz frontal (FCS) e lateral (SSC), fotodetectores de fluorescência-1 (FL1) e fluorescência-2 (FL2) sendo capazes de captar comprimentos de onda entre 494 nm e 517 nm emitidos pelo fluorocromo FITC e entre 565 nm e 660 nm emitidos pelo fluorocromo PE, respectivamente.

Utilizando o programa de aquisição *CellQuest*, estes sinais assumem a forma de *dot-plot* nos citogramas. No citograma formado por FSC na abscissa e SSC na ordenada (representantes gráficos das células) a distribuição de pontos concentram - se em locais de acordo com o tamanho e a complexidade interna das células em estudo. Nesse citograma, a população de interesse (região selecionada R1, região selecionada R2 e região selecionada R3) é delimitada e, em seguida, monitorada em outro citograma bidimensional logarítmico em escala 100 a 104 formado pelos parâmetros de FL1 na abscissa e FL2 na ordenada para a compensação final das fluorescências.

Os tubos contendo células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos coradas (ligadas ao AcMO conjugados a fluorocromos) ou não (controle negativo) foram seqüencialmente colocado na câmara do citômetro para que as células fossem adquiridas. As células coradas com AcMO conjugados a FITC situavam-se no quadrante inferior direito (LR), as coradas com AcMO conjugados ao PE, no superior esquerdo (UL) as duplamente coradas com AcMO a FITC e PE, no superior direito (UR) e as não coradas (negativas), no quadrante inferior esquerdo (LL).

4.7.3. Determinação da Apoptose por citometria de fluxo

Os experimentos de apoptose foram realizados com a utilização do Kit APO-DIRECT™ (Becton Dickinson) para citometria de fluxo onde foram utilizadas uma alíquota de 10^6 células/mL de suspensão celular de células totais da M.O. de camundongos nutrido e desnutrido. À suspensão, foram adicionados 5mL de paraformaldeído (Sigma®, Chemical Company-USA), 1% (w/v), livre de metanol e diluído em PBS, sendo mantida em banho de gelo por 15'. Após este tempo, a suspensão foi centrifugada por 5', a 400 G. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 5mL de meio de cultura Fischer (Sigma® Chemical Company-USA) e lavadas duas vezes. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas, acrescentando-se 5mL de etanol (Merck-Alemanha) a 70%, gelado. As células foram mantidas em banho de gelo por um período mínimo de 30'. Em seguida, foram centrifugadas por 5' a 300G e a 4°C, sendo o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 1mL de tampão de lavagem (Pharmingen® A Becton Dickinson Company-USA), realizando nova centrifugação e o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 50µL de solução corante (FITC-dUTP na presença da enzima TdT- Pharmingen® A Becton Dickinson Company-USA), e incubadas por 60' a 37°C, adicionando-se, a seguir, à suspensão 1mL de tampão de lavagem (Pharmingen® A Becton Dickinson Company-USA). A suspensão celular foi centrifugada por 5', a 400G e a 4°C, por duas vezes. As células foram ressuspensas em 0,5mL de solução de PI/RNase A (Pharmingen® A Becton Dickinson Company-USA) e incubadas por 30' em TA. Em seguida, a suspensão foi transferida para tubos de poliestireno de fundo redondo (Becton Dickinson), homogeneizada e mantida à 4°C, no máximo por 3 h, até o momento da leitura em citômetro de fluxo.

Em decorrência de problemas no controle positivo fornecido pelo Kit, padronizou-se um controle positivo, a partir de células obtidas da medula óssea de camundongos na concentração de 1×10^6 células/mL, sendo estas incubadas por um período de 6 horas, a 37°C com thapsigargin diluído 1:1000. Da suspensão celular utilizada como controle negativo

(Pharmingen® A Becton Dickinson Company-USA), foi removido 1mL e centrifugado em tubo Falcon por 5' a 400G. O sobrenadante foi desprezado e as células lavadas com 1mL de tampão de lavagem (Pharmingen® A Becton Dickinson Company-USA), duas vezes. Por último, células foram ressuspensas em 50µL de solução corante preparada no momento e uso segundo protocolo kit Apo-direct™ (Pharmingen® A Becton Dickinson Company-USA).

4.8 Cultura de Células

4.8.1 Fatores de crescimento de células hematopoéticas

Foram empregados como fatores de crescimento:

1. **rmGM-CSF** (fator estimulador de colônia grânulo-monocítica recombinante murino Lote nº: 078H0161(Sigma Chemical Company®, EUA).
2. **rmG-CSF** (fator estimulador de colônia granulócita recombinante murino. Lote nº 046H6694 (Sigma Chemical Company®, EUA).
3. **rm IL3** (Interleucina –3 recombinante murino) (Sigma Chemical Company®, EUA).
4. **Eritropoietina** recombinante humana (EPO), Cristália Brasil.

A concentração efetiva do fator de crescimento, que promove um aumento de 50% no crescimento celular (EC_{50}) dos fatores de crescimento, fornecido pelos fabricantes para titulação das curvas de crescimento são para rmGM-CSF (0,05- 0,5 ng/mL), rmG-CSF (0,01- 0,1 ng/mL), rmIL-3 (0,025 – 0,10 ng/mL) e EPO (1- 4 UI).

Aos fatores de crescimento liofilizados, foram adicionados 1 mL de meio de cultura Fischer e, posteriormente, as soluções estoques foram aliquotadas em tubos tipo Eppendorf e armazenadas a -40° C. A avaliação da capacidade proliferativa dos fatores de crescimento foi testada com células de M.O. de camundongos nos procedimentos de cultura líquida e nos ensaios clonogênicos em metilcelulose, a partir dos valores mínimos e

máximos informadas pela curva titulada pelo fabricante, até a obtenção da EC₅₀ da combinação dos fatores de crescimento para essas células.

4.8.2 Ensaio de cultura líquida

Em placas de 24 poços de baixa aderência (SARTDEST®, USA) foram distribuídas, em quadruplicata, 5×10^4 células hematopoéticas nucleadas, não aderentes, obtidas conforme item 4.5.2, em meio Fisher suplementado com 10% de soro bovino fetal, na presença de IL-3 (0,1 ng/mL), EPO (1 UI), GM-CSF (0,2 ng/mL) e G-CSF (2 ng/mL), em volume final de 1 mL/poço. As placas de cultura, em número de 4, foram mantidas por 120 horas a 36,8°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. O controle negativo continha todos os reagentes e células, exceto citocinas. O número de células viáveis, pelo teste de azul de Trypan, foi avaliado a cada 24 h durante 5 dias. De cada poço foram obtidas alíquotas, das quais, após citocentrifugação, foram preparadas lâminas de microscopia a serem coradas pelo May-Grunwald-Giemsa, modificado por Rosenfeld (ROSENFELD, 1947) e para a reação citoquímica da peroxidase, método de GRAHAM modificado.

As células foram analisadas sob microscopia óptica convencional, durante os 5 dias de cultura, contando-se no mínimo 200 células em cada lâmina, conforme classificação de Garcia (1992) e Borelli *et. al.* (1995).

4.8.3 Ensaios Clonogênicos em Meio Semi-Sólido

O ensaio GEMM-CFC foi realizado de acordo com protocolo desenvolvido em sua tese de mestrado por Masumoto (1998).

As células nucleadas da medula óssea dos grupos nutridos e desnutridos (1×10^5 células/mL), obtidas pela lavagem femoral, foram utilizadas para os ensaios clonais em meio semi-sólido (CSS). Após a mistura de todos os componentes, foi realizado o plaqueamento a uma concentração de 5×10^5 células/mL, em placas de cultura de plástico de 35 mm (Nunc, IL, E.U.A.) contendo metilcelulose (Fischer, 4000 centipoises, NJ,

E.U.A.), 30% soro bovino fetal (GIBCO, Grand Island, NY, E.U.A.), 1% de albumina bovina sérica (Boeringher-Manhein, IN, E.U.A.), solução 10^{-4} M de metilprednisolona (Abbott, São Paulo), solução de 10^{-2} de 2-mercaptoetanol (GIBCO, Grand Island, NY, E.U.A.), sendo as células estimuladas com os fatores de crescimento rmGM-CSF, na concentração de 0,2 ng/mL; rmG-CSF, na concentração de 0,2 ng/mL; EPO, na concentração de 1UI e IL-3, padronizada em 0,1 ng/mL, denominando essa combinação de CFU-Mix. O controle negativo continha todos os reagentes e células, exceto citocinas.

Para os ensaios em meio semi-sólido foram utilizadas células totais. O número de "clusters" e colônias, além do número de células viáveis e a morfologia, foram avaliados nos dias 7, 14 e 21 da cultura. As formações compostas por um mínimo de 50 células, foram consideradas colônias; aquelas contendo 2 a 49, foram considerados "clusters" (CHIMELLI et al., 1994). As colônias foram definidas, inicialmente, pelo seu aspecto morfológico como sendo GM-CSF (granulócitos e/ou macrófagos), G-CFU- (granulócitos), BFU-E (dois ou mais "cluster" de células eritróides) e CFU-Mix com colônias mistas.

As células durante os 7, 14 e 21 dias de cultura, foram analisadas sob microscopia óptica convencional, contando-se, no mínimo, 200 células em cada lâmina. As células foram classificadas conforme classificação de Garcia (1992) e Borelli *et. al.* (1995).

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos da cultura líquida e ensaios clonogênicos da medula óssea de camundongos nutrido e desnutrido foram realizados pela análise fatorial com 3 fatores, com 4 repetições, onde os fatores foram:

Fator a: grupo nutrido e desnutrido

Fator b: utilização ou não-utilização dos fatores de crescimento hematopoéticos compreendendo o CFU-MIX (IL-3; EPO; GM-CSF e G-CSF)

Fator c: Dias em cultura

Os dados foram analisados pela ANOVA e os níveis **a** e **b** foram comparados entre si pelo Teste de Duncam ($p \leq 0,005$), e para o fator **c** quando apresentou mais de três níveis, foi ajustado uma equação de regressão capaz de verificar a tendência de comportamento do crescimento nas variáveis analisadas. (ANEXO II)

O efeito da nutrição no estudo da caracterização da desnutrição, os dados hematológicos e a citometria de fluxo foram comparados pelo Teste "t" presumindo variâncias diferentes, sendo considerado estatisticamente significativo quando ($p \leq 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Avaliação da Concentração Protéica das Rações

Os resultados da análise da concentração protéica das rações foram de $18\% \pm 1,42$ (n=3) para a Ração I (controle) e de $4,0\% \pm 0,6$ (n=5) para a Ração II (hipoprotéica). As rações foram analisadas no Departamento de Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

6.2 Consumo de ração, Consumo diário de Proteína e Peso corporal

Camundongos mantidos com dieta hipoprotéica apresentaram redução no consumo diário de ração (Gráfico 6B) e significativa redução na ingestão de proteínas (Gráfico 6A). Os animais do grupo desnutrido apresentaram significativa perda de peso corporal ($-23,2\% \pm 1,2$) comparados aos respectivos controles ($+2,7\% \pm 0,3$), como mostra o gráfico 7.

6.3 Avaliação da Concentração de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais, albumina e globulina foi maior no grupo desnutrido sendo a diferença considerada estatisticamente significativa. A relação albumina/globulina (A/G) foi maior no desnutrido, fato este importante para a caracterização da desnutrição experimental nestes animais (tabela 4).

Tabela 4: Resultado, em valores médios da concentração de proteínas totais, albumina, globulina expresso em g/dL e relação albumina/globulina presentes no soro de animais nutridos e desnutridos.

	NUTRIDO	DESNUTRIDO	p
Proteínas totais (g/dL)	$7,8 \pm 0,4$	$4,3 \pm 0,3^*$	$\leq 0,01$
Albumina (g/dL)	$5,0 \pm 0,23$	$3,4 \pm 0,1^*$	$\leq 0,05$
Globulina (g/dL)	$2,8 \pm 0,16$	$0,9 \pm 0,08^*$	$\leq 0,05$
Albumina/Globulina	1,78	3,78 *	$\leq 0,05$

* Diferença significativa em relação ao grupo nutrido, Teste "t" Student.

Gráfico 6 - Resultado, em valores médios, **A** - do consumo diário de proteínas (expresso em g/dia/animal) e **B** - do consumo diário de ração (expresso em grama/dia/animal) de camundongos Swiss, adultos, machos. Os animais do grupo **controle** (n=35 animais) e **desnutrido** (n=62 animais) receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoproteica (contendo 4% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. Valores monitorados a cada 48 horas durante período de 14 dias e estão expressos como média $\pm$ e.p.m. A diferença do consumo diário de proteínas entre os grupos foi significativa (* $p < 0,05$, teste "t" Student).

Gráfico 7 - Resultado, em valores médios, da variação do peso corporal (expresso em porcentagem) dos camundongos Swiss, adultos, machos. Os animais do grupo **controle** (n=35 animais) e **desnutrido** (n=62 animais) receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoproteica (contendo 4% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. Valores monitorados a cada 48 horas durante período de 14 dias e estão expressos como média $\pm$ e.p.m. A diferença observada da variação do peso corporal entre os grupos foi significativa (* $p < 0,001$, teste "t" Student).

6.4 Avaliação do Sangue Periférico

A análise do quadro hematológico periférico dos animais desnutrido revelam leucopenia e anemia: o número de leucócitos totais e a distribuição de leucócitos foi menor nos animais do grupo desnutrido (Gráfico 8). Os animais do grupo desnutrido apresentaram valores significativamente menores para a concentração de hemoglobina (g/L) e do volume hematócrito (%) (Gráfico 9). Em relação ao número de hemácias não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Os valores de reticulócitos (nutrido $6,0 \pm 0,23\%$ e desnutrido $0,30 \pm 0,05\%$) e o número de plaquetas (nutrido $810.000 \pm 31,2 \text{ mm}^3$ e desnutrido $520.000 \pm 25\%$) foram estatisticamente significante entre os grupos analisados (Gráfico 10).

6.5 Avaliação Morfológica da M.O.

A análise do quadro hematológico medular dos animais desnutrido evidenciou uma hipoplasia. Os animais do grupo desnutrido apresentaram significativa redução no número de células nucleadas blásticas (Gráfico 11A e B). No setor granulocítico neutrofílico e eosinófilos, observamos redução significativa nos animais desnutridos quando comparados com os respectivos controles (Gráfico 11 C,D,E,F).

A série eritrocitária dos animais desnutridos apresentou significativa redução em relação aos animais controles (Gráfico 11G). NA série linfoplasmocitária (Gráfico 11H) os animais desnutridos apresentou redução estatisticamente significativamente em relação aos animais controles. A série monocítica foi reduzida nos animais desnutridos, porém sem diferença significativa em relação aos animais controles (Gráfico 11 I).

LEUCOGRAMA

Gráfico 8 - Resultado, em valores médios $\pm$ epm, do número de leucócitos totais e dos diferentes tipos leucócitos (/mm³), presentes no sangue periférico de camundongos Swiss, adultos, machos. Os animais do grupo controle (n= 20 animais) e desnutrido (n= 25 animais) receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoproteica (contendo 4% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. (A) número de leucócitos totais; (B) Neutrófilo Bastonete; (C): Neutrófilo Segmentado; (D) Eosinófilo; (E) Monócito; (F) Linfócito. A diferença observada entre os grupos foi significativa (*p $\leq$ 0,05, teste "t" Student).

ERITROGRAMA

Gráfico 9 - Resultados, em valores médios $\pm$ e.p.m., do número de eritrócitos (G); da concentração de hemoglobina (H) do volume hematócrito (I); do Volume Corpuscular Médio - VCM (J); da Hemoglobina Corpuscular Média - HCM (K) e da Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média CHCM (L) do sangue periférico de animais do grupo nutrido e do grupo desnutrido. Os animais do grupo nutrido e desnutrido receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoproteica (contendo 4% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. A diferença observada entre os grupos foi significativa (* $p \leq 0,05$, teste "t" Student).

Gráfico 10 - Resultado, em valor médios $\pm$ epm, do número de reticulócitos (%) e do número de plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$), presentes no sangue periférico de camundongos Swiss, adultos, machos. Os animais do grupo controle ($n=20$ animais) e desnutrido ($n=25$ animais) receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoproteica (contendo 4% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. A diferença observada entre os grupos foi significativa ($*p \leq 0,05$, teste "t" Student)

Tabela 5 - Resultado, em valores médios, ($\times 10^6/\text{mL}$) do número total de células nucleadas e dos diferentes tipos celulares ($\times 10^5/\text{mL}$) presentes na medula óssea de camundongos do grupo nutrido ($n=20$ animais) e desnutrido ($n=20$ animais) que receberam, respectivamente, a ração I e a ração II.

ANÁLISE MORFOLÓGICA	NUTRIDO	DESNUTRIDO
Células totais	$9,81 \pm 1,8 \times 10^6/\text{mL}$	$4,76 \pm 0,9 \times 10^6/\text{mL} *$
Formas blásticas	$5,0 \pm 0,84 \times 10^5/\text{mL}$	$2,0 \pm 0,39 \times 10^5/\text{mL} *$
Formas jovens de neutrófilo	$6,0 \pm 0,97 \times 10^5/\text{mL}$	$3,5 \pm 0,29 \times 10^5/\text{mL} *$
Formas em anel de neutrófilo	$20,8 \pm 4,5 \times 10^5/\text{mL}$	$11,05 \pm 1,53 \times 10^5/\text{mL} *$
Formas segmentada de neutrófilo	$18,0 \pm 2,69 \times 10^5/\text{mL}$	$13,0 \pm 1,43 \times 10^5/\text{mL} *$
Eosinófilos	$1,56 \pm 0,42 \times 10^5/\text{mL}$	$0,7 \pm 0,13 \times 10^5/\text{mL} *$
Eritroblastos	jovens	$0,9 \pm 0,15 \times 10^5/\text{mL}$
	policromático	$0,25 \pm 0,05 \times 10^5/\text{mL} *$
	ortocromático	$0,8 \pm 0,09 \times 10^5/\text{mL} *$
Linfócitos	$6,2 \pm 0,95 \times 10^5/\text{mL}$	$0,2 \pm 0,06 \times 10^5/\text{mL} *$
Monócitos	$15,0 \pm 1,46 \times 10^5/\text{mL}$	$15,8 \pm 0,70 \times 10^5/\text{mL}$
Plasmócitos	$0,9 \pm 0,24 \times 10^5/\text{mL}$	$0,35 \pm 0,18 \times 10^5/\text{mL} *$
	$0,1 \pm 0,01 \times 10^5/\text{mL}$	$0,01 \pm 0,0 \times 10^5/\text{mL} *$

* Diferença significativa em relação ao grupo controle, $p \leq 0,05$.

MIELOGRAMA

Gráfico 11 - Resultado, em valores médios $\pm$ e.p.m do número total de células nucleadas ($\times 10^6/\text{mL}$) (A) e dos diferentes tipos celulares ($\times 10^5/\text{mL}$) (B a I) presentes na medula óssea de camundongos Swiss, adultos, machos. Os animais do grupo **controle** (n=13 animais) e **desnutrido** (n=18 animais) receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoproteica (contendo 4% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. (A) - número total de células nucleadas viáveis; (B)- número de células blásticas; (C)- número de neutrófilos jovens; (D) - número de neutrófilos em anel; (E) - número de neutrófilos segmentados; (F) - número de eosinófilos; (G) - número de eritroblastos; (H) - número de células linfocitárias e (I) - número de células mono-macrofágicas. A diferença observada entre os grupos foi significativa (*p ≤ 0,05, teste "t" Student).

Figura 12 - Fotomicrografia de células da medula óssea de camundongos **nutridos** e **desnutridos**, respectivamente. Coloração May-Grünwald Giemsa modificado por Rosenfeld (aumento 500x).

6.6 Regiões organizadoras de nucléolo marcadas pela prata (AgNORs) e antígeno celular de proliferação nuclear (PCNA) em células da medula óssea.

Os animais do grupo desnutrido (n=10) apresentaram menor número de regiões organizadoras de nucléolo marcadas pela prata por célula, sendo essa diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle (n=10) (Gráfico 13).

Gráfico 13: Resultados, em valores médios e erro padrão da média (e.p.m.), do número de regiões marcadas pela prata (AgNOR) por célula. ** Resultados significantes com $p < 0,001$ (teste "t" Student).

As células provenientes da medula óssea de animais do grupo desnutrido (n=6) apresentaram menor índice de proliferação sendo estatisticamente significativa em relação ao controle (n=5) (Gráfico 14). Essa diferença foi significativa para as três regiões analisadas (Gráfico 15).

Gráfico 14: Resultados, em valores médios e erro padrão da média, do índice de proliferação celular para células hematopoéticas de medula óssea. ** Resultados significantes com $p < 0,0001$ (teste "t" Student).

Gráfico 15 – A - Resultados, em valores médios e erro padrão da média, do índice de proliferação celular para células hematopoéticas da região do endóstio. B - Resultados, em valores médios e erro padrão da média, do índice de proliferação celular para células hematopoéticas da região paratrabecular. C - Resultados, em valores médios e erro padrão da média, do índice de proliferação celular para células hematopoéticas da região sinusoidal. *Resultados significantes com $p < 0,01$ (teste “t” Student). **Resultados significantes com $p < 0,001$.

A medula óssea de camundongos pertencentes ao grupo controle, apresentou-se histologicamente normal para a idade, como mostra a figura 16. Contudo, nos animais desnutridos observam-se alterações histológicas: um maior número de adipócitos na MO em relação ao controle e, contrariamente, uma diminuição da celularidade total com redução do espaço medular. Confirmando os dados obtidos no mielograma, na análise histológica evidencia-se uma medula óssea atrófica, com comprometimento de todas as linhagens hematopoéticas. Em cortes histológicos, corados pelo HE, as áreas intersticiais foram preenchidas por material de aspecto granular e ligeiramente acidófilo, disposto entre elementos hematopoéticos, caracterizando a chamada degeneração gelatinosa ou hialina da medula óssea (Figura 16).

Figura 16: Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos nutridos e desnutridos, respectivamente. Coloração Hematoxilina Eosina. (Aumento de 200 x).

6.7 Análise imunofenotípica em ensaios *ex vivo*

O perfil das diferentes populações celulares não marcadas medula óssea de camundongos nutrido e desnutrido, obtidos por citometria de fluxo, encontram-se nas figuras 17 e 18. Constatam-se diferenças entre as populações analisadas, nas janelas eletrônicas R1, R2 e R3, entre os grupos nutrido e desnutrido, evidenciando-se 3 regiões: a R1 contendo linfócitos e blastos, a R2 com células imaturas mielóides e R3 com granulócitos mais diferenciados.

Figura 17: Representação gráfica do resultado da imunofenotipagem da população total de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. A imunofenotipagem mostra as regiões selecionadas – gate R1, gate R2 e gate R3 - das populações celulares não marcadas com fluorocromos. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Dispersão lateral (side scatter channel -SSC - ângulo reto 90°) e Dispersão frontal (forward scatter channel - FSC - ângulos pequenos 0,5 a 1,0°).

Desnutrido

Nutrido

Figura 18: A imunofenotipagem mostra a representação gráfica as regiões selecionadas – gate R1, gate R2 e gate R3 - das populações celulares da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos não marcadas com fluorocromos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. Gráfico da expressão da porcentagem de células nas regiões selecionadas R1, R2 e R3 dos grupos nutridos e desnutridos. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Dispersão lateral (side scatter channel -SSC- ângulo reto 90°) e Dispersão frontal (forward scatter channel - FSC - ângulos pequenos 0,5 a 1,0°).

A imunofenotipagem demonstra, na figura 19, a presença de 2 populações de CD45, nos ensaios *ex vivo* de células de camundongos nutridos, em região selecionada (gate R1). Porém, a análise imunofenotípica em células oriundas de animais desnutridos mostra diminuição significativa da população de células CD45⁺ de baixa intensidade de fluorescência (4,16%) em relação ao controle, sendo o número total de células positivas para o antígeno CD45 do grupo desnutrido de 89,65% em R1. No grupo nutrido há distinção entre linfócitos maduros (67,62%) de células positivas para bastos (29,63%) que expressam CD45 de intensidade de fluorescência mais baixa.

Figura 19: Representação gráfica da imunofenotipagem de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. Gráfico de dispersão (CD45/SSC) da distribuição das populações presentes na amostra: densidade antigênica do AcMo panleucocitário CD45 versus granulose celular. A imunofenotipagem mostra a análise da janela eletrônica (gate R1), com positividade de células **CD45⁺** no grupo nutrido, que permite a distinção entre linfócitos maduros, que expressam CD45 de alta intensidade (LR= 67,62%) e blastos (LR=29,63%) (**SETA**), que expressam CD45 de intensidade mais baixa. No grupo desnutrido a redução de células CD45⁺ de intensidade mais baixa (4,12%). IgG 2b Kappa de rato FITC- Controle negativo da cadeia isotípica IgG 2b kappa de rato conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (**SETA** R1-LL= 98,85%; **SETA** R2-LL=98,55%; **SETA** R3=97,02%).

A figura 20 mostra o gráfico de dispersão celular (CD34/SSC) com a expressão de CD34 *versus* granularidade interna. Evidencia-se há expressão de células positivas CD34 nos grupos nutrido (LR=6,33% e 54,90%) e redução da positividade de células no grupo desnutrido (LR=3,70% e 47,38%), em R1 e R2, respectivamente (Figura 20).

Figura 20: Gráfico de dispersão (CD34/SSC) mostrando a distribuição das populações presentes na amostra: densidade antigênica do AcMo CD34 (stem cell) *versus* granularidade interna. A imunofenotipagem mostra as análises das janela eletrônica - gate R1 e gate R2- na forma de "dot plot" com a expressão de células CD34⁺ nos grupos nutrido (LR=6,33% e 54,90%) e desnutrido (LR= 3,70% e 47,38%) nas janelas eletrônicas R1 e R2, respectivamente.

O gráfico de dispersão celular (CD117/SSC) demonstra a expressão de CD117 *versus* granularidade interna, cujo número de células positivas para o antígeno CD 117 nos grupos nutrido foi de 6,33% e 54,90% e desnutrido 3,70% e 47,38%, em R1 e R2, respectivamente, como mostra a figura 21.

Figura 21: Representação gráfica da imunofenotipagem de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Gráfico de dispersão (CD117/SSC) mostrando a distribuição das populações presentes na amostra: densidade antigênica do AcMo CD117 (c-kit) versus granulosidade celular. A imunofenotipagem mostra as análises das janelas eletrônica – gate R1 e gate R2-na forma de “dot plot” com a expressão e positividade de células para o antígeno CD117 nos grupos nutrido (LR=93,44% e 83,68%) e desnutrido (LR= 3,70% e 38,38%) nas janelas eletrônicas R1 e R2, respectivamente. IgG 2b Kappa de rato FITC- Controle negativo da cadeia isotípica IgG 2b kappa de rato conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína para as janelas eletrônicas R1 (LL=98,85%) e R2 (LL=98,55%).

Na análise imunofenotípica observa-se a redução de células duplamente marcadas pelos antígenos CD45/34 no grupo desnutrido. Porém, com a dupla marcação CD45/CD38 e CD117/CD38, os resultados mostram positividade e células em diferentes estádios no grupo nutrido. No grupo desnutrido, evidencia-se células com intensidade de fluorescência mais alta com a presença de duas populações celulares de CD38⁺. Além disso, através da marcação CD117/CD38, observa-se à baixa positividade de células duplamente marcadas no desnutrido (UR=14,9% e 25,41%) em relação ao controle (UR=71,21% e 90,67%) em R1 (Figura 22) e R2 (Figura 24), respectivamente.

O número de células positivas foram reduzidas para os painéis de dupla marcação CD34/CD14, CD34/CD19 e CD117/CD19 (Figura 23), na janela eletrônica R1, cujos resultados para os antígenos CD34/CD19 foram de 2,8% e 15,53%, para CD 117/CD19 de 24,70% e 6,80% e para CD34/NK1-1 de 1,30% e 0,47%, no grupo nutrido e desnutrido, respectivamente. A figura 25 mostra na região R2 os resultados da dupla marcação CD34/CD14 (UR=2,6%;2,83%); CD34/CD19 (UR= 1,60%; 2,44%) e CD 117/CD19 (UR=3,20%;1,35%) para o grupo nutrido e desnutrido, respectivamente.

Figura 22: Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. A análise imunofenotípica mostra células positivas para a dupla marcação (SETA) CD34/CD45 (UR= 1,962 e 0,98%), CD38/CD45 (UR=83,44% e 89%); CD38/CD117 (UR=71,21% e 14,9%) e CD34/CD117 (UR=0,89 e 0,96%) para o grupo nutrido e desnutrido , respectivamente.

Figura 23: Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. a partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gate R1) com a presença de células duplamente marcadas (**SETA**) CD34/NK1-1 (UR=1,30% e 0,47%), CD34/CD19 (UR= 2,8 e 15,53%) e CD 117/CD19 (UR= 24,70% e 6,80%) para o grupo nutrido e desnutrido, respectivamente.

Figura 24: Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. a partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gate R2) com a expressão de células duplamente marcadas com CD38/CD45 (UR=89% e 93,2%); CD38/CD117 (UR=90,67% e 25,41%) e CD34/CD117 (UR=8,10% e 11,25%) para o grupo nutrido e desnutrido, respectivamente.

Figura 25: Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. a partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gate R2) com a expressão da dupla marcação CD 34/CD14 (UR=2,6% e 2,83%); CD34/CD19 (UR=1,60% e 2,44%) e CD117/CD19 (UR=3,20% e 1,35%) para o grupo nutrido e desnutrido, respectivamente.

Os resultados da figura 26 mostram positividade para as células obtidas dos grupos nutridos e desnutridos na expressão do antígeno CD11a em todas as regiões selecionadas: grupo nutrido (LR=82,76; 98,33 e 99,73%) e desnutrido (LR= 93,46;96,22 e 99,23%) nas janelas eletrônicas R1, R2 e R3, respectivamente. Além disso, observamos na R1 no grupo desnutrido células em diferentes estádios de diferenciação (Figura 26).

Na figura 27, os resultados da análise da imunofenotipagem mostram em região selecionada R1 uma diminuição acentuada na expressão do marcador Ter119 nos ensaios *ex vivo* de células da M.O. de animais desnutridos - grupo nutrido (UL=39,85%) e desnutrido (UL=3,01%). A análise imunofenotípica mostra para o grupo nutrido a presença de duas populações de CD-71: células que expressam CD71 de alta intensidade de fluorescência e de intensidade mais baixa, respectivamente UL=37,25% e 48,69%) enquanto que os animais do grupo desnutrido apresentam apenas a expressão de CD 71 de baixa intensidade de fluorescência (UL=58,08%). A dupla marcação CD2/CD71 mostra a expressão do antígeno CD 71, marcador de ativação para a linhagem linfóide (nutrido UR= 75,04% e desnutrido UR=55,78%) (Figura 27e Gráfico 28).

Figura 26: Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abcissa. Gráfico de dispersão (CD 11a/SSC) mostrando a distribuição das populações presentes na amostra: densidade antigênica do AcMo CD11a (Integrina α_L e Integrina α) versus granulose celular. A imunofenotipagem mostra as análises das janela eletrônica - gate R1, gate R2 e gate R3 na forma de "dot plot" com a expressão e positividade de células para **CD 11a** nos grupos nutrido nos grupos nutridos (LR=82,76, 98,33 e 99,73%) e desnutridos (LR= 93,46, 96,22 e 99,23%) nas janelas eletrônicas R1, R2 e R3, respectivamente.

Figura 27: Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. A partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gate R1) com a expressão do Ter -119 para o grupo nutrido (UL=39,85) e desnutrido (UL=3,01). A imunofenotipagem mostra para o grupo nutrido a distinção entre duas população de CD-71 (**SETA**): que expressam CD71 de alta intensidade e de intensidade mais baixa, respectivamente (UL= 37,25% e 48,69%) enquanto o desnutrido mostra somente a expressão de CD 71 de baixa intensidade (UL= 58,08%). A dupla marcação CD72/CD71 (**SETA**) mostrando a expressão deste marcador para a linhagem linfóide (nutrido UR= 75,04% e desnutrido UR= 55,78%). IgG 2b Kappa de rato FITC (98,85%).

Gráfico 28 : Resultados da imunofenotipagem para a expressão do Ter –119 no grupo nutrido e desnutrido e a distinção entre duas população de CD 71: que expressam CD71 de alta intensidade e de intensidade mais baixa de fluorescência para o grupo nutrido e observando apenas uma população celular para o grupo desnutrido.

A figura 29 mostra a expressão de CD22 e CD19, em região selecionada R1, observando-se a presença de duas populações para o grupo nutrido: expressam CD22 de alta intensidade de fluorescência (LR= 34,73%) e de intensidade mais baixa (UL= 23,61%), enquanto que os animais do grupo desnutrido expressam apenas uma população de CD22 (UL=75,61%). A expressão do antígeno CD19 foi significativamente maior nos animais do grupo nutrido UL=52,04% comparado ao grupo desnutrido UL=43,2% (Figura 29 e Gráfico 30).

Figura 29: Representação gráfica da imunofenotipagem das células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. A partir da região selecionada os resultados dos marcadores de membrana CD19 e CD22.2, foram expressos em "dot plot": A imunofenotipagem mostra a expressão em região selecionada R1: A - Observa-se a presença de duas populações para o grupo nutrido (**SETA**): expressam CD22 de alta intensidade (LR= 34,73%)e de intensidade mais baixa (UL= 23,61%),enquanto que os animais do grupo desnutrido expressam apenas uma população de CD22 (UL=75,61%). Positividade para células CD19 nos animais do grupo nutrido UL=52,04% e desnutrido UL=43,42,%. IgG1 Kappa de rato PE- Controle negativo da cadeia isotópica IgG 1 kappa de rato conjugado ao fluorocromo Ficoeritina (LL= 99,20%) IgG1 Kappa de camundongo PE- Controle negativo da cadeia isotópica IgG 1 kappa de camundongo conjugado ao fluorocromo Ficoeritina (LL= 99,01%)

Gráfico 30: Resultados da imunofenotipagem para a expressão do CD19 no grupo nutrido e desnutrido; e a distinção entre duas populações de CD 22: que expressam CD22 de alta intensidade e de intensidade mais baixa de fluorescência para o grupo nutrido e observando apenas uma população celular para o grupo desnutrido.

Na figura 31 a imunofenotipagem mostra a análise das janelas eletrônica - gate R1 e gate R2 - com o aumento de células CD5⁺ nos animais dos grupos nutrido (LR= 91,05% e 37,33%) comparado ao desnutrido (LR= 55,56% e 8,50%) nas janelas eletrônicas R1 e R2, respectivamente. Evidencia-se somente no grupo desnutrido, células em diferentes estádios de diferenciação, com a presença de duas populações de células CD5⁺. Os resultados da análise imunofenotípica na figura 32 e gráfico 33, mostram a expressão dos marcadores linfóides T para o antígeno CD2. Observa-se um aumento significativo de células positivas e diferenças na expressão desse marcador no grupo desnutrido (LR=84,97%) em relação ao controle (LR=42,97%), com a presença da dupla marcação CD3/CD8 (Nutrido-LR= 92,06% e UL= 4,31 e Desnutrido- LR= 23,52% e UL=8,73%) e CD4/CD8 (Nutrido LR=5,17% e UL=4,31% e Desnutrido LR=12,87% e UR= 8,73%) (Figura 32). A análise imunofenotípica evidencia que a linhagem T não está comprometida com a linhagem NK1-1 no grupo desnutrido em relação ao controle (Figura 34).

Figura 31: Representação gráfica da imunofenotipagem das células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Gráfico de dispersão (CD 5/SSC) mostrando a distribuição das populações presentes na amostra: densidade antigênica do AcMo CD 5 (Ly-1) versus granulose celular. A imunofenotipagem mostra as análises das janelas eletrônica – gate R1 e gate R2-na forma de “dot plot” com a expressão do CD 5 no animais dos grupos nutrido (LR= 91,05% e 37,36%) em R1 e R2, respectivamente. No grupo desnutrido a presença de duas populações celulares: de alta intensidade (15,6%) e de baixa intensidade (21,73%) em R1 e, somente, uma população de baixa intensidade em R2 (8,50%). IgG 2b Kappa de rato FITC- Controle negativo da cadeia isotípica IgG 2b kappa de rato conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína para as janelas eletrônicas R1 (LL=98,85%) e R2 (LL=98,55%).

Figura 32: Representação gráfica da imunofenotipagem das células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. A partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": a ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gateR1) dos animais dos grupos nutrido e desnutrido, A imunofenotipagem mostra a expressão e positividade de células para CD2, em região selecionada R2, para o grupo nutrido (LR= 42,97%) e desnutrido (LR=84,97%) e a presença da dupla marcação CD3/CD8 (Nutrido-LR= 92,06% e UL= 4,31 e Desnutrido- LR= 23,52% e UL=8,73%) e CD4/CD8 (Nutrido LR=5,17% e UL=4,31% e Desnutrido LR=12,87% e UR= 8.73%). Controle negativo da cadeia isotópica IgG 2b kappa de rato conjugado ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (LL= 99,04%) e IgG 2 a Kappa de rato conjugado ao PE (LL=98,0%).

Gráfico 33: Resultados da imunofenotipagem para a porcentagem de células positivas para CD2, CD3, CD4 e CD8 no grupo nutrido e desnutrido em região selecionada R1.

Figura 34: Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. a partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gate R1) com a presença de uma pequena população celular positiva para NK1-1 no desnutrido. Resultados da dupla marcação NK1-1/CD2 (UR=2,74% e 7,03%); NK1-1/CD3 (UR= 3,27 e 6,13%) e NK1-1/CD5 (UR=3,30 e 2,74%) para o grupo nutrido e desnutrido, respectivamente, em região selecionada R1.

Observamos a ocorrência de uma co-expressão de marcadores linfóides T e linfóides B, não observado normalmente nas populações celulares linfóides humanas. Assim, realizamos um painel de marcadores linfóides T e B e evidencia-se a co-expressão de CD3/CD19; CD2/CD19; CD3/CD22 e CD2/CD22, em ambos os grupos em região delimitada R1, sendo mostrados na figura 35: CD19/CD3; CD22/CD3 (UR=55,46%; 55,93% e UR=24,05% e 30,38%); CD19/CD2 e CD22/CD2 (UR= 62,06%; 70,32%) CD19/CD5 e CD 22/CD5 (UR=6,73% ; 8,43% e UR= 13,25%; 1,02%) para o grupo nutrido e desnutrido , respectivamente. Por outro lado, esta co-expressão também foi evidenciada na região R2: CD19/CD3; CD22/CD3 (UR= 9,53%, 25,81% e UR=1,74%; 13,02%); CD19/CD2 e CD22/CD2 (UR=4,14; 20,37% e UR=2,93, 4,81%) CD19/CD5 e CD 22/CD5 (UR= 9,90% ;20,37% e UR= 2,56%; 0,42%), para o grupo nutrido e desnutrido em região selecionada R2, respectivamente (Figura 36).

Os resultados do controle de autofluorescência da cadeia utilizados neste trabalho mostram-se negativos, como o controle IgG 2a kappa de rato FITC(LL=98,85%); IgG 2 a kappa de rato PE(LL=98,55%); IgG 2b kappa de rato FITC(LL=99,02%); IgG 1 kappa de rato PE(LL=99,75%); IgG de hamster FITC(LL=99,00%); IgG 1 kappa de camundongo PE (LL= 99,20%) nas janelas eletrônicas R1, R2 e R3.

Figura 35 Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. a partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gateR1) com a presença de células duplamente marcadas para CD19/CD3; CD22/CD3 (UR=55,46%; 55,93% e UR=24,05% e 30,38%); CD19/CD2 e CD22/CD2 (UR= 62,06%; 70,32%) CD19/CD5 e CD 22/CD5 (UR=6,73% ; 8,43% e UR= 13,25%; 1,02%) para o grupo nutrido e desnutrido em região selecionada R1, respectivamente.

NUTRIDO

DESNUTRIDO

Figura 36: Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; FACS Calibur-Becton Dickinson. a partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gate R2) com a presença de dupla marcação CD19/CD3; CD22/CD3 (UR= 9,53%, 25,81% e UR=1,74%; 13,02%); CD19/CD2 e CD22/CD2 (UR=4,14; 20,37% e UR=2,93, 4,81%) CD19/CD5 e CD 22/CD5 (UR= 9,90%; 20,37% e UR= 2,56%; 0,42%) para o grupo nutrido e desnutrido em região selecionada R2, respectivamente.

6.8 Resultados da apoptose em ensaios *ex vivo*.

Os resultados da avaliação da apoptose, pelo APO-Direct™ Kit por citometria de fluxo, demonstram que o número de células apoptóticas na medula óssea de animais desnutridos é menor comparado ao grupo nutridos e ao controle positivo da população (Figura 37). Além disso, de forma indireta observamos, preliminarmente, a análise de proliferação de células pela análise FL2 do DNA, evidenciando-se que nos desnutridos ocorre aumento de populações celulares na fase G₀/G₁ e S, fato este não observado na população de células obtidas do grupo nutrido.

Figura 37: Representação gráfica da avaliação do ensaio da apoptose por citometria de fluxo utilizando-se APO-DIRECT™ Kit (Becton Dickinson), onde células são tratadas com FITC-dUTP na presença da enzima TdT que incorpora FITC-dUTP em 3-OH-DNA encontrado em células apoptóticas. A aquisição foi realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur (Becton Dickinson). FL1=FITC-dUTP mostrando células em apoptose e FL2= DNA área mostrando informações sobre o ciclo celular. A janela eletrônica (gate R1) na região das células em apoptose: C+= 8,29%; Nutrido=2,07% e Desnutrido =0,14%. Controle (+) células totais da medula óssea incubadas 6 horas com thapsigargin (1:1000). Gráfico da porcentagem de células positivas, em apoptose, por citometria de fluxo, do grupo controle(+) e dos grupos nutridos e desnutridos.

6.9 Resultados dos ensaios *in vitro* de cultura de células hematopoéticas em cultura líquida

Os resultados da padronização dos fatores de crescimento utilizados combinados - IL3, EPO, GM-CSF e G-CSF-para células de medula óssea de camundongos normais, que promoveram a capacidade proliferativa das células, a partir dos valores mínimos e máximos informados pela curva titulada pelo fabricante, que possibilitou a obtenção da EC₅₀ para a nossa população estudada, conforme ilustrado no gráfico 38.

Gráfico 38: Resultados, em valores médios, do número de células totais nucleadas viáveis, expressos em 10^4 células/mL presentes na cultura líquida de células obtidas da medula óssea de camundongos "normais", Swiss, adultos, machos. **Sistema de cultura líquida:** placas de 24 poços contendo meio de cultura Fisher com 10% de soro bovino fetal, 3×10^4 células totais/mL/poço foram incubadas durante 7 dias a $36,8^\circ\text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , na presença de IL-3 0,1 ng/mL, EPO 0,5 e 1 UI, GM-CSF 0,2 e 0,4 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL - **CFU-MIX**. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustada equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisadas.

Os ensaios de cultura líquida efetuados com a combinação de IL-3 (0,1 ng/mL); EPO (1 UI); G-CSF (0,2 ng/mL); GM-CSF (0,2 ng/mL) originando a CFU-MIX, apontaram resultados em que o número do total celular mostra-se significativamente menor, em todos os dias em cultura, no ensaio em que se empregaram células obtidas de animais desnutridos, comparativamente ao de células de animais nutrido (Gráfico 39-A). O número de células blásticas aumentou progressivamente na cultura de células provenientes de animais nutridos enquanto o número de blastos do grupo desnutrido não apresentou tal aumento (Gráfico 39-B)

Em relação às formas jovens presentes nos ensaios de cultura líquida, o aumento dessas células, quando obtidas de animais nutridos, foi estatisticamente significativo no terceiro e quinto dia de cultura (Gráfico 40-C). No grupo nutrido, as formas em anel neutrófilas também apresentam significativo aumento no terceiro e quinto dia de cultura, em comparação com o observado no grupo desnutrido (Gráficos 40-D). Além disso, como mostra o gráfico 41-E, o número de formas segmentadas neutrófilas foi menor no terceiro e quinto dias nos ensaios realizados com células de animais desnutridos, quando comparados ao grupo nutrido, com estímulo de citocinas.

A proliferação de células eritróides foi significativamente menor nos ensaios com células de animais desnutridos, principalmente no quinto dia de cultura (Gráfico 41-F). Por outro lado, o número de linfócitos do plaqueamento (tempo zero) no inicial, foi significativamente maior em animais desnutridos. Em ambos os grupos, o número de linfócitos reduziu ao longo do ensaio, uma vez que não foi adicionado fator de crescimento para a linhagem linfóide. No grupo desnutrido, o número de linfócitos foi superior no transcorrer da cultura (Gráfico 42-G)

Em ambos os grupos, na ausência de citocinas, as células não estimuladas com fatores de crescimento, denominadas de **controle negativo** da cultura (nutrido e desnutrido sem MIX), não apresentaram capacidade proliferativa para nenhuma forma celular. (Gráficos 39 a 42).

A - CÉLULAS TOTAIS

B - BLASTOS

Gráfico 39: Resultados, em valores médios, do número de células totais (A) e do número de blastos (B) expressos em 10^4 células/mL presentes na cultura líquida de células obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, Swiss, adultos, machos. **Sistema de cultura líquida:** placas de 24 poços contendo meio de cultura Fisher com 10% de soro bovino fetal, 5×10^4 células totais/mL/poço foram incubadas por 120 horas a $36,8^\circ\text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL - CFU-MIX. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. Resultados de um experimento representativo ($n=3$). **DCM:** célula de animal desnutrido com MIX; **DSM:** célula de animal desnutrido, controle negativo; **NCM:** célula de animal nutrido com MIX e **NSM:** célula de animal nutrido, controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustada equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisadas.

C – FORMAS JOVENS

D – FORMAS EM ANEL

Gráfico 40: Resultados em valores médios do número de **formas jovens (C)** e do número de **formas em anel (D)** expressos em 10^4 células/mL presentes na cultura líquida de células obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, Swiss, adultos, machos. **Sistema de cultura líquida:** placas de 24 poços contendo meio de cultura Fisher com 10% de soro bovino fetal, 5×10^4 células totais/mL/poço foram incubadas por 120 horas a $36,8^\circ\text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL - **CFU-MIX**. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadriplicata. Resultados de um experimento representativo ($n=3$). **DCM:** célula de animal desnutrido com MIX; **DSM:** célula de animal desnutrido, controle negativo; **NCM:** célula de animal nutrido com MIX e **NSM:** célula de animal nutrido, controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustada equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisada.

E – FORMAS SEGMENTADAS

F – PRECURSORES ERITROCÍTICOS

Gráfico 41: Resultados em valores médios do número de formas segmentadas (E) e do número de precursores eritrocíticos (F) expressos em 10^4 células/mL presentes na cultura líquida de células obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, Swiss, adultos, machos. **Sistema de cultura líquida:** placas de 24 poços contendo meio de cultura Fisher com 10% de soro bovino fetal, 5×10^4 células totais/mL/poço foram incubadas por 120 horas a $36,8^\circ\text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL - **CFU-MIX**. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. Resultados de um experimento representativo ($n=3$). **DCM:** célula de animal desnutrido com MIX; **DSM:** célula de animal desnutrido, controle negativo; **NCM:** célula de animal nutrido com MIX e **NSM:** célula de animal nutrido, controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustada equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisadas.

G – LINFÓCITOS

H– MONÓCITOS/MACRÓFAGOS

Gráfico 42: Resultados em valores médios do número de linfócitos (G) e do número de monócitos e formas macrofágicas (H) expressos em 10^4 células/mL presentes na cultura líquida de células obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, Swiss, adultos, machos. **Sistema de cultura líquida:** placas de 24 poços contendo meio de cultura Fisher com 10% de soro bovino fetal, 5×10^4 células totais/mL/poço foram incubadas por 120 horas a $36,8^\circ\text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 , na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL - **CFU-MIX**. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. Resultados de um experimento representativo ($n=3$). **DCM:** célula de animal desnutrido com MIX; **DSM:** célula de animal desnutrido, controle negativo; **NCM:** célula de animal nutrido com MIX e **NSM:** célula de animal nutrido, controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustada equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisadas.

Figura 43: Fotomicrografia de células presentes na cultura líquida (5° dia) estabelecida com células de medula óssea de camundongos **nutrido** e **desnutrido**, mostrando a proliferação das células, somente na presença de fatores de crescimento hematopoéticos, sendo esta proliferação diminuída no grupo desnutrido. Controle negativo: células em suspensão na ausência de citocinas (aumento 500x).

Figura 44: Fotomicrografia de células presentes na cultura líquida (5º dia) estabelecida com células de medula óssea de camundongos **nutrido e desnutrido**, respectivamente, na presença de citocinas. Coloração May-Grünwald-Giemsa modificada por Rosenfeld (aumento 500x).

6.10 Análise imunofenotípica em cultura líquida

Os resultados do perfil imunofenotípico das populações celulares não marcadas de amostras de células obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, no terceiro e quinto dia dos ensaios *in vitro*, sob estímulo dos fatores de crescimento hematopoético (IL-3, EPO, GM-CSF e G-CSF) encontram-se na figura 45. A imunofenotipagem demonstra, no gráfico mostrado, diferença entre as populações analisadas, sugerindo duas regiões (R1 e R2), para ambos os grupos, no terceiro dia de cultura, e aparecimento de uma terceira região, no grupo nutrido, no quinto dia de cultura no gráfico mostrado na figura 45.

Figura 45: Representação gráfica da imunofenotipagem das populações celulares não marcadas com fluorocromos de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos obtidas de **cultura líquida de 3 e 5 dias**, na presença de IL-3 (0,1ng/mL), EPO (1UI), GM-CSF (0,2 ng/mL) e G-CSF (0,2 ng/mL). A aquisição de 10^4 células foi realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Representação gráfica da imunofenotipagem da **população total** de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em cultura líquida de 3 dias (A) nas regiões selecionada – gate R1, gate R2 e 5 dias (B) mostra as regiões selecionada – gate R1, gate R2 e gate R3 para o grupo nutrido e – gate R1, gate R2 – para o grupo desnutrido. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Dispersão lateral (side scatter channel -SSC - ângulo reto 90°) e Dispersão frontal (forward scatter channel - FSC - ângulos pequenos 0,5 a 1,0°).

No terceiro e quinto dia de cultura, em todas as regiões analisadas, evidenciou-se uma diminuição da expressão de células positivas do CD 45 de camundongos desnutridos. Observam-se, em R1, duas populações distintas de intensidade média de fluorescência do antígeno CD45, em animais nutridos e desnutridos, no terceiro e quinto dia de cultura, o que não foi evidenciado em R2 (Figuras 46 e 47).

Figura 46: Representação gráfica da imunofenotipagem de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em cultura líquida de 3 dias, na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. A partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": a ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando as janelas eletrônicas (gate R1 e gate R2) dos grupos nutridos e desnutridos. A análise imunofenotípica mostra a expressão e positividade do antígeno pan leucocitário CD45: nutrido LR=90,04% e desnutrido LR=82,61% em R1 e nutrido LR=98,41% e desnutrido LR=90,72% em R2. IgG 2b Kappa de rato FITC- (R1 - LL= 98,04% e R2- LL=97,56%)para o grupo nutrido e (R1 - LL= 100,00% e R2-LL=98,26%)para o grupo desnutrido.

Figura 47: Representação gráfica da imunofenotipagem de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos obtidas de **cultura líquida de 5 dias**, na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada *versus* FSC na abscissa. A partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": a ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gateR1, gateR2 e gateR3) do grupo nutrido e (gateR1, gateR2) do grupo desnutridos. A análise imunofenotípica mostra a positividade e expressão do antígeno pan leucocitário CD45 (LR=90,04%; 99,26 e 94,81%) em R1, R2 e R3, respectivamente, no nutrido (LR=91,84%; 90,1%) em R1 e R2, respectivamente, no desnutrido.

No gate R1 houve diminuição do número de células CD34⁺ em 3 dias no desnutrido, porém houve reversão evidenciando, no quinto dia de cultura, um aumento do número de células CD34⁺ no desnutrido. Apresentam diferentes resultados os grupos em R2 (Figura 37), observando-se baixa expressão percentual deste antígeno. Os animais desnutridos apresentaram maior quantidade de células CD117⁺ em R1, comparado aos animais nutrido, em ambos os dias da cultura, acentuadamente no 5^o dia (Figura 48).

Figura 48: Representação gráfica dos resultados da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em cultura líquida de 3 e 5 dias, na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. A análise imunofenotípica no 3º dia de cultura mostra a positividade e expressão do antígeno de membrana CD 117 (nutrido - LR= 11,84% e desnutrido - LR= 58,26%) , CD34 (nutrido LR= 4,90% e desnutrido LR=1,02%) em R1 e CD117 (nutrido - LR= 4,44% e desnutrido - LR= 1,65%), CD34 (nutrido LR= 2,40% e desnutrido LR=2,78%)em R2.Os resultados no 5º dia de cultura mostram a expressão de CD34 (nutrido-LR= 1,3% e desnutrido - LR=3,23%) e CD117(nutrido - LR= 3,0% e desnutrido - LR= 92,62%) em R1 e de CD34 (nutrido -LR= 1,3% e desnutrido - LR= 1,93%) e CD117 (nutrido - LR= 3,7% e desnutrido - LR= 2,84 %) em R2.

A expressão de CD71 no grupo nutrido foi maior que nos desnutridos em 3 dias de cultura em R1. Tendo em vista que linfócitos também podem expressar CD71, fez-se a dupla marcação (CD5/CD71), constando co-expressão de CD71/CD5 somente no grupo nutrido (UR=13,50%) em 3 dias de cultura. Observou-se expressão do marcador de linhagem eritróide (TER-119), de baixa intensidade, em células de nutridos (39,71%) e, de TER-119, de alta intensidade de fluorescência, no desnutrido (23,45%) em R1. Nos animais não se evidenciou número de células positivas da população eritróide de baixa intensidade, pela expressão de CD71 e TER119, coincidente com as análises morfo-histológicas (Figura 49).

Reduziu-se o número de células CD5⁺, no grupo nutrido, enquanto que no grupo desnutrido observou-se aumento de células CD5⁺ e de células CD2⁺, do 3º para o 5º dia em R1 (Figura 49).

Os antígenos T (CD3) e B (CD19) são considerados, respectivamente, pan-T e pan-B pois estão expressos em todos os estádios de diferenciação. A expressão de células CD19⁺, em ambos os grupos, no 3º dia de cultura, foram iguais, mas, no quinto dia, houve diminuição acentuada em ambos os grupos. As células de camundongos desnutridos apresentaram uma maior número de células CD3⁺ comparativamente ao controle. Por análise indireta observou-se que apenas pequeno percentual de células era CD4⁺/CD8⁺ no nutrido e desnutrido, sendo maior no desnutrido em R1, evidenciando uma pequena população madura de linhagem T nesse grupo. Ocorreu co-expressão de células positivas para CD3/CD19 em R1, no 3º dia, no grupo nutrido (UR=54%), e no 5º dia no desnutrido (UR=3,39%) (Figuras 51 e 52).

Figura 49: Representação gráfica dos resultados da imunofenotipagem de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em cultura líquida de 3 e 5 dias, na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. A análise imunofenotípica mostra células Ter119⁺ de baixa intensidade de fluorescência no nutrido (39,71%) e de TER-119⁺ de alta expressão de fluorescência (SETA) no desnutrido (23,45%) em R1, no 3º dia de cultura. A presença da dupla marcação CD5/CD71 expressa em células somente do nutrido (UR=13,50%), em região selecionada R1 (SETA). A positividade de CD5 em região selecionada R1 no grupo nutrido (LR=15,95%) no 3º dia de cultura e desnutrido (LR= 73,46% E LR=88,44%) no 3º e 5º dia de cultura, respectivamente (SETA).

Figura 50: Representação gráfica da imunofenotipagem de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em cultura líquida de 3 e 5 dias, na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL, sendo a aquisição de 10⁴ células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. A partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": a ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica gate R1 e gate R2. A análise imunofenotípica mostra a expressão do **CD2** em R1 no grupo nutrido - SETA (LR=40,29%; LR=0,1%) e desnutrido -SETA (LR=98,89%; LR=94,31%) no terceiro e quinto dia de cultura, em R1.

Figura 51: Representação gráfica da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em cultura líquida de **3 dias**, na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Resultados da análise imunofenotípica mostrando os resultados de células CD4⁺ (nutrido - LR= 7,61% e desnutrido - LR= 33,75%), CD8⁺ Seta (nutrido UL= 4,31% e desnutrido UL= 21,88%) e CD3⁺ (nutrido - LR=23,21% e desnutrido - LR=64,84%) e de células B, expresso em células CD19⁺ (nutrido UL=12,63% e desnutrido UL=12,30%) em R1, com a presença da dupla marcação no grupo nutrido CD3/CD19 (UR= 54% **SETA**). Resultados da região R2 no estudo imunofenotípico de CD4 (nutrido - LR= 0,39% e desnutrido - LR= 0,59%), CD8 (nutrido UL= 4,25% e desnutrido UL= 1,08%) e CD3 (nutrido - LR=23,85% e desnutrido - LR=62,52% - Seta) e linfócito B - CD19 (nutrido UL= 4,88% e desnutrido UL= 2,61%).

Figura 52: Representação gráfica da imunofenotipagem de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em **cultura líquida de 5 dias**, em R1 e R2, na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. A partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": a ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (**gate R1 e gate R2**) do grupo nutrido. Análise imunofenotípica mostrando positividade dos resultados de CD4 (desnutrido - LR= 62%), CD8 (nutrido UL= 7,7% SETA) e CD4/CD8 (desnutrido UR= 37,13% SETA) e CD3 (nutrido - LR=26% e desnutrido - LR=79%) e de linfócito B -CD19 (nutrido UL=34%) e CD19/CD3 no desnutrido UL=3,39% SETA) em R1. Resultados da região R2 no estudo imunofenotípico de CD3 (nutrido - LR=50% SETA) e desnutrido (LR= 61% SETA).

A expressão de células CD11a⁺ do grupo nutrido reduziu do 3° para o 5° dia em R1 enquanto que no grupo desnutrido o número de células CD11a⁺ aumentou do 3° para o 5° dia em R1 (Figura 53). A expressão do antígeno CD11a⁺ em células selecionadas em R3 foi o único marcador utilizado deste estudo que mostrou positividade em R3 do grupo nutrido no quinto dia de cultura, sugerindo esta população ser da linhagem granulocítica mais diferenciada ou madura.

Os resultados do controle de autofluorescência da cadeia utilizados neste trabalho, como controle IgG 2 a kappa de rato FITC(LL=98,85%); IgG 2 a kappa de rato PE(LL=98,55%); IgG 2b kappa de rato FITC(LL=99,02%); IgG 1 kappa de rato PE(LL=99,75%); IgG de hamster FITC(LL=99,00%); IgG 1 kappa de camundongo PE (LL= 99,20%) apresentaram-se negativos para todos os grupos de animais utilizados neste estudo.

Figura 53: Representação gráfica da imunofenotipagem de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em **cultura líquida de 3 e 5 dias**, na presença de IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL, sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. A partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": a ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gate R1 e gate R2) dos grupos nutridos e desnutridos. A análise imunofenotípica mostra a expressão do antígeno de membrana **CD11a** no grupo nutrido (LR=35,25%; LR= 62,31%) e desnutrido (LR=47,80%; LR=20,07%) no terceiro dia de cultura em R1 e R2, respectivamente. No quinto dia de cultura os resultados do estudo imunofenotípico no grupo nutrido (LR=10,05%; LR=63,32% e LR=23,29%) em R1, R2 e R3 e desnutrido (LR=92,21% e LR= 58,64%) em R1 e R2, respectivamente.

6.11 Resultados da avaliação morfológica em ensaios clonogênicos em metilcelulose

Os resultados da padronização da capacidade proliferativa de células da M.O. de camundongos "normais" em meio semi-sólido em metilcelulose com os fatores de crescimento IL-3, EPO, GM-CSF e G-CSF para a formação de clusters e colônias (CFU-GM; BFU-E e CFU-E e CFU-Mix) encontram-se no gráfico 54.

Gráfico 54: Avaliação da proliferação de células hematopoiéticas de camundongos "normais" em cultura semi-sólida utilizando ensaios clonais in vitro de células formadoras de Colônias (CFC) em metilcelulose durante 7, 14 e 21 dias e o número de clusters e colônias foram avaliados através de contagem em microscópio invertido sob estímulo da associação das doses dos fatores de crescimento previamente estabelecidos de Interleucina-3, EPO, CFU-G e CFU-GM.

Os ensaios clonogênicos realizados com animais nutridos e desnutridos demonstraram aumento na formação de colônias e de "cluster". Nos ensaios com células de animais nutridos o número de "cluster" reduziu progressivamente com o tempo. Paralelamente, o número de colônias aumentou progressivamente (Gráficos 55 A e B) comportamento este não evidenciado no grupo desnutrido. O número de colônias CFU-GM dos animais desnutridos foi inferior ao encontrado nos animais nutridos. Não encontramos colônias BFU-E e CFU-E nos ensaios com células de M.O. de animais desnutridos estimulados com citocinas (Tabela 6 e 7).

Tabela 6: Resultados da correlação das colônias GM; BFU-E e CFU-E; e MIX nos ensaios clonogênicos com as células progenitores GM, BFU e CFU-E e GEMM encontradas no grupo nutrido.

CÉLULAS	NUTRIDO		
	7 dias	14 dias	21 dias
CFU-GM	$1,42 \times 10^5/\text{mL}$	$2,41 \times 10^5/\text{mL}$	$2,73 \times 10^5/\text{mL}$
BFU-E/CFU-E	$0,28 \times 10^5/\text{mL}$	$0,07 \times 10^5/\text{mL}$	$0,04 \times 10^5/\text{mL}$
CFU-GEMM	$0,23 \times 10^5/\text{mL}$	$0,12 \times 10^5/\text{mL}$	$0,04 \times 10^5/\text{mL}$

Tabela 7: Resultados da correlação das colônias GM; BFU-E e CFU-E; e MIX nos ensaios clonogênicos com as células progenitores GM, BFU e CFU-E e GEMM encontradas no grupo desnutrido.

CÉLULAS	DESNUTRIDO		
	7 dias	14 dias	21 dias
CFU-GM	$1,28 \times 10^5/\text{mL}$	$1,45 \times 10^5/\text{mL}$	$1,33 \times 10^5/\text{mL}$
BFU-E/CFU-E	-	-	-
CFU-GEMM	-	-	-

A – CLUSTERS

B- COLÔNIAS

Gráfico 55: Resultados em valores médios do número de "clusters" (A) e do número de colônias (B) expressos em 10^4 células/mL presente nos ensaios clonogênicos utilizando células totais obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, Swiss, adultos, machos. Sistema de cultura em meio semi-sólido: meio de cultura Iscove com 10% de soro bovino fetal, meio semi-sólido de metilcelulose, 1×10^5 células/mL, e citocinas, IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL - CFU- MIX) foram incubadas por 21 dias a $36,8^\circ \text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O número de "clusters" e colônias foi avaliado, em microscópio invertido, nos dias 7, 14 e 21. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. Resultados de um experimento representativo ($n=3$). **DCM:** células de animais desnutrido com MIX; **DSM:** células de animais desnutrido, controle negativo; **NCM:** : células de animais nutrido com MIX e **NSM:** : células de animais nutrido, controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustado uma equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisadas.

O número do total celular, em todos os períodos avaliados, foi significativamente inferior no grupo desnutrido (Gráfico 56 C). O número de células blásticas nos ensaios de animais nutridos aumentou progressivamente com pico em 14 dias, e posterior redução até 21º dia, sendo este resultado não evidenciado nos desnutridos (Gráfico 56 D).

O número de formas jovens da linhagem granulocítica também diferiu entre os grupos: nos animais nutridos houve relativa estabilização nos primeiros 14 dias de cultivo. Entretanto, com células de animais desnutridos houve redução destas células, o que pode estar relacionado a não maturação (Gráfico 57E, 57F e 58G)

O número de linfócitos, já ao plaqueamento das células (tempo zero), era significativamente maior nos animais desnutridos. Nos ensaios, as células oriundas de animais nutridos reduziram-se enquanto que nos desnutridos, houve aumento (Gráfico 59G), e, como já mencionamos nos ensaios de cultura em meio líquido, aqui também não foi acrescentado fator de crescimento específico para a linhagem linfóide. Por outro lado, o número de células da linhagem macrofágica foi, em todos os períodos avaliados, significativamente maior nos ensaios empregando células de animais nutridos (Gráfico 59H).

C- CÉLULAS TOTAIS

D- BLASTOS

Gráfico 56: Resultados em valores médios do número de células totais (C) e do número de blastos (D) expressos em 10^4 células/mL presente nos ensaios clonogênicos utilizando células totais obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, Swiss, adultos, machos. Sistema de cultura em meio semi-sólido: meio de cultura Iscove com 10% de soro bovino fetal, meio semi-sólido de metilcelulose, 1×10^5 células/mL, e citocinas (IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL - **CFU-MIX**) foram incubadas por 21 dias a $36,8^\circ \text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O número de células foi determinado em hemocitometro, nos dias 7, 14 e 21. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. Resultados de um experimento representativo ($n=3$). **DCM**: células de animais desnutrido com MIX; **DSM**: células de animais desnutrido, controle negativo; **NCM**: células de animais nutrido com MIX e **NSM**: células de animais nutrido, controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustado uma equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisadas.

E- FORMAS JOVENS

F- FORMAS EM ANEL

Gráfico 57: Resultados em valores médios do número de formas jovens (E) e do número de formas em anel (F) expressos em 10^4 células/mL presente nos ensaios clonogênicos utilizando células totais obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, Swiss, adultos, machos. . Sistema de cultura em meio semi-sólido: meio de cultura Iscove com 10% de soro bovino fetal, meio semi-sólido de metilcelulose, 1×10^5 células/mL, e citocinas, IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL: **CFU-MIX**) foram incubadas por 21 dias a $36,8^\circ \text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O número total de células foi determinado em hemocitometro nos dias 7, 14 e 21. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. Resultados de um experimento representativo ($n=3$). **DCM**: células de animais desnutrido com MIX; **DSM**: células de animais desnutrido, controle negativo; **NCM**: células de animais nutrido com MIX e **NSM**: células de animais nutrido, controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustado uma equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisadas.

G- FORMAS SEGMENTADAS

H- PRECURSORES ERITROCÍTICOS

Gráfico 58: Resultados em valores médios do número de formas segmentadas (G) e do número de eritroblastos (todos os estádios de maturação) (H) expressos em 10^4 células/mL presente nos ensaios clonogênicos utilizando células totais obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, Swiss, adultos, machos. Sistema de cultura em meio semi-sólido: meio de cultura Iscove com 10% de soro bovino fetal, meio semi-sólido de metilcelulose, 1×10^5 células/mL, e citocinas (IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL - **CFU-MIX**) foram incubadas por 21 dias a $36,8^\circ \text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O número total de células foi determinado em hemocitometro, nos dias 7, 14 e 21. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. Resultados de um experimento representativo ($n=3$). **DCM:** células de animais desnutrido com MIX; **DSM:** células de animais desnutrido, controle negativo; **NCM:** células de animais nutrido com MIX e **NSM:** células de animais nutrido, controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustado uma equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisadas.

I- LINFÓCITOS

J- MONÓCITOS/ MACRÓFAGOS

Gráfico 59: Resultados em valores médios do número de linfócitos (I) e do número de monócitos e formas macrófágicas (J) expressos em 10^4 células/mL presente nos ensaios clonogênicos utilizando células totais obtidas da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, Swiss, adultos, machos.. Sistema de cultura em meio semi-sólido: meio de cultura Iscove com 10% de soro bovino fetal, meio semi-sólido de metilcelulose, 1×10^5 células/mL, e citocinas, IL-3 0,1ng/mL, EPO 1UI, GM-CSF 0,2 ng/mL e G-CSF 0,2 ng/mL - **CFU-MIX**) foram incubadas por 21 dias a $36,8^\circ \text{C}$, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . O número total de células foi determinado em hemocitometro, nos dias 7, 14 e 21. Controle negativo realizado na ausência de citocinas. As amostras foram plaqueadas em quadruplicata. Resultados de um experimento representativo ($n=3$). **DCM**: células de animais desnutrido com MIX; **DSM**: células de animais desnutrido, controle negativo; **NCM**: células de animais nutrido com MIX e **NSM**: células de animais nutrido, controle negativo. Os dados foram analisados pela ANOVA de 3 vias sendo ajustado uma equação de regressão para verificar a tendência de comportamento no crescimento nas variáveis analisadas.

Figura 60: Fotomicrografia de Colônias CFU-Mix e CFU-GM, respectivamente, presentes nos ensaios clonogênicos no sétimo dia de cultura, estabelecida com células de medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos, mostrando a proliferação das células somente na presença de fatores de crescimento hematopoéticos (aumento 200X e 500X).

Figura 61: Fotomicrografia de células de camundongos nutrido e desnutrido presentes nos ensaios clonogênicos no décimo quarto dia de cultura, respectivamente. No vigésimo primeiro dia de cultura o aparecimento de células macrofágicas, no grupo desnutrido, mostrando a proliferação das células somente na presença de fatores de crescimento hematopoéticos (aumento 500X).

6.12. Análise imunofenotípica em cultura semi-sólida de metilcelulose

Os resultados do perfil imunofenotípico das populações celulares não marcadas de amostras de células obtidas da medula óssea de camundongos - nutrido e desnutrido -, em 7 e 14 dias, nos ensaios *in vitro*, sob estímulo de citocinas, podem ser observados na figura 62. Constatam-se diferenças entre as populações analisadas, sugerindo a presença de uma região selecionada (R1), tanto nos grupos de 7 como nos de 14 dias de cultura, sendo descritas as populações com os marcadores de membrana utilizados neste estudo.

A caracterização da população como de origem hematopoética foi realizada utilizando o antígeno pan - leucocitário CD45, sendo que as células obtidas, tanto no sétimo como no décimo quarto dia, apresentaram positividade para este antígeno. Porém, nos ensaios com células de animais nutridos, mostram diferentes estádios de diferenciação, o percentual de células positivas apresentou-se sempre maior que nos ensaios com desnutridos (Figuras 63 e 64).

Os resultados da expressão de células positivas para CD34 e CD117, nos ensaios clonais de 7 e 14 dias, evidenciaram que ambos marcadores apresentam maior positividade em células oriundas de camundongos nutridos. A análise da imunofenotipagem mostra diminuição acentuada no número de células positivas para o marcador Ter 119 nos ensaios clonais do 7º e 14º dia, sendo que no animal desnutrido evidenciou-se a ausência de células desse marcador. As células obtidas dos ensaios *in vitro* mostram positividade para os grupos nutridos e desnutridos na expressão do antígeno CD 11a, porém, nas células de animais desnutridos há redução no percentual de células positivas que expressam este antígeno em R1. (Figuras 63 e 64).

Os resultados da análise imunofenotípica mostram a expressão do marcador linfóides T – CD3 em maior número de células positivas oriundas de animais desnutridos – tanto em amostras obtidas no 7º como no 14º dia de cultura. A análise imunofenotípica da expressão do CD3 no grupo nutrido

sugere células em diferentes estádios de diferenciação, diferentemente do observado na população de células de animais desnutridos, que revela perfil menos polimórfico. Além disso, por análise indireta, observa-se que apenas pequeno percentual de células expressam $CD4^+/CD8^+$ descartando, em consequência, a presença da população madura de linhagem T. A expressão de células positivas para o antígeno CD2 e CD5 foi significativamente maior em células oriundas de animais nutridos (Figuras 63 e 64).

Apesar de os resultados dos controles negativo de cadeia não apresentaram-se em todos as figuras, os resultados do controle de autofluorescência da cadeia utilizados neste trabalho, como controle IgG 2 a kappa de rato FITC(LL=98,85%); IgG 2 a kappa de rato PE(LL=98,55%); IgG 2b kappa de rato FITC(LL=99,02%); IgG 1 kappa de rato PE(LL=99,75%); IgG de hamster FITC(LL=99,00%); IgG 1 kappa de camundongo PE (LL=99,20%) apresentaram-se negativos para todos os grupos de animais utilizados neste estudo.

NUTRIDO**DESNUTRIDO****7 dias em cultura** **14 dias em cultura**

Figura 62 : Representação gráfica da imunofenotipagem das populações celulares não marcadas com fluorocromos de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos obtidas de cultura semi-sólida em metilcelulose de 7 e 14 dias, na presença de IL-3 (0,1ng/mL), EPO (1UI), GM-CSF (0,2 ng/mL) e G-CSF (0,2 ng/mL). A aquisição de 10^4 células foi realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Representação gráfica da imunofenotipagem da população total de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em cultura semi-sólida em metilcelulose de 7 dias em região selecionada- gate R1. B-representação gráfica da imunofenotipagem da população total de células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em cultura semi-sólida em metilcelulose de 14 dias mostra a região selecionada – gate R1. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Dispersão lateral (side scatter channel -SSC - ângulo reto 90°) e Dispersão frontal (forward scatter channel - FSC - ângulos pequenos 0,5 a 1,0°).

Figura 63: Representação gráfica dos resultados da imunofenotipagem em cultura semi-sólida em metilcelulose, de 7 dias, na presença de IL-3 (0,1ng/mL), EPO (1UI), GM-CSF (0,2 ng/mL) e G-CSF (0,2 ng/mL), sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. Os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": a ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gate R1) dos grupos nutridos e desnutridos. A análise imunofenotípica no 7º dia de cultura mostra a expressão e positividade dos antígenos de membrana CD 117 (nutrido - LR= 12,44% e desnutrido - LR= 4,70%), CD34 (nutrido LR= 2,02 % e desnutrido LR=2,44%), CD11a (nutrido - LR= 88,71% e desnutrido - LR= 75,80%), CD3 (nutrido LR=38,2 % e desnutrido LR= 58,4% SETA) e CD3/CD8 (nutrido LR=5,79 % e desnutrido LR=22,28% SETA)

Figura 64: Representação gráfica dos resultados da imunofenotipagem nas células da medula óssea de camundongos nutridos e desnutridos em cultura semi-sólida em metilcelulose, de 14 dias, na presença de IL-3 (0,1ng/mL), EPO (1UI), GM-CSF (0,2 ng/mL) e G-CSF (0,2 ng/mL), sendo a aquisição de 10^4 células realizada em citômetro de fluxo contendo laser de argônio 488nm; Facs Calibur-Becton Dickinson. SSC na ordenada versus FSC na abscissa. A partir da região selecionada os resultados dos marcadores foram expressos em "dot plot": a ordenada (SSC) e abscissa (FSC) mostrando a janela eletrônica (gate R1) dos grupos nutridos e desnutridos. A análise imunofenotípica no décimo quarto dia de cultura mostra a positividade e expressão do antígeno de membrana CD 117 (nutrido - LR= 52,12% e desnutrido - LR= 50,50% SETA), CD34 (nutrido LR= 7,80% e desnutrido LR=4,93%) ; CD11A (nutrido - LR= 72,5% e desnutrido - LR= 12%), CD2 (nutrido LR= 12% e desnutrido LR= 1,2%); CD5 (nutrido LR= 16% e desnutrido LR= 1,65%) CD3 (nutrido LR= 33% e desnutrido LR= 88,28% SETA).

7. DISCUSSÃO

No processo de desnutrição protéica experimental, as rações foram elaboradas considerando os teores de vitaminas, ácidos graxos e sais minerais necessários para fornecer uma dieta adequada, restringindo apenas a quantidade de proteína da ração hipoprotéica. Neste modelo a desnutrição é inicialmente causada pela deficiência de proteínas, contudo, tendo em vista a resposta anorética dos animais, o processo evolui para desnutrição protéico-energética.

Nos efeitos da privação protéica em seres humanos, conceitos correntes baseiam-se, principalmente, em informações obtidas de pesquisa em indivíduos com desnutrição grave, nos quais há múltiplas deficiências nutricionais como, por exemplo, em pacientes com doença crônica, em quem os efeitos da doença se confundem com os efeitos da deficiência nutricional.

Estudos em animais experimentalmente desnutridos permitem o controle de variáveis como sexo, idade e a utilização de animais não inflamados e/ou infectados. Em nosso estudo, optamos por trabalhar com camundongos machos, evitando-se as flutuações hormonais e, em decorrência, sua influência na cinética de células sangüíneas. 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 hemopoese (BANNERMAN, 1993).

A perda de 20% a 30 % do peso corpóreo inicial e a queda ou redução no consumo de ração pelos animais do grupo desnutrido, associados a concentração de proteínas plasmáticas e ao hemograma, mostraram-se como bons indicadores na avaliação da desnutrição protéica. Este comportamento em desnutrição protéica era esperado, visto que o animal apresenta tendência a diminuir a quantidade de ração ingerida, na tentativa de evitar maiores alterações no balanço nitrogenado (DE ANGELIS, 1995).

A desnutrição pode modificar a concentração plasmática de aminoácidos de cadeia ramificada como leucina, isoleucina e valina, o que

parece modificar a ação desses aminoácidos no centro da fome, desenvolvendo resposta anorética (GIETZEN e MAGRUM, 2001). Segundo Gietzen (1993), os animais possuem mecanismos regulatórios que beneficiam a seleção de uma dieta balanceada, proporcionando-lhes, assim, a aquisição de todos os nutrientes necessários para nutrição adequada. Quando dietas deficientes em aminoácidos essenciais são oferecidas a ratos há um reconhecimento, em áreas cerebrais específicas, da redução desses aminoácidos (DE ANGELIS, 1995). Os mecanismos envolvidos no reconhecimento do desequilíbrio estão associados à diminuição do aminoácido limitante de norepinefrina e AMP cíclico e, ainda, por alterações na síntese protéica. O reconhecimento da deficiência induz aversão ao alimento mediada, em parte, pela serotonina.

Outro mecanismo responsável pela redução da ingesta de alimentos pode ser desencadeado de transtornos hipotalâmicos, determinados por lesões locais e distúrbios psicogênicos, semelhantemente à anorexia nervosa (WATERLOW, 1996). Esse comportamento em relação à redução na ingesta da ração hipoprotéica, é um comportamento que vem se repetindo em outras pesquisas realizadas em nosso laboratório (BORELLI *et al.*, 1995; XAVIER, 1999; BORSATO, 1999; VITURI *et al.*, 2000): em decorrência da redução do consumo de ração e, conseqüentemente, de proteínas, ocorre a instalação de desnutrição protéico-energética experimental. Esta perda pode ser atribuída ao consumo de reservas endógenas (tecido adiposo e muscular), que ocorre em condições de deficiência nutricional, para obtenção de energia (AUGUSTO *et al.*, 1995).

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. Observam-se algumas diferenças no que se refere ao ciclo de vida das formas maduras das linhagens hematopoéticas. Em humanos os eritrócitos podem permanecer no sangue

periférico por cerca de 120 dias (em camundongos este tempo varia de 30 a 50 dias), os granulócitos, cerca de 7 horas, as plaquetas, por cerca de 10 dias, enquanto que os linfócitos podem persistir por meses ou anos (LORENZI, 2003).

A DPE é uma síndrome em que anemia e deficiências multivitamínicas e minerais podem estar presentes. Crianças com DPE típica apresentam anemia normocítica, normocrômica, com hemoglobina entre 8 a 10 g/dL, com eritropoese medular normal ou discretamente hipoplásica com substituição gordurosa (VILTER 1975; FINCH, 1975).

Dados da literatura em relação a anemia e alterações dos níveis de ferro são contraditórios: em situações em que a falta de ferro tem sido considerada como a principal causa da anemia na desnutrição (RAMDATH e GOLDEN, 1974), outros autores encontraram valores normais para concentração de ferro sérico, aumento da saturação de transferrina e concentrações de ferritina sérica não reduzidos e a medula óssea apresentando depósitos de ferro normais ou elevados. Da mesma forma, biópsias de fígado, obtidas *post-mortem* de indivíduos com Marasmus, apresentam valores elevados de ferro (WATERLOW, 1996, McLAREN *et al.*, 1968).

Fondu e colaboradores, trabalhando com crianças do Zaire que apresentavam DPE, concluíram que a anemia era decorrente da redução na vida média dos eritrócitos, cuja população avaliada foi de 18 dias, sugerindo que o aumento da fragilidade dos eritrócitos era devida à redução de selênio e de vitamina E. Adicionalmente, os mesmos autores sugerem também como causas da anemia, na DPE, a adaptação do organismo a redução da necessidade de oxigênio e às infecções crônicas, freqüentemente presentes (FONDU *et al.*, 1978).

Na desnutrição experimental houve redução da incorporação de ferro e do número de reticulócitos (ASCHKENASY, 1957) e, ainda, bloqueio do processo maturativo de eritroblastos. Trabalhos em ratos demonstraram que a redução de eritropoietina decorria da redução de ingesta de proteínas (ASCHKENASY, 1966 a,b; SEIFTER *et al.*, 1971; SHINGAL, 1977; FRIED *et*

al., 1978). Dados de nosso laboratório evidenciam que a anemia encontrada em camundongos adultos experimentalmente desnutridos não é ferropriva, uma vez que, nesses animais, a concentração plasmática de ferro encontra-se elevada, bem como os valores de saturação da transferrina e ferritina na medula óssea, fígado e baço. A análise da eritropoese medular nos animais desnutridos revelou redução de células eritróides primitivas (dados ainda não publicados) e, da mesma forma que Aschkenasy (1957), temos encontrado alteração na maturação dos eritroblastos. Tendo em vista que excluimos a natureza hemolítica dessa anemia, nossos resultados sugerem que as alterações na proliferação e maturação de eritroblastos podem ser decorrentes do comprometimento do ambiente indutor da hemopoese e/ou dos níveis de eritropoietina. Dados recentes deste laboratório utilizando administração de eritropoietina *in vivo* demonstram que a anemia instalada na desnutrição protéica não é revertida após a administração de eritropoietina, 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 necessária para a ligação da eritropoietina, desencadeando a indução dos mecanismos transduccionais. Além disso, em nosso estudo, obtivemos resultados na imunofenotipagem que demonstram depleção eritróide em animais desnutridos e a hipoplasia eritróide e bloqueio maturativo pela análise do mielograma, além da redução de BFU-E e CFU-E, *in vitro*, em culturas de metilcelulose, com células de animais desnutridos.

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 (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 DPE seria, segundo Suda *et al.*, (1976), devido à redução no compartimento de reserva da medula óssea 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).

Estudos realizados por Fried *et al.* (1978) sobre os efeitos da privação protéica em contagens sanguíneas periféricas, mostraram uma redução do volume hematócrito e plaquetas após 3 semanas de desnutrição, sendo as contagens celulares totais diminuídas rapidamente logo após o início da desnutrição, indicando que os granulócitos e linfócitos são afetados em camundongos com restrição protéica. Neste mesmo estudo, foi avaliado a mesma resposta hematológica de camundongos irradiados, com ou sem restrição protéica, constatando-se que a regeneração medular foi estatisticamente diminuída em camundongos desnutridos, sendo também afetados nestes animais as contagens sanguíneas periféricas (FRIED *et al.*, 1978).

A resposta inflamatória e o processo de reparo que, geralmente, estão relacionados com a eliminação, diluição ou imobilização do agente estranho ao organismo, estão alterados na desnutrição protéico-energética. Em nosso laboratório, observamos que a migração e mobilização celular para os focos inflamatórios, no modelo de lamínula implantada no tecido subcutâneo de camundongos, encontram-se reduzidas (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995), ocorrendo alterações na adesão, no espraiamento, na fagocitose, no “killing” de macrófagos frente a *Candida albicans* (SOUZA *et al.*, 2001) e no “burst” respiratório (BORELLI e NARDINELLI, 2001).

Quanto à produção de citocinas em condições de desnutrição, também não há consenso na literatura. Resultados obtidos em seres humanos desnutridos são ainda controversos quanto à produção de IL-1 por macrófagos (Kauffman *et al.*, 1986). Dados da literatura sugerem que a

capacidade do organismo em responder a IL-1 exógena dependeria das condições nutricionais. Por outro lado, Bradley *et al.* (1990) encontraram concentrações normais para IL-1 e TNF- α em mulheres desnutridas, enquanto Vaisman e Hahn (1991) observaram aumento da síntese de TNF- α em pacientes anoréticos e em pacientes com grau severo de subnutrição. Trabalhos sobre a produção de citocinas indicam redução de IL-2. Esta redução poderia ser um dos mecanismos pelos quais a desnutrição induziria a uma falha na imunocompetência (REIF *et al.*, 1993). Encontramos em nosso modelo, redução na concentração plasmática de IL-1, TNF α , IL-4, γ interferon, em animais desnutridos após estimulação, *in vivo*, com LPS (FOCK *et al.*, 2002). Independentemente da produção ou não de citocinas, as células dos animais desnutridos nos ensaios *in vitro*, não responderam adequadamente aos fatores de crescimento adicionados, sugerindo alteração em processos celulares regulatórios.

Devemos lembrar que, em outras espécies, outros órgãos além da medula óssea, têm função hematopoética (BANNERMAN, 1983). Em relação ao comprometimento da granulopoese medular ser compensada pela granulopoese esplênica, pelo fato que tanto a medula óssea como o baço serem tecidos hematopoéticos ativos em murinos, os estudos são contraditórios. Stojanovic *et al.* (1990) relatam a transferência da hemopoese medular para o baço, entretanto, relatos sobre a desnutrição protéica sobre o microambiente esplênico mostraram, nos ensaios de colônias esplênicas, uma reduzida capacidade do baço destes animais para sustentar o crescimento da CFU-Medular. Estudos realizados neste laboratório sobre granulopoese esplênica mostraram que animais desnutridos apresentam hipoplasia mielóide e aumento da celularidade linfóide, não se observando a transferência ou a compensação da granulopoese medular pela granulopoese esplênica.

A redução na celularidade da medula óssea tem freqüentemente causa idiopática. Outras vezes, sua etiologia envolve agentes químicos, drogas, exposição à irradiação e, ou viroses. A deficiência nutricional, principalmente a deficiência de proteínas, tem sido apontada como causa de

hipoplasia medular desenvolvida em animais submetidos a desnutrição protéica e em indivíduos apresentando graus variados de deficiência protéica. Em relação a dados da literatura referindo a hipoplasia medular em desnutrição, cita-se sobre celularidade total da medula realizado por Olmos e colaboradores (2001) mostrando uma diminuição significativa no número de células totais da medula óssea em ratos desnutridos, sendo esta hipoplasia revertida em parte com a recuperação nutricional, porém não alcançando a celularidade inicial, anterior ao processo de desnutrição. Avaliando, no mesmo trabalho, a capacidade proliferativa, mostraram as alterações no índice mitótico em ratos, sendo a causa dos resultados a restrição protéica (OLMOS *et al.*, 2001).

Como já demonstrado em trabalhos anteriores do grupo, na medula óssea de animais desnutridos o número de progenitores mielóides, monocíticos e eritróides encontra-se reduzidos nesses animais, sugerindo que seja este um dos fatores responsáveis pela hipoplasia observada *in vivo* e pela redução na produção de células *in vitro*. Dados anteriores deste laboratório, em estudos *in vivo* realizados por Borelli *et al.*, (1995), e em estudo análogo em trabalho *in vitro* desenvolvido por Borsatto (1999), apresentado em sua dissertação de mestrado, avaliaram a capacidade proliferativa de progenitores grânulo-monocíticos da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica, observando que esses animais têm menor produção de células e redução de progenitores mielóides na medula óssea.

Em relação à utilização de procedimentos para detectar as células hematopoéticas humanas primitivas identificados em ensaio *in vitro*, constatou-se que a sobrevivência, proliferação e diferenciação das células progenitoras são controladas por vários fatores de crescimento, sendo que a produção de citocinas pode ser decorrente de células do estroma medular (CLARK *et al.*, 1992).

Os resultados obtidos neste trabalho, utilizando ensaios de cultura líquida de células de medula óssea de camundongos desnutridos estimulados com fatores de crescimento hematopoético - IL-3, EPO, GM-

CSF e G-CSF em concentrações padronizadas de acordo com Ec50, sugerem alteração na capacidade proliferativa de progenitores grânulo-monocíticos e eritróides da medula óssea de camundongos submetidos a desnutrição protéica: animais desnutridos apresentam uma menor produção de células sob ação e estímulo de fatores de crescimento externos.

Os resultados dos ensaios clonais com células da medula óssea de camundongos desnutridos também demonstraram significativa redução de progenitores na medula óssea destes animais, revelando redução do número de células viáveis e do número de progenitores grânulo-monocíticos e eritróide com a visualização de menor formação de colônias grânulo-monocíticas, ausência do setor eritróide, fato este observado pelo não aparecimento *in vitro* de colônias eritróides denominadas de *BFU-E* e *CFU-E*, observadas na cultura sob análise morfológica aos 7, 14 e 21 dias.

Os resultados obtidos com animais nutridos se alinham aos encontrados por Dexter e Testa (1980), onde as culturas celulares em suspensão e em meio semi-sólido são formadas de populações de células aderentes e não aderentes. As primeiras contêm células macrofágicas, epiteliais e células adiposas gigantes. Observa-se, inicialmente, uma extensiva granulopoeise, seguida, na maioria dos casos, por um acúmulo de células blásticas. Posteriormente, ambos os tipos celulares declinaram, e a cultura apresentou predomínio de macrófagos. A proliferação, diferenciação e maturação de progenitores hematopoéticos *in vitro* depende da presença contínua de estímulos específicos fornecidos pelos fatores de crescimento e pela concentração destes quando adicionados ao meio de cultura. Tais estímulos refletem diretamente sobre o número e proporção de colônias formadas: M-CFC, G-CFC, GM-CFC e IL-3 e EPO. Contraditoriamente, em células obtidas de animais desnutridos, não se observou intensa granulopoeise no decorrer da cultura, com formação de reduzido número de colônias e cluster e, apesar dos estímulos dos fatores de crescimento, observamos formação de, somente, colônias CFU-GM e, também, alterações na maturação destas células.

O presente trabalho permitiu a quantificação por imunofenotipagem de 3 regiões distintas nos animais desnutridos e nutridos, diferindo na expressão da fluorescência e positividade de células nas regiões e nos marcadores analisados. Vale ressaltar, que a quantificação da intensidade de fluorescência é uma estimativa indireta da quantidade de anticorpos existentes em cada célula e corresponde ao número de antígenos expressos na célula (BUCCHERI, 2003).

A imunofenotipagem realizada com animais *ex vivo* comprovou a hipótese de Borelli (1995) que a desnutrição induz importante comprometimento hematopoético, mostrando redução do número de células presentes nas regiões analisadas. Os resultados com AcMo obtidos neste trabalho mostram uma diminuição significativa de células CD45⁺, em animais desnutridos, principalmente na região de células com baixa intensidade de fluorescência, contendo os blastos. Animais desnutridos apresentam redução de células positivas CD34⁺ nas regiões selecionadas, sugerindo comprometimento da hemopoese medular, pela redução das células primitivas nestes animais. Além disso, a positividade de células CD38 nos animais desnutridos apresentou-se diferenciada em relação ao grupo controle: observamos redução de células positivas para esse marcador e, as células apresentam intensidade de fluorescência mais alta nos animais desnutridos. Por outro lado, o grupo controle apresentou células CD38⁺ em diferentes estádios de diferenciação, predominando as de baixa e média intensidade de fluorescência quando comparadas a co-expressão com células CD45⁺, sugerindo tais resultados, neste trabalho, redução de células tronco e primitivas em animais desnutridos. Estes resultados se alinham aos encontrados anteriormente por Fried e Shapiro (1978), cujos verificaram que camundongos desnutridos e irradiados apresentaram redução no número de unidades formadoras de colônias (CFU) no baço e na medula óssea, com subsequente redução das células maduras no sangue, enquanto que Suda *et al.* (1976) sugeriram redução do "pool" medular nos animais desnutridos.

A hipocelularidade evidenciada por Borelli (1995), por meio de estudos morfológicos, sugerindo que o setor mielóide é afetado na DPE, foi

confirmada pela imunofenotipagem. Observamos em animais desnutridos a diminuição significativa de células positivas para CD117, CD11a, CD14 e CD71; com depleção do setor eritróide pelo Ter 119 na região R1, cujos dados são coincidentes com as análises morfológica das preparações histocitológicas, indicando redução de progenitores mielóides. Esses dados foram esclarecidos com a dupla marcação CD117/CD38, resultados que confirmam a co-expressão desses marcadores no grupo nutrido. Contrariamente, no grupo desnutrido, a grande maioria das células apresentam apenas positividade somente para CD38⁺, com a presença de duas populações - de alta e baixa intensidade de fluorescência – sugerindo linfócitos maduros e blastos, respectivamente, sendo estes últimos não mielóides devido à baixa positividade de células CD117⁺.

A análise da imunofenotipagem também evidenciou, neste estudo, depleção do setor eritróide, na medula óssea de camundongos desnutridos, sendo as populações de baixa e alta intensidade de fluorescência afetadas na DPE pela redução de células eritróides primitivas e maduras, mostradas pelo marcador TER119 e CD71, sugerindo bloqueio maturativo, pois não observamos células em diferentes estádios de fluorescência, cujos dados foram complementados pela análise do mielograma com redução da celularidade eritróide. Tal fato também foi evidenciado pela análise da imunofenotipagem em células de cultura, sendo a necessidade de material protéico associado à presença de ferro e eritropoietina, essencial para a eritropoiese, mostrando alteração na proliferação e maturação celular. Como consequência da hipoplasia eritróide, evidenciamos neste trabalho, que camundongos desnutridos desenvolveram uma anemia com importante reticulocitopenia, cuja característica morfológica mais evidente foi a redução do volume celular, dados esses também acompanhados de plaquetopenia nos mencionados animais.

Observamos neste estudo que as células com baixa expressão de granularidade (SSC) podem demonstrar células positivas para marcadores imaturos como o CD34, CD38 e o CD117, e mínima expressão de antígenos

associados a estágios mais avançados de maturação da granulopoese. A linhagem monomacrofágica expressa pela positividade em células CD14⁺ não foi evidenciada, em ambos os grupos estudados, e, também, não observou-se ligação inespecífica, quando analisados pelo painel CD34/CD14.

A célula multipotente não expressa marcador para linhagem específico, mas apresenta expressão de CD34. A molécula CD34 permite a adesão ao microambiente medular (OSAWA et al., 1996; WHETTON e GRAHAM, 1999; SUDA et al., 1992), pois expressa integrina que interage com receptores e moléculas da matriz extracelular, como a fibronectina mediados pela adesão celular. As células progenitoras hematopoéticas expressam diferentes moléculas de adesão, incluindo CD44 ligando-se a hialuronato e fibronectina, molécula de adesão celular para plaqueta e endotélio (CAM-1), proteína ligante de heparina e L-selectina (WHETTON e GRAHAM, 1999; KRONENWETT et al., 2000). A L-selectina tem sido referida por desempenhar papel na adesão dos leucócitos, sendo expressa em células primitivas CD34⁺/CD38⁻ (WHETTON e GRAHAM, 1999; LÉVESQUE et al., 1995).

As integrinas correspondem a uma superfamília de receptores envolvidos em processos como migração e adesão celular na MEC e ativação de células B e T. No sistema hematopoético humano, as células tronco CD34⁺ expressam as β_1 integrina como as $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$ e $\alpha_6\beta_2$ e as β_2 integrinas como $\alpha_L\beta_2$ (CD11a) (TEIXIDÓ et al., 1993). Em nosso estudo, analisando o marcador de adesão celular CD 11a, observamos diminuição de células positivas e diferenças nos estádios de diferenciação, tanto ex vivo como in vitro, nos animais desnutridos. Fávero (2003) observou, em sua dissertação de mestrado, que a desnutrição induziu modificações na MEC da MO, especialmente do endóstio, local de fixação das células tronco ,e, por isso, considerada como microambiente indutor da hemopoese, sugerindo modificações nos processos de interação e sinalização celular, com alterações na capacidade de auto-renovação, de proliferação e de diferenciação da célula tronco hematopoética, conduzindo à atrofia medular.

O envolvimento do controle da proliferação de células hematopoéticas com alterações na MEC tem sido referido na literatura: Miyake et al. (1993) têm mostrado, em culturas de longa duração de MO, bloqueando anti- α_4 alteração na linfopoese e redução severa da mielopoese (MIYAKE *et al.*, 1991). Em camundongos, o bloqueio de cadeia anti- β_1 reduz formação de colônias *in vivo* no baço e hemopoese medular de células tronco alogênicas (WILLIAMS *et al.*, 1991). Além disso, em culturas de células tronco purificadas com CD34⁺, fibronectina (Fn) em cooperação com IL-3, estimulando a formação de colônias CFU-GEMM, BFU-E, CFU-E, CFU-M, sendo este efeito revertido com peptídeos que bloqueiam interação Fn/VLA-5 (WEINSTEIN ET AL., 1988; ZHOU *et al.*, 1993).

Tem sido demonstrado que a citoadesão de CD34, provavelmente, envolve ativação concomitante da via β_2 integrina e pode ser inibida por anticorpos para LFA-1(CD 11a) e ICAM-1 (CD54), sendo envolvida a via de ativação tirosina quinase e não a via proteína quinase C (MAJDIC, 1994, LANZA *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos vêm demonstrando que integrinas expressas nos leucócitos são reguladas por mecanismos de transcrição ou pós-transcrição em células leucêmicas com super expressão de proteína quinase C - ξ (NOTI *et al.*, 2001).

Estudos realizados com camundongos deficientes de CD34 apontaram significante retardo na diferenciação mielóide e eritróide, podendo ser revertida pela transfecção de uma célula tronco mutante. Estes progenitores também apresentam falência para expansão em cultura líquida em resposta para citocina hemopoéticas (CHENG *et al.*, 1996). Em nosso estudo, observamos diminuição de células tronco hematopoética em animais desnutridos com resposta proliferativa diminuída em cultura líquida e semi-sólida em metilcelulose nestes animais, sob estímulo de citocinas.

A hemopoese ocorre em estreito contato com o microambiente medular, onde células estromais e componentes da matriz extracelular modulam o crescimento e diferenciação de progenitores hematopoéticos (BENTLEY,1981). A MO é um reservatório de células tronco hematopoéticas e sua organização estrutural fornece um microambiente adequado para

proliferação e diferenciação de células precursoras e também para a liberação de células sanguíneas diferenciadas para a circulação (COTRAN *et al.*, 2000). Os mecanismos que levam a esta alteração ainda não foram elucidados, mas, considerando que as moléculas da MEC estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação diferenciação e migração das células hematopoéticas (KLEIN, 1995), exercendo desta forma controle sobre a hemopoese medular.

Trabalhos realizados pelo grupo têm evidenciado, nos níveis celular e molecular, que a desnutrição protéica compromete o microambiente hematopoético e a função celular, com perda ou redução da proliferação celular (BORELLI *et al.*, 1995; XAVIER, 1999; VITURI, 2000, FÁVERO 2003). Considerando que a MO é um tecido hematopoético ativo em condições fisiológicas e que os animais do grupo nutrido não apresentaram redução e alterações morfológicas nestas células, os animais desnutridos apresentaram comprometimento medular significativo caracterizado por depleção da celularidade total, presença evidente de células "adipócitos-like" e deposição de substância hialina nos espaços intercelulares. A hipotrofia medular ocorreu pela redução significativa de todas as linhagens, especialmente das mielóides (FÁVERO, 2003). Essas alterações medulares são semelhantes, ao nosso ver, à degeneração gelatinosa da MO observada em humanos como redução de células hematopoéticas, presença de adipócitos e aumento na deposição de substância hialina no espaço extracelular. (SEAMAN *et al.*, 1978; SEN *et al.*, 2003; TAVASSOLI *et al.*, 1976). Esta degeneração gelatinosa está relacionada em pacientes com deficiência nutricional (SEAMAN *et al.*, 1978; TAVASSOLI *et al.*, 1976) perda de peso e caquexia (BÖHM, 2000), presente, também, nas doenças neoplásicas.

Recentemente Fávero (2003) utilizou métodos imunohistoquímicos para caracterizar a natureza da substância hialina presente nas áreas de hipocelularidade da MO de camundongos desnutridos, pela identificação de cadeias polissacarídicas neutras, moléculas de colágeno e ácido hialurônico, sendo este último, como o principal componente da matriz celular nas

condições patológicas que cursam com degeneração gelatinosa medular (CORNBLEET *et al.*, 1977; SEAMAN *et al.*, 1978, FÁVERO 2003), não podendo descartar outros componentes na MEC envolvidos (BÖHM, 2000). Vituri *et al.* (2000), analisando quantitativamente a MEC obtida da medula óssea de camundongos desnutridos encontrou alterações na proporção de proteínas da MEC, especialmente fibronectina, trombospondina e laminina, o que pode estar contribuindo para a hipoplasia mostrada neste estudo.

São poucos os trabalhos da literatura relacionando desnutrição e MEC: Lyra *et al.* (1993) avaliaram os efeitos da desnutrição sobre o timo de crianças e observaram aumento na densidade da MEC, considerada responsável pela depleção dos timócitos. Reif *et al.*, (1993) observaram que os componentes da MEC diminuíram; a relação proteína/tecido, porém, não apresentou diferença significativa, sugerindo que o principal efeito foi a infiltração gordurosa do fígado com esteatose hepática. Estudos realizados por Axelsson e colaboradores (1990) observaram mineralização óssea, inferindo que a desnutrição leva a síntese de proteoglicanos de peso molecular mais elevado, acarretando inibição da calcificação (AXELSSON *et al.*, 1990).

Dados deste laboratório mostraram que fibronectina desempenha papel central tanto na adesão quanto na migração de células hematopoéticas, particularmente de células precursoras de linhagem eritróide (CLARK, 1992). Células que estão em divisão apresentam maior adesão estática à fibronectina e redução da capacidade de migração, sendo que algumas citocinas como SCF, IL-3 e trombopoietina, podem modular a expressão dos receptores de fibronectina, denominados de VL-4 e VL-5, modulando e regulando a interação fibronectina e célula tronco hematopoética (GIET *et al.*, 2002).

Além disso, a expressão dos antígenos e a modulação entre eles, parecem estar envolvidas entre as células hematopoéticas, em diferentes estádios de diferenciação, sendo requerido para os mecanismos de sinalização intracelular e intercelular, interferindo no desenvolvimento e função de populações celulares da medula óssea, principalmente cita-se a

regulação da tirosina fosfatase, com receptor para CD45 na modulação da transdução de sinais para células B e T, incluindo o receptor CD3/TCR; e da tirosina quinase constituindo os receptores para fatores de crescimento hematopoéticos, onde possuem aspectos estruturais semelhantes e agrupados na superfamília dos receptores de citocinas Classe I.

Figura 65: Esquema representativo dos receptores de células hematopoéticas, mostrando as vias funcionais e os mecanismos de transdução de sinais, de proliferação celular e proteínas envolvidas na ativação e supressão da apoptose (Fonte: Adaptado de esquemas: sinalização da apoptose - Becton Dickinson PharMingen e sinalização da transdução e proliferação celular - Immunotech).

O antígeno CD45 é uma proteína transmembrana com função de tirosina fosfatase (KISHIHARA *et al.*, 1993; WAGNER *et al.*, 1995; BYTH *et al.*, 1996; ZILCH *et al.*, 1998; LIAO *et al.*, 2000; MAJETI *et al.*, 2000; IRLES *et al.*, 2003), sendo expresso em todas células nucleadas hematopoéticas e, também, requerido para vias de sinalização e mecanismos transducionais. Camundongos em que as linhagens T e B se apresentavam alteradas, mostravam-se deficientes em CD45, apresentando profundo bloqueio no desenvolvimento e função de células B e células T (KISHIHARA *et al.*, 1993; BYTH, 1996) - resultados estes que se alinham aos de Kung e colaboradores (2000), os quais mostraram que células de indivíduos que apresentavam deficiência de CD45, adquiriram imunodeficiência combinada severa (SCID), com um fenotipo similar aos observados em camundongos CD45 deficiente. Estudos mostraram que um único ponto de mutação no genes de CD45 é suficiente para causar ativação de linfócitos, direcionando para linfoproliferação e autoimunidade espontânea em camundongos (MAJETI *et al.*, 2000). As mutações em CD45 modificam a função imune em humanos, sugerindo que anormalidades na sua expressão sejam a possível causa de SCID (TCHILIAN *et al.*, 2001).

A presença de CD45⁺ em camundongos está relacionada à imunodeficiência severa, sendo nestes animais o desenvolvimento tímico bloqueado. Apesar do desenvolvimento de células B aparecer normal, a resposta proliferativa está significativamente reduzida (KISHIHARA *et al.*, 1993; BYTH *et al.*, 1996).

A expressão de diferentes isoformas do CD45 depende do estado de ativação e diferenciação de células hematopoéticas. Em humanos tem sido usada para distinguir linfócitos T memória e linfócitos T normais. A variação na expressão de isoformas de CD45 existem em indivíduos normais, mas também podem ser associadas a várias desordens humanas relacionadas a ativação da resposta imune, porém, o mecanismo envolvendo a expressão de diferentes isoformas e atividade do CD45 para função de célula T, não estão totalmente esclarecidos (MASON, 1992; BUJAN *et al.*, 1993; WAGNER *et al.*, 1995; ZILCH *et al.*, 1998; LIAO *et al.*, 2000).

O envolvimento do timo no desenvolvimento das células T tem sido referido ao longo dos anos em humanos e camundongos, com o aparecimento concomitante de linhagem T na medula óssea de camundongos (KLEIN *et al.*, 2003; PERRY *et al.*, 2003). Além disso, a célula tronco hematopoética da medula óssea é capaz de reconstituir desenvolvimento de linhagem T em camundongos timectomizados e irradiados (TSARK *et al.*, 2001). A expressão de pré-T α , RAG₁, RAG₂ também tem sido encontrado em precursores de linhagem de célula T, na presença ou ausência do timo. Estudos recentes têm demonstrado a diferenciação da população linfóide T na medula óssea humana, que expressa a proteína pré-T α na superfície celular, definindo como uma linhagem concomitante ao timo (KLEIN *et al.*, 2003).

Precursos de células plasmáticas do tipo IgA são células derivadas da medula óssea, e que podem ser reconhecidas em placas de Peyer's. Roux e Lopes (1987) demonstraram em ratos Wistar que a restrição protéica no desmame provoca prejuízo em diferenciação de células B que é reconhecido por de placas de Peyer's, com os resultados de células B imaturas (população de células pré-B identificadas como células $c\mu^+ s\mu^-$ Thy1⁺. Estas células pré-B encontradas nas placas de Peyer's de ratos desnutridos representam população de células da medula óssea que não completaram sua diferenciação (LOPES e ROUX, 1989). Estudos posteriores com modelo experimental de imunodeficiência evidenciaram bloqueio na via de células T no timo (MELTON e ROUX, 1989; MELTON, 1990).

A existência de uma relação direta e dependente entre o sistema imune e o estado nutricional do indivíduo tem sido alvo de diversos estudos, cujos indicam que tanto deficiências nutricionais como excesso nutricional influenciam diversos componentes do sistema imune, alterando, conseqüentemente, a resposta imune. A desnutrição é a principal causa da imunodeficiência (CHANDRA, 1997). A caracterização das alterações observadas na hemopoese em decorrência desta síndrome, é importante para a compreensão nos mecanismos envolvidos na imunocompetência. O

estado nutricional é importante para uma ótima e efetiva resposta imune, e esta requer uma cooperação entre o sistema imune inespecífico (pele e membranas mucosas, células fagocíticas, sistema complemento, lisozima e outros fatores humorais) e o sistema específico (linfócitos B e produção de anticorpos, linfócitos T e a imunidade mediada por células). Na DPE, os mecanismos de defesa estão comprometidos o que aumenta a suscetibilidade do hospedeiro às doenças (CHANDRA, 1991).

A dieta pode ser considerada como modulador do sistema imune (MARCOS, 2000). Existem relatos de que na desnutrição ocorrem alterações significativas na imunidade, comprometendo, principalmente a resposta T dependente, a fagocitose, o complemento e a síntese de citocinas. (CHANDRA, 1980, CHANDRA e KUMARI, 1994; PEDERSEN e BRUNSGARD, 1997; XAVIER *et al.*, 1998).

Em crianças desnutridas, encontrou-se redução no percentual da transformação blástica de linfócitos frente a mitógenos (CHANDRA, 1977). A capacidade de proliferação de células da medula óssea e do baço em camundongos desnutridos diminui, havendo redução no número de células pluripotenciais (FRIED *et al.*, 1978) e, portanto, produção das células mielóides encontra-se comprometida (SUDA *et al.*, 1976; FRIED *et al.*, 1978; BORELLI, 1995).

A desnutrição protéica induz alterações estruturais em órgãos linfóides, especialmente em áreas timo-dependentes: a carência de proteínas conduz à linfopenia, involução do timo, baço e linfonodos (ASCHKENASY, 1957; ASCHKENASY, 1966; CHANDRA, 1975; CHANDRA, 1992; CHANDRA e KUMARI, 1994). Aschkenasy (1966) relatou atrofia tímica e involução de órgãos linfóides, com pronunciada redução da celularidade, especialmente, em áreas timo dependentes.

As populações de linfócitos parecem ser atingidas de maneira distinta pela desnutrição. Nas áreas timo dependentes há redução no número de linfócitos T, particularmente da população CD4⁺, estando normal o número de células B no baço, linfonodos e sangue (CHANDRA, 1991). A linfopenia resulta da redução na proliferação celular, decorrente da falta de proteínas

ou outros elementos como ferro, zinco e cobre ou por alteração hormonal (adrenalina, da insulina, da tiroxina e do cortisol (FRAYN, 1986).

Os resultados obtidos mostraram que, na DPE, ocorrem alterações na resposta imune celular, evidenciadas pelos marcadores imunofenotípicos da linhagem linfóide. Observamos que animais desnutridos apresentaram redução da população madura e imatura de linhagem T e B. A expressão de células CD2⁺ foi significativamente maior no desnutrido pois, em murinos, o CD2 é um dos antígenos mais precoce da ontogênese de células T, estando presente durante todo o desenvolvimento da ontogenia tímica de camundongos, exceto para distinguir subtipos CD4/CD8 em timócitos. Na medula óssea, CD2 é expresso em células pre-B, linfócitos T, linfócitos B e linfócitos NK, mas não em células pro-B (KATO *et al.*, 1992; DAVIS *et al.*, 1996).

O CD3 é o antígeno restrito da linhagem de células pan-T: expresso em timócitos e linfócitos T maduros, em todas as espécies de camundongos testadas (ISAKOW *et al.*, 1995). O CD4 está expresso na maioria das células T maduras e timócitos: o CD4 e CD8 aparecem ao mesmo tempo na ontogênese da célula T- CD4, expresso no subtipo auxiliar/indutor (helper) e CD8 expresso no subtipo das células T supressora/citotóxica (supressor). Nossos resultados mostram que a expressão de células CD3⁺ e CD5⁺ está diminuída em células de animais desnutridos evidenciando-se ainda a presença de população celulares com diferentes estádios de diferenciação. Também, observamos que células CD4⁺/CD8⁺ são apenas uma pequena quantidade, tanto nos animais nutridos como desnutridos, sendo que a positividade ainda é maior no desnutrido. Por outro lado, confirmamos neste estudo que, apesar das alterações evidenciadas na expressão e positividade dos marcadores de linhagem T, não existe comprometimento com a linhagem natural Killer (NK) nos animais desnutridos, fato este mostrado pela baixa positividade para o marcador NK1.1, em diferentes painéis com CD34, CD2, CD3 e CD5.

A literatura relativa à resposta imune celular em situações de desnutrição é bastante ampla, mas não conclusiva. A avaliação funcional de

células T por meio da resposta blástica frente a mitógenos, reações de hipersensibilidade retardada, rejeição a enxertos e produção de linfocinas é variável (CHANDRA 1972; MATHUR *et al.*, 1972; ABBASSAY *et al.*, 1974; BELL *et al.*, 1976; ASCHKENASY, 1977; McMURRY, 1984; DRABIK *et al.*, 1987). Assim, se, de um lado temos um grupo de pesquisadores relatando a ocorrência de depressão da resposta celular (BELL *et al.*, 1976; ASCHKENASY, 1977; KEENAM, 1982), de outro, temos trabalhos cujos resultados são opostos, revelando que, na desnutrição protéica, a resposta celular encontra-se estimulada (COOPER e MARIANI, 1974; GOOD e LORENZ, 1988).

Gross e Newberne (1980) consideram que, embora as concentrações de imunoglobulinas pareçam estar normais em casos de desnutrição ou, segundo alguns autores, elevadas (CHANDRA, 1972; WORK, 1973). Estudos funcionais envolvendo células B indicam que o tipo e a intensidade da resposta a diversos antígenos encontra-se alterada (NEWBERNE & GROSS, 1980). Segundo Bounous e colaboradores (1985), tal fato pode ser devido, em termos quantitativos, a uma pequena produção de anticorpos ou ainda, a produção de moléculas de anticorpo com baixa especificidade (BOUNOUS *et al.*, 1985). Os autores observaram que alterações em dietas protéicas modifica a resposta humoral em camundongos, podendo, assim, refletir alterações funcionais dos linfócitos B.

Observamos, em nosso estudo, alterações referentes a imunidade humoral na DPE pela imunofenotipagem, pois as células de animais desnutridos apresentaram redução da população de baixa intensidade de fluorescência, conhecida como blastos, mostrados pelos marcadores CD19 e CD22, com positividade para células CD19 e de CD22 de alta intensidade de fluorescência, característica de células mais maduras, ao passo que, nos nutridos, a população celular expressa baixa fluorescência, sugestiva de células blásticas. Semelhantemente às células de humanos, observamos uma possível co-expressão de marcadores T e B nestes animais.

Em murinos, o antígeno CD19 é uma glicoproteína transmembrana de 95 k-DA, membro da superfamília de imunoglobulina, restrito à linhagem B,

sendo o primeiro a aparecer durante a ontogênese da célula B, seguido do HLA-DR. Está expresso por toda diferenciação dessa célula, não sendo expresso em células plasmáticas e células B – linhagem B1, conhecidas como células B CD5⁺. No entanto, CD22.2, também membro da superfamília de imunoglobulina e associado ao receptor de antígeno de célula B para mediar adesão intercelular, está expresso em altos níveis em células B maduras, células B-1 (células B CD5⁺ e células plasmáticas). O subtipo de célula B CD5⁺ está comissionada a produção de anticorpos, principalmente IgM, mas também IgG e IgA (HASEGAWA *et al.*, 2001).

Observamos, na região de blastos, a expressão de uma população de células que expressam CD117 de baixa intensidade de fluorescência, nos animais desnutridos. A literatura (CARLYLEZ ZUNGA-PFLUCKER, 1998) sugere que tal população possa estar comissionada com linhagem linfóide (CD 117⁺ Low). Nos ensaios *ex vivo*, observamos, no entanto, que essa população não é de linhagem B pelo painel CD117/CD19. Contudo não nos foi possível avançar nessa caracterização, pois não há no mercado anticorpo anti-TdT para camundongos. Com a utilização do marcador CD38, porém, observamos a população comprometida com a linhagem linfóide, duplamente marcada com CD117.

Vale ressaltar que, nesses ensaios, não foram adicionados fatores de crescimento para linhagem linfóide, o que não exclui que as células já poderiam ter vindo "marcadas" da medula óssea e, ou ainda, que pudesse estar havendo síntese *in vitro*, ou alterações nos mecanismos transduccionais via receptores e/ou na tirosina fosfatase do CD45 e tirosina quinase do CD34 causando linfoproliferação.

Estes dados são coincidentes com aqueles encontrados *in vivo*, sugerindo que células da M.O. de animais desnutridos, também *in vitro*, apresentam alterações na diferenciação. Em nossa avaliação, o aumento de células linfóides é relativo e factual, devido à depleção da população mielóide, que, efetivamente, parece-nos ser o setor mais afetado pela desnutrição protéica.

Em relação aos efeitos da desnutrição sobre o ciclo celular, poucos são os trabalhos na literatura. A proliferação celular na medula óssea pode ser influenciada por fatores externos (TICE e IVETT, 1985), existindo evidências de que esteja alterada na desnutrição. A deficiência em nutrientes causa um prolongamento no tempo de geração, (ORTIZ e BETANCOURT, 1984; ORTIZ e BETANCOURT, 1990). Ortiz (1984) demonstrou a relação existente entre a carência protéica e a redução da proliferação celular em vários órgãos. SUDA et al. (1976) relatam que, em condições basais, a cinética celular nos animais desnutridos mostrou-se normal, apesar da redução do "pool" medular; sob estimulação inflamatória, porém, a resposta neutrofílica foi menor, devido, talvez, à redução no "compartimento" de reserva da medula óssea (GOYAL et al., 1981).

Avaliando-se a influência da dieta na proliferação celular, registra-se, em células da medula óssea, após 5 dias de desnutrição, um aumento na porcentagem de células na fase G_0/G_1 do ciclo celular, sendo esses mesmos resultados obtidos após o período de 14 dias de desnutrição experimental. Além disso, a recuperação nutricional, após 5 e 14 dias de restrição protéica, induziu rápida recuperação na porcentagem de células, na fase S, e um decréscimo na porcentagem de células, na fase G_0/G_1 do ciclo celular (DUNKIN JACOBS et al., 1989). As alterações na proliferação celular encontradas na desnutrição protéica experimental se alinham aos estudos desenvolvidos por FREEMAN e colaboradores (1982).

Os resultados deste trabalho evidenciam uma diminuição da proliferação, visto que células da medula óssea de animais desnutridos apresentaram um menor número de marcações pela prata, sugerindo que estejam sob menor taxa de proliferação e/ou de síntese protéica. Esses resultados condizem com os encontrados por Betancourt et al (1992) que observou diminuição da taxa de células em proliferação na medula óssea de ratos desnutridos. Resultados obtidos por Olmos et al (2001), evidenciaram diminuição da porcentagem de NORs nos pares de cromossomos 3, 11 e 12, em ratos *Wistar* submetidos a ração hipoprotéica, em relação aos animais do grupo controle.

Os resultados obtidos com a técnica imunohistoquímica de marcação de PCNA em amostras de medula foram similares aos obtidos pela técnica de AgNORs. Os animais desnutridos apresentaram menor índice de proliferação, em relação aos controles, independentemente da região analisada (endósteo, paratrabecular e sinusoidal). O índice de proliferação obtido para essas regiões analisadas foi significativamente menor nos animais desnutridos em comparação com os animais controle. Como, nessas regiões, predominam células pertencentes a linhagens celulares diferentes, levando-se em consideração os resultados obtidos com a técnica de AgNORs, pode-se dizer que as alterações do microambiente causadas pela desnutrição têm efeito sobre todos os tipos celulares.

Como descrito anteriormente, a proteína PCNA não está somente envolvida com a duplicação do material genético e a proliferação, mas também com o processo de reparo do DNA, de maneira que, os resultados por nós obtidos nesse trabalho, demonstram que a presença dessa proteína está significativamente reduzida em células provenientes de animais desnutridos em relação às de animais controle, possibilitando sugerir que esse seja um dos mecanismos relacionados com a menor capacidade de reparo do DNA, o qual tem sido associado com a desnutrição por outros autores como Betancourt *et al.* (1995) e González *et al.* (2002).

Além disso, de forma indireta, pela utilização da incorporação do iodeto de propídio pela técnica de túnel, analisada por citometria de fluxo, observamos a proliferação de células pela análise do DNA que permite informações sobre o ciclo celular, mostrando, nos desnutridos populações celulares aumentadas na fase G_0/G_1 e S, fato esse não observado na população do grupo nutrido.

Os resultados deste trabalho evidenciam que as células hematopoéticas da medula óssea obtidas de animais desnutridos apresentam menor número de marcações pela prata, sugerindo que estejam sob menor taxa de proliferação e/ou de síntese protéica. Esses resultados condizem com resultados encontrados por Betancourt *et al.* (1992), que observaram diminuição da taxa de células em proliferação na medula óssea

de ratos desnutridos. Resultados obtidos por Olmos e colaboradores (2001), descrevem uma diminuição da porcentagem de NORs nos pares de cromossomos 3, 11 e 12, em ratos Wistar submetidos a uma ração hipoprotéica, em relação a animais controle, também indicando uma diminuição da proliferação.

O controle do tamanho da população celular não depende apenas da proliferação e diferenciação celular, mas há de considerar os mecanismos de morte celular, cujos asseguram que células hematopoéticas maduras e funcionalmente competentes sejam liberadas para periferia (McKENNA e COTTER, 1997). No indivíduo adulto, o número de células se mantém constante, apesar da contínua proliferação e da eliminação por apoptose de células produzidas em excesso, mantendo, conseqüentemente, o equilíbrio entre proliferação e apoptose.

Em desnutrição protéica, não há relatos sobre o aumento de morte celular ou granulopoesse ineficaz na medula óssea. Dados deste trabalho demonstraram que a hipoplasia na MO encontrada em animais desnutridos *ex vivo*, não parece estar relacionada com a redução destas células pelo mecanismo da apoptose, que encontra-se reduzida nesses animais. Apesar de não serem testados neste estudo, vários são os mecanismos regulatórios envolvidos com a apoptose e com a hemopoese normal, também nas doenças hematológicas. Tais mecanismos são descritos por intermédio das diversas literaturas abaixo referenciadas.

A ausência dos fatores de crescimento e citocinas regulatórias das linhagens hematopoéticas em cultura faz com que células entrem em apoptose (NUNEZ *et al.*, 1990; McCONKEY *et al.*, 1991). Células linfóides normais e células linfóides leucêmicas rapidamente morrem por apoptose *in vitro*. Por outro lado, a presença de citocinas produzidas pela MEC atuando em células linfóides imaturas em cultura e em células B na LLC, a apoptose é suprimida na presença de citocinas (McCONKEY *et al.*, 1991; BUSCHLE *et al.*, 1993).

Além da ausência dos fatores externos, a apoptose pode ocorrer em células hematopoéticas pela dimerização e oligomerização de vários

receptores de superfície celular. Por exemplo: a apoptose de células T imaturas é rapidamente induzida pela ligação do receptor de célula T/CD3 (SMITH *et al.*, 1989) e pela *Fas/Apo1* (NAGATA e GOLSTEIN, 1995), enquanto que nas células B a apoptose pode ser induzida pelo comprometimento da imunoglobulina de superfície (CUENDE *et al.*, 1993), e ligação do CD38 (KUMAGAI *et al.*, 1995). A apoptose pode ser também induzida nas células hematopoéticas pela exposição a altas temperaturas (MIGLIORATI *et al.*, 1992), por ionização e radiações (SELLINS e COHEN, 1987) e por uma variedade de drogas citotóxicas, sendo estudada a família dos glicocorticóides (WYLLIE, 1980).

Genes que modulam a apoptose representam uma família de proteínas reguladoras denominadas de indutoras e supressoras. Uma das proteínas reguladoras da apoptose denomina-se *bcl-2*, sendo que a sua expressão, suprime apoptose em células linfohematopoéticas (NUNEZ *et al.*, 1990), embora *Apo1/Fas* induz apoptose (NAGATA e GOLSTEIN, 1995). A proteína *Bcl-2* é encontrada na membrana mitocondrial, retículo endoplasmático e membrana nuclear, e sua atividade requer a formação de heterodímeros, especialmente, com a proteína *Bax*, que acelera apoptose e antagoniza função de *Bcl-2*. O equilíbrio da formação de *Bcl-2/Bax* - heterodímero supressor da morte; e *Bax/Bax* - homodímero ativador da morte, parecem ser moléculas centrais reguladoras da apoptose (OLTVAI *et al.*, 1993; YIN *et al.*, 1994). Adicionalmente, várias outras proteínas da família *Bcl-2* têm sido relatadas, incluindo a proteína supressora *Bcl-X_L* (BOISE *et al.*, 1993), *Mcl-1* (KOZOPAS *et al.*, 1993), *A1* (LIN *et al.*, 1993) e *BAG* (TAKAYAMA *et al.*, 1995) e proteínas indutoras da apoptose como o *Bcl-X_S* (BOISE *et al.*, 1993), *Bad* (YANG *et al.*, 1995) e *Bak* (FARROW *et al.*, 1995).

Quando da maturação dos timócitos, células T imaturas são deletadas por apoptose durante o processo de seleção positiva e negativa, sendo esta induzida pela ligação de CD3 com anticorpos específicos (SMITH *et al.*, 1989). Um importante mediador do sistema imune é *Fas/Apo1*, pelo receptor transmembrana, que é membro da superfamília de receptores de TNF e

NGF (NAGATA e GOLSTEIN, 1995), sendo expresso em células T imaturas e ativadas, natural Killer, células B ativadas, monócitos, células mielóides e fibroblastos. A interação entre *Fas/Apo1* e seus ligantes é um importante regulador da seleção de célula T, que, em murinos uma mutação, resultando na redução da função da *Fas* onde desenvolve doença autoimune como Lupus eritematoso sistêmico (LES) (NAGATA e GOLSTEIN, 1995) e medeia citotoxicidade em célula T (OWEN-SCHAUB *et al.*, 1992). Os linfócitos B reativos são eliminados via apoptose, pela desorganização da expressão de *Bcl-2* (LIU *et al.*, 1991; CYSTER *et al.*, 1994)

Apoptose representa a chave do controle da homeostasia de células progenitoras hematopoéticas, como a regulação dos fatores de crescimento que suprimem apoptose de linhagens mielóides imaturas em cultura que incluem IL-3 (RODRIGUES-TARDUCHY *et al.*, 1990), GM-CSF e G-CSF (WILLIAMS *et al.*, 1991), M-CSF (TUSHINSKI *et al.*, 1982) e EPO (KOURY *et al.*, 1992). Além disso, várias proteínas reguladores da proliferação celular podem induzir apoptose caso superexpressem ou expressem em tempo inapropriado, estas incluem *c-Myc* (PACKHAM *et al.*, 1995), *E2F-1* (WU e LEVINE, *et al.*, 1994), *ciclina A* (HOANG *et al.*, 1994) e *p34^{cdc2}* (SHI *et al.*, 1994), e todas que podem promover inapropriada entrada das células na fase S do ciclo celular.

A expressão inadequada de moléculas que induzem apoptose podem modificar estágios de diferenciação e contribuir para o desenvolvimento de neoplasia, devido alterações na sobrevivência da célula. Alterações na expressão e mutações de *bcl-2* e do *p53* promovem modificações no balanço homeostático. Em camundongos, a alterações de *Bcl-2* desenvolvem um controle aumentado na transcrição de imunoglobulinas, mostrando hiperplasia e acúmulo de células B, com aumento na sobrevivência *in vitro* (McDONNELL e KORSMEYER, 1991). Esses mesmos animais, após longo período de latência, desenvolveram linfomas clonais de células B (McDONNELL *et al.*, 1989)

Além disso, por citometria de fluxo, têm sido demonstrado alterações de *bcl-2* em pacientes com LLA-B e LLA-T (COUSTAN-SMITH *et al.*, 1996) e

a possível contribuição de sua superexpressão para o prolongamento no ciclo de vida de células progenitoras hematopoéticas. O aumento da expressão de *c-myc* promove transformação neoplásica, ambos *in vitro* e *in vivo* (PACKHAM e CLEVELAND, 1995)

Esses resultados podem justificar as alterações hematológicas quantitativas como leucopenia, alterações na produção de eritrócitos, linfocitopenia, e neutropenia como reflexo do comprometimento dos órgãos linfohematopoéticos em condições de desnutrição. Na medula óssea a produção deficiente de células mielóides em animais desnutridos não parece ser uma consequência só da insuficiência geral de proteína, mas sim reflexo de modificações dos fatores de estimulação que controlam a proliferação, a diferenciação e a liberação dessas células.

Os dados existentes na literatura a respeito dos precursores hematopoéticos na desnutrição são bastante restritos e, constatamos redução do número de células tronco e alterações na dinâmica da população de células tronco na medula de camundongos.

A proliferação celular na medula óssea, influenciada por fatores externos, é alterada na desnutrição, pois nossos resultados indicam redução da capacidade proliferativa de células da MO, em ensaios *in vitro*, sob estímulo de citocinas e, *ex vivo*, com utilização de marcadores da proliferação celular. Animais desnutridos apresentam uma menor produção de células sob ação e estímulo de fatores de crescimento externos e o número de progenitores mielóides, na medula óssea, encontra-se reduzido, nesses animais, sugerindo que seja esse um dos fatores responsáveis pela hipoplasia observada *in vivo* nesses animais.

O comprometimento da hemopoese na desnutrição, pode estar relacionado à redução de fatores de crescimento hemopoéticos; à modificações nas células precursoras e progenitoras da linhagem; modificações no estroma dos órgãos hematopoéticos, alterando interação célula-célula e/ou célula-estroma, provocando alterações de citocinas e/ou influência de citocinas inibitórias na hemopoese e vias de sinalização intracelular alterando a proliferação e morte celular.

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho observamos que camundongos submetidos à desnutrição protéica experimental apresentam alterações na hemopoese, causando anemia, leucopenia e hipoplasia de medula óssea, com severa depleção do tecido mielóide, destacando-se dos setores eritróides e grânulo-monocíticos. A redução da celularidade da medula óssea em animais desnutridos não é, ao menos nessa fase da desnutrição, ocasionada por apoptose.

A depleção hematopoética decorreu, em parte, pela redução da população de células primitivas e por alterações no processo de diferenciação e maturação, tanto no setor mielóide como linfóide T e B. Estes progenitores também apresentam falência para expansão em cultura líquida em resposta para citocinas hematopoéticas.

A proliferação celular do setor mielóide medular está reduzida em camundongos desnutridos; os resultados observados mostram redução da capacidade proliferativa de células da MO, em ensaios *in vitro* sob estímulo de citocinas, e *ex vivo* com utilização de marcadores da proliferação celular como o PCNA e AgNOR.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

- ABBASSY, A.S.; EL-DIN, M.K.; HASSAN, A.I.; AREF, G.H.; HAMMAD, S.A.; EL-ARABY, I.I.; EL-DIN, A.A.; SOLIMAN, M.H.; HUSSEIN, M. Studies of cell-mediated immunity and allergy in protein energy malnutrition. I. Cell-mediated delayed hypersensitivity. *J. Trop. Med. Hyg.*, Oxford, v.77, p.13-17, 1974.
- AKNER, G.; CEDERHOLM, T. Treatment of protein-energy malnutrition in chronic nonmalignant disorders. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.74, p.6-24, 2000.
- ALBELDA, S.M.; BUCK, C.A. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.*, Bethesda, v.4, p.2868-2880, 1990.
- ALXELSSON, I.; PITA, J.C.; HOWELL, D.S.; LORENTZON, R.; BERNANI, I.; BOQUIST, L. Kinetics of proteoglycans and cells in growth plate of normal, diabetic, and malnourished rats. *Pediatr. Res.*, Baltimore, v.27, p.41-44, 1990.
- ANDREWS, R.G.; SINGER, J.W.; BERSNTAIN, I.D.; Monoclonal antibody 12-8 recognizes a 115-kd molecule present on both unipotent and multipotent hematopoietic colony-forming cells and their precursors. *Blood*, Orlando, v.67, p.842-845, 1986.
- ARAI, K.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.; MIYATAKE, S.; ARAI, N.; YOKOTA, T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu. Rev. Biochem.*, Palo Alto, v.59, p.783-836, 1990.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

- ARENDS, M.J.; MORRIS, R.G.; WYLLIE, A.H. Apoptosis the role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v.136, p.593-606, 1990.
- ASCHKENASY, A. Effect of a protein-free diet on lymph node and spleen cell response *in vivo* to blastogenic stimulantes. *Nature*, London, v.254, p.63-65, 1975.
- ASCHKENASY, A. Effects of a protein-free diet on the DNA-synthesizing and dividing cells in the lymphoid organs of rats. Changes induced by phytohemagglutinin and cortisone *in vivo*. *Life Sci.*, New York, v.21, p.253-259, 1977.
- ASCHKENASY, A. Effects of oral desferrioxamine on intestinal absorption of mineral Fe⁵⁹ and on the tissue distribution of this isotope in rats. Erythropoietin-desferrioxamine interaction. *Thérapie*, Paris, v.21, p.913-928, 1966.
- 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. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.*, Paris, v.11, p.1010-1022, 1966.
- ASCHKENASY, A. On the pathogenesis of anemias and leukopenias induced by dietary protein deficiency. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.5, p.14-25, 1957.
- ASSOAIAN, R.K. Anchorage-dependent cell cycle progression. *J. Cell Biol.*, New York, v.136, n.1, p.1-4, 1997.
- ATHENS, J.W. Variations of leukocytes in disease. In: LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N., eds. *Wintrobe's*

clinical hematology. 9.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.1564-1588.

ATHENS, J.W.; RAAB, S.O.; HAAB, O.P.; MAUER, A.M.; ASHENBRUCKER, H.; CARTWRIGHT, G.E.; WINTROBE, M.M. Leukokinetic studies. III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. *J. Clin. Invest.*, Ann Arbor, v.40, p.159-164, 1961.

AUGUSTO, A.P. Avaliação nutricional. In: _____.; ALVES, D.C.; MANNARINO, I.C.; GERUDE, M. *Terapia nutricional*. São Paulo: Atheneu, 1995. p.28-34.

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

BANSAL-RAJBANSHI, M.; MATHUR, M. Testicular morphology and cell proliferation kinetics of immature germ cells and Sertoli cells in suckling undernourished rats. *Cell Tissue Kinet.*, Oxford, v.18, p.183-191, 1985.

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

BASERGA, R. The biology of cell reproduction Cambridge, Mass.: Harvard University Press, 1985. 251p.

BAUER, J.D. Hematology. In: GRADWOHL, R.B.H.; SONNENWIRTH, A.C.; JARETT, L., eds. *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. 8.ed. Saint Louis: C. V. Mosby, 1980. cap.III, p.1877-1959.

- BAUNHETER, S.; SINGER, M.S.; HENZEL, W.; HEMMERICH, S.; RENZ, M.; ROSEN, S.D. Binding of L-selection to the vascular sialomucin CD34. *Science*, Washington, v.262, p.436-438, 1993.
- BAUNHUETER, S.; DYBDAL, N.; KYLE, C.; LASKY, L.A. Global vascular expression of murine CD34 a sialomucin-like endothelial ligand for L-selectin. *Blood*, Orlando, v.84, p.2554-2565, 1994.
- BECKER, A.J.; McCULLOCH, E.A.; TILL, J.E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, London, v.197, p.452, 1963.
- BEISEL, W.R. Metabolic effects of infection. *Prog. Food. Nutr. Sci.*, Oxford, v.8, p.43-75, 1984.
- BEISEL, W.R. Metabolic effects of infection. *Prog. Food. Nutr. Sci.*, Oxford, v.8, p.43-75, 1984.
- BEISEL, W.R. Metabolic effects of infection. *Prog. Food. Nutr. Sci.*, Oxford, v.8, p.43-75, 1984.
- BELL, R.C.; HOFFMAN-GOETZ, L.; KEIR, R. Monocyte factors modulate in vitro T-lymphocyte mitogenesis in protein malnutrition. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.63, p.194-202, 1985.
- BELL, R.G.; HAZELL, L.A.; SHERIDAN, J.W. The influence of dietary protein deficiency on hemopoietic cells in the mouse. *Cell Tissue Kinet.*, Oxford, v.9, p.305-312, 1976.
- BELLIDO, M.; MARTINO, R.; AVENTIN, A.; CARNICER, M.J.; RUBIOL, E.; LÓPEZ, O.; SIERRA, J.; NOMDEDÉU, J.F. Leukemic relapse as T-cell acute lymphoblastic leukemia in a patient with acute myeloid leukemia

and a minor T-cell clone at diagnosis. *Haematologica*, Pawia, v.85, n.10, p.1083-1086, 2000.

BENDER, J.G.; UNVERZAGT, K.L.; MAPLES, P.B.; MEHROTRA, Y., MELLON, J.; VAN EPPS, D.E.; STEWART, C.C. Functional characterization of mouse granulocytes and macrophages produced in vitro from bone marrow progenitors stimulated with interleukin 3 (IL-3) or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). *Exp. Hematol.*, New York, v.20, p.1135-1140, 1992.

BENE, M.C.; CASTOLDI, G.; KNAPP, W. Proposal for the immunological of acute leukemias: European group for the immunological characterization of leukemia (egil). *Leukemia*, Basingstoke, v.9, p.1783-1786, 1995.

BENJAMIN, D.R.; GOWN, A.M. Aberrant cytoplasmic expression of proliferating cell nuclear antigen in Hodgkin's disease. *Am. J. Surg. Pathol.*, New York, v.15, n.8, p.764-768, 1991.

BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.L.; GALTON, D.A.G.; GRAINICK, H.R.; SULTAN, C. Proposal for the classification of acute leukemias. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v.33, p.451-458, 1976.

BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.L.; GALTON, D.A.G.; GRAINICK, H.R.; SULTAN, C. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v.47, p.553-561, 1981.

BENNET, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.L.; GALTON, D.A.G.; GRAINICK, H.R.; SULTAN, C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.103, p.620-629, 1990.

- BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D.A.G.; GRALNICK, H.R.; SULTAN, C. Criteria for the diagnosis of acute-leukemia of megakaryocyte lineage (M7) - A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.103, n.3, p.460-462, 1985.
- BENTLEY, S.A. Close range cell-cell interaction required for stem cell maintenance in continuous bone marrow culture. *Exp. Hematol.*, New York, v.9, p.308-312, 1981.
- BENTLEY, S.A.; FOIDART, J.M.; KLEINMAN, H.K. Connective tissue elements in rat bone marrow: immunofluorescent visualization of the hematopoietic microenvironment. *J. Histochem. Cytochem.*, Seattle, v.32, n.1, p.114-116, 1984.
- BERKOWITZ, F.E. Infections in children with severe protein-energy malnutrition. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, Baltimore, v.11, p.750-759, 1992.
- BETANCOURT, M.; ORTIZ, R.; GOMES, J.L.; HERNANDEZ, M.E.; CRAVIOTO, J. Effect of renutrition on cellular proliferation and SCE in bone marrow cells from malnourished rats. *Nutr. Rep. Int.*, Los Altos, v.40, p.959-964, 1989.
- BETANCOURT, M.; ORTIZ, R.; GONZÁLEZ, C. Proliferation index in bone marrow from severely malnourished rats during lactation. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.238, p.173-177, 1992.
- BETANCOURT, M.; ORTIZ, R.; GONZALEZ, C.; PEREZ, P.; CORTES, L.; RODRÍGUEZ, L.; VILLASENOR, L. Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel

- electrophoresis/comet assay. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.331, n.1, p.65-77, 1995.
- BHASKARAM, P.; SIVAKUMAR, B. Interleukin-1 in malnutrition. *Arch. Dis. Child.*, London, v.61, p.182-185, 1986.
- BHÖM, J. Gelatinous transformation of the bone marrow. The spectrum of the underlying diseases. *Am. J. Surg. Pathol.*, New York, v.24, n.1, p.56-65, 2000.
- BITH, K.F.; CONROY, L.A.; HOWLETT, S.; SMITH, A.J.; MAY, J.; ALEXANDER, D.R.; HOLMES, N. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4⁺ CD8⁺ thymocytes, and B cell maturation. *J. Exp. Med.*, New York, v.183, p.1707-1718, 1996.
- BOISE, L.H.; GONZALES GARCIA, M.; POSTEMA, C.E.; DING, L.Y.; LINDSTEN, T.; TURKA, L.A.; MAO, X.H.; NUNEZ, G.; THOMPSON, C.B. Bcl-x, a bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*, New York, v.74, n.4, p.597-608, 1993.
- BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC, R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and cell mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutr. Res.*, New York, v.15, p.1477-1485, 1995.
- BORELLI, P.; NARDINELLI, L. Protein calorie-malnutrition a decreased in the macrophage's respiratory burst capacity. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.37, p.51-60, 2001.
- BORELLI, P.; PAIVA, R.P.; TOLEDO, M. Avaliação das proteínas da membrana eritrocitária de camundongos desnutridos: estudo preliminar.

In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 15, Caxambu, 2000. *Resumos*. Caxambu: FESBE, 2000.

BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z.; KANG, H.C. Protein malnutrition: some aspects of the *in vitro* adhesion of peritoneal mouse macrophages. *Ann. Nutr. Metab.*, Basel, v.42, p.367-373, 1998.

BORSATTO, E.M. *Desnutrição protéica: avaliação in vitro da capacidade proliferativa de progenitores grânulo-monocíticos da medula óssea de camundongos*. São Paulo, 1999. 84p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

BOUNOUS, G.; SHENOUDA, N.; KONGSHAVN, P.A.; OSMOND, D.G. Mechanism of altered B-cell response induced by changes in dietary protein type in mice. *J. Nutr.*, Bethesda, v.115, p.1409-1410, 1985.

BØYUM, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.*, Oxford, v.5, p.9-15, 1968.

BØYUM, A.; HELGESTAD, J.; LOVHAUG, D. Thymidine-dependent effect of granulocyte-derived inhibitor on granulocyte-macrophage progenitor cells (GM-CFC). *Eur. J. Haematol.*, Copenhagen, v.40, n.11, p.9-125, 1988.

BRACH, M.A.; HERRMANN, F. Hematopoietic growth factors: interactions and regulation of production. *Acta Haematol.*, Basel, v.86, p.128-137, 1991.

BRADLEY, S.F.; VIBHAGOLL, A.; FABRICK, S.; TERPENNING, M.S.; KAUFFMANN, C.A. Monokine production by malnourished nursing home patients. *Gerontology*, Basel, v.36, p.165-170, 1990.

- BRADLEY, T.R.; METCLAF, D. The growth of mouse bone marrow cells *in vitro*. *J. Exp. Biol. Med.*, v.44, p.287-300, 1966.
- BRANDES, M.; LEGLER, D.F.; SPOERRI, B.; SHAERLI, P.; MOSER, B. Activation-dependent modulation of B lymphocyte migration to chemokines. *Int. Immunol.*, Oxford, v.12, n.9, p.1285-1292, 2000.
- BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J. Cell Biol.*, New York, v.105, p.1549-1554, 1987.
- BROSTOFF, J.; SCADDING, G.K.; MALE, D.K.; ROITT, I.M. *Clinical immunology*. London: Gower Medical Publishing, 1991. 448p.
- BRUNDTLAND, G.H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. *Nutr. Rev.*, Secaucus, v.58, p.51-54, 2000.
- BUCCHERI, V. Citometria de fluxo em hematologia – imunofenotipagem nas doenças malignas do sistema hematopoiético. In: LORENZI, T.F. *Manual de hematologia: propedêutica e clínica*. 3.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. p. 567-582.
- BUJAN, W.; SCHANDENE, L.; FERSTER, A.; DE VALCK, C.; GOLDMAN, M.; SARIBAN, E. Abnormal T cell phenotype in familial crythrophagocytic lymphoistiocytosis. *Lancet*, London, v.342, p.1296, 1993.
- BURGESS, A.W.; METCALF, D. The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*, Orlando, v.56, n.6, p.947-958, 1980.
-

- BUSCHLE, M.; CAMPANA, D.; CARDING, S.R.; RICHARD, C.; HOFFBRAND, A.V.; BRENNER, M.K. Interferon-gamma inhibits apoptotic cell death in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.*, New York, v.177, p.213-218, 1993.
- BUYS, L.H.C.M.; OSINGA, J. Abundance of protein-bound sulfhydryl and disulfide groups of chromosomal nucleolus organizing regions. *Chromosoma*, Berlin, v.7, p.1-11, 1980.
- BYTH, K.F.; CONROY, L.A.; HOWLETT, S.; SMITH, A.J.H.; MAY, J.; ALEXANDER, D.R.; HOLMES, N. CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes and in B cell maturation. *J. Exp. Med.*, New York, v.183, n.4, p.1707-1718, 1996.
- CANNOVO, N.; BOSSY, D.; HIM, J. Significant diversity of the reactivity of monoclonal CD34 antibodies requires an extended classification of the CD34 epitopes. *Lab. Hematol.*, Charlottesville, v.3, p.253-260, 1997.
- CARLYLE, R.J.; ZÚÑIGA-PFLÜCKER, J.C. Lineage commitment and differentiation of T and natural killer lymphocytes in the fetal mouse. *Immunol. Reviews*, v.165, p.63-74, 1998.
- CATCHATOURIAN, R.; ECKERLING, G.; FRIED, W. Effect of short-term protein deprivation on hemopoietic functions of healthy volunteers. *Blood*, Orlando, v.55, p.625-628, 1980.
- CHANDRA, R.K. Cell mediated immunity in nutritional imbalance. *Fed. Proc.*, Washington, v.39, p.3088-3092, 1980.
- CHANDRA, R.K. Food antibodies in malnutrition. *Arch. Dis. Child.*, London, v.50, p.532-534, 1975.

- CHANDRA, R.K. Immuno competence in undernutrition. *J. Pediatr.*, Saint Louis, v.81, p.1194-1200, 1972.
- CHANDRA, R.K. Immunocompetence in undernutrition and overnutrition. *Nutr. Rev.*, Secaucus, v.39, n.6, p.225, 1981.
- CHANDRA, R.K. Lymphocyte subpopulations in human malnutrition cytotoxic and suppressor cells. *Pediatrics*, Elk Grove Village, v.59, p.423-427, 1977.
- CHANDRA, R.K. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.53, p.1087-1101, 1991.
- CHANDRA, R.K. Protein-energy malnutrition and immunological responses. *J. Nutr.*, Bethesda, v.122, p.597-600, 1992.
- CHANDRA, R.K.; KUMARI, S. Nutrition and immunity: an overview. *J. Nutr.*, Bethesda, v.124, p.1433-1435, 1994.
- CHANDRA, R.K.; KUMARI, S. Nutrition and immunity: an overview. *J. Nutr.*, Bethesda, v.124, p.1433S-1435S, 1994.
- CHANDRA, S.; CHANDRA R.K. Nutrition, immune response, and outcome. *Prog. Food Nutr. Sci.*, Oxford, v.10, p.1-65, 1986.
- CHENG, J.; BAUNHUETER, S.; CACAIANO, G. Haematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. *Blood*, Orlando, v.87, p.479-490, 1996.

- CHEW, F.; TORÚN, B. Protein-energy malnutrition. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J., eds. *Williams, William J. Hematology*. 5.ed. New York: MacGraw Hill, 1995.
- CIVIN, C.I.; TRISCHMAN, T.; FACKLER, M.J. Report on the CD34 cluster workshop. In: KNAPP, W., eds. *Leukocyte typing IV*. Oxford: Oxford University Press, 1989. p.818-825. (Papers of the 4th. International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens).
- CIVIN, C.L.; STRAUSS, L.C.; BROVALL, C.; FACKLER, M.J.; SCHAWARTZ, J.F.; SHAPER, J.H. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor-cell surface antigen defined by a monoclonal-antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.*, Bethesda, v.133, n.1, p.157-165, 1984.
- CLARK, B.R. GALLAGHER, J.T.; DEXTER, T.M. Cell adhesion in the stromal regulation of hematopoiesis. *Baillieres Clin. Haematol.*, London, v.5, n.3, p.619-652, 1992.
- COOK, S.J.; BALMANNO, K.; GARNER, A.; MILLAR, T.; TAVERNER, C.; TODD, D. Regulation of cell cycle re-entry by growth, survival and stress signaling pathways. *Biochem. Soc. Trans.*, Colchester, v.28, n.2, p.233-239, 2000.
- COOPER, W.C.; GOOD, R.A.; MARIANI, T. Effects of protein insufficiency on immune responsiveness. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.27, p.647-664, 1974.
- CORNEBLEET, P.J.; MOIR, R.C. WOLF, P.L. Histochemical study of bone marrow hypoplasia in anorexia nervosa. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histol.*, Berlin, v.374, n.3, p.239-247, 1977.

- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T., eds. Environmental and nutritional diseases. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T., eds. *Robbins pathologic basis of disease*. 5.ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. cap.9, p.329-402.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; ROBBINS, S.L. *Robbins patologia estrutural e funcional*. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251p.
- COWLING, G.J.; DEXTER, T.M. Apoptosis in the haemopoietic system. In: DEXTER, T.M.; RAFF, M.C.; WYLLIE, A.H., eds. DEXTER, M.C.; RAFF, A.H.; Wyllie, T.M. *The role of apoptosis in development, tissue homeostasis and malignancy*. death from inside out. London: Chapman & Hall, 1995. New York ; p.21-27.
- CRISPIM, J.C.O.; CÂMARA, C.K.F.; FONSECA, H.E.M.; PAIVA, A.S.; JÚNIOR, F.F.N.; FERNANDES, M.C.L.; CAVALCANTI E SILVA, D.G.K.; JÚNIOR CAVALCANTI, G.B. Avaliação imunológica da leucemia mielóide através da citometria de fluxo. *RBAC*, Rio de Janeiro, RJ, v.32, n.2, p.73-79, 2000.
- CROSS, F.; ROBERTS, J; WEINTRAUB, H. Simple and complex cell-cycles. *Annu. Rev. Cell Biol.*, Palo Alto, v.1, p.237, 1989.
- CUENDE, E.; ALESMARTINEZ, J.E.; DING, L. GONZALEZGARCIA, M.; MARTINEZA, C.; NUNEZ, G. Programmed cell-death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *EMBO J.*, Oxford, v.12, n.4, p.1555-1560, 1993.
- CUTLER, R.L.; METCLF, D.; NICOLA, N.A.; JOHNSON, G.R. Purification of a multipotential colony-stimulating factor from pokeweed mitogen-

- stimulated mouse splenn cell conditioned medim. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.260, n.11, p.6579-6587, 1985.
- CYSTER, J.G.; HARTLEY, S.B.; GOODNOW, C.C. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature*, London, v.371, p.389-395, 1994.
- DA SILVA, H.F.; DEFFUNE, E.; MACHADO, P.E.A. Ciclo celular e regiões organizadoras de nucléolo. *Laes Haes*, São Paulo, v.20, p.114-122, 1999.
- DANEM, E.H.J.; YAMADA, K.M. Fibronectin, integrins, and growth control. *J. Cell. Physiol.*, New York, v.189, n.1, p.1-13, 2001.
- DARZYNKIEWCZ, Z.; GONG, J.P.; JUAN, G.; ARDELT, B.; TRAGANOS, F. Citometry of cyclin proteins. *Cytometry*, New York, v.25, p.1-13, 1996.
- DAVIS, S.J.; van der MERWE, P.A. The structure and ligand interactions of CD2: implications for T-cell function. *Immunol. Today*, v.17, p.177-187, 1996.
- DE ANGELIS, R.C. Desnutrição calórico-protéica (Má nutrição calórico-protéica). In: _____. *Fisiologia da nutrição*. 3.ed. São Paulo, SP: Nobel, 1986. 2v., p.38-56.
- DE ANGELIS, R.C. *Fisiologia da nutrição*. São Paulo: Edart, 1977. 2v.
- DE LA FUENTE, M.; MUNOZ, M.L. Impairment of phagocytic process in macrophages from young and old mice by protein malnutrition. *Ann. Nutr. Metab.*, Basel, v.36, p.41-47, 1992.

- DE ONIS, M.; MONTEIRO, C.; AKRÉ, CLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: na overview from the database on child growth. *Bull. W. H. O.*, Geneva, v.71, n.6, p.703-712, 1993.
- DENHARDT, D.T.; EDWARDS, D.R.; PARFETT, C.L.J. Gene-expression during the mammalian-cell cycle. *Biochim. Biophys. Acta*, v.865, n.2, p.83-125, 1986.
- DEO, K.; BIJLANI, V.; DEO, M.G. Effects of malnutrition on cell genesis and migration in developing brain in rats. *Exp. Neurol.*, Orlando, v.62, n.1, p.80-92, 1978.
- DEO, M.G.; BIJLANI, V.; RAMALINGASWAMI, V. Nutrition and cellular growth and differentiation. In: BRAZIER, M.A.B., eds. *Growth and development of the brain: nutritional, genetic and environmental factors*. New York: Raven Press, 1975. p.1-16. (International Brain Research Organization. Monograph series, v.1) (International Physiological Congress, 26, New Delhi, 1974).
- DERENZINI, M. The AgNORs. *Micron*, Amsterdam, v.31, n.2, p.117-120, 2000.
- DEXTER, T.M., TESTA, N.G. *In vitro* methods in haemopoiesis and lymphopoiesis. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.38, p.177-190, 1980.
- DEXTER, T.M.; GARLAND, J.M.; TESTA, N.G. *Colony-stimulating factors*. Ney York: Marcel Dekker, 1990. p.475.
- DEXTER, T.M.; MOORE, M.S.; SHERIDAN, A.P.C. Maintenance of hematopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow chimeras *in vitro*. *J. Exp. Med.*, New York, v.145, p.1612-1616, 1977.

- DRABIK, M.D.; SCHNURE, F.C.; MOK, K.T.; MOLDAUER, L.L.; DINARELLO, C.A.; BLACKBURN, G.L.; BISTRAN, B.R. Effect of protein depletion and short-term parenteral refeeding on the host response to interleukin-1 administration. *J. Lab. Clin. Med.*, Saint Louis, v.109, p.509-516, 1987.
- DUKE, R.C.; COHEN, J.J. IL-2 addiction: withdrawal of growth factor activates a suicide program in dependent T cells. *Lymphokine Res.*, New York, v.5, p.289-299, 1986.
- DUNKI JACOBS, P.B.; RUEVEKAMP, M.; HART, G.A.M.; DEGRAAF, P.W. Dietary influences on cell proliferation in bone marrow. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, Oxford, v.25, n.6, p.953-957, 1989.
- EAVES, C.J.; CASHMAN, J.D.; EAVES, A.C. Methodology of long-term culture of human hematopoietic cells. *J. Tissue Cult. Methods*, Gaithersburg, v.13, p.56-62, 1991.
- EAVES, C.J.; CASHMAN, J.D.; SUTHERLAND, H.J.; OTSUKA, T.; HUNPHRIES, R.K.; HOGGE, D.E.; LANDSDROP, P.L.; EAVES, A.C. Molecular analysis of primitive hematopoietic cell proliferation control mechanisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v.628, p.298-306, 1991.
- EINOLF, H.J.; GUENGERICH, F.P. Kinetic analysis of nucleotide incorporation by mammalian DNA polymerase delta. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.275, n.21, p.16316-16322, 2000.
- FARAHAT, N.; VAN DER PLAS, D.; PRAXEDES, M.; MORILLA, R.; MATUTES, E.; CATOVSKY, D. Demonstration of cytoplasmic and nuclear antigens in acute leukemia using flow cytometry. *J. Clin. Pathol.*, London, v.47, n.9, p.843-849, 1994.

- FÁVERO, M.E. *Avaliação imunohistoquímica e ultraestrutural da matriz extracelular da medula óssea de camundongos submetidos á desnutrição protéica*. São Paulo, 2003. 92p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- FERRO-LUZZI, A.; SPADONI, M.A. Protein energy malnutrition. *Prog. Food Nutr. Sci.*, Oxford, v.2, p.515-541, 1978.
- FINCH, C.A. Erythropoiesis in protein-calorie malnutrition. In: OLSON, R.E., ed. *Protein-calorie malnutrition*. New York: Academic Press, 1975. p.247-256. (The Nutrition Foundation monograph series) (Papers presented at a symposium sponsored by the Faculties of Medicine of Chiang Mai and St. Louis Universities and the International Union of Nutritional Sciences and held Jan. 8-11, 1973 in Chiang Mai).
- FISCHER, J.W. Erythropoietin: physiologic and pharmacologic aspects. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Malden, v.216, p.358-369, 1997.
- FOCK, R.A.; BLATT, S.L.; FAVERO, M.E.; SOUZA, A.C.; BORELLI, P. *Avaliação in vivo da produção de citocinas em camundongos desnutridos submetidos a processo inflamatório*. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, São Paulo, v.38, supl.1, p.33, res.ACT62, 2002. (Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF/USP, 7, Seminário de PósGraduação, 17, Reunião de Iniciação Científica, 10, Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica, 37, São Paulo, 2002).
- FONDU, P.; HARIGA-MULLER, C.; MOZES, N.; NEVE, J.; VAN STEIRTEGHEM, A.; MANDELBAUM, I.M. Protein-energy malnutrition and anemia in Kivi. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.31, p.46-56, 1978.

- FRAYN, K.N. Hormonal control of metabolism in trauma and sepsis. *Clin. Endocrinol.*, Oxford, v.24, p.577-599, 1986.
- FRIED, W.; GURNEY, C.W. Erythropoietic effect of plasma from mice receiving testosterone. *Nature*, London, v.206, p.1160-1161, 1965.
- FRIED, W.; SHAPIRO, S.; BARONE, J.; ANAGNOST, A. Effect of protein deprivation on hematopoietic stem cells and on peripheral blood counts. *J. Lab. Clin. Med.*, Saint Louis, v.92, p.303-310, 1978.
- GADDUCCI, A.; COSIO, S.; FANUCCHI, A.; GENAZZANI, A.R. Malnutrition and cachexia in ovarian cancer patients: pathophysiology and management. *Anticancer Res.*, Attiki, v.21, p.2941-2947, 2001.
- GAHNBERG, C.G.; VALMU, L.; TIAN, L.; KOTOVUORI, P.; FAGERHOLM, S.; KOTOVUORI, A.; KANTOR, C.; HILDEN, T. Leukocyte adhesion: a fundamental process in leukocyte physiology. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.32, p.511-517, 1999.
- GARCIA, P.B. *Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição proteica: análise da mobilização celular e da hematopoese*. São Paulo, 1992. 2v. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.
- GARCIA, P.B. *Influência da carência proteica na função fagocitária dos granulócitos neutrófilos de ratos (Rattus norvegicus, albinus)*. São Paulo, 1984. 120p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- GARCIA, P.B.; BARBIERI, D. Influência da desnutrição proteica sobre a função fagocitária de neutrófilos de ratos. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Caracas, v.36, p.662-667, 1986.

- GIET, O.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; DI STEFANO, I.; HUYGEN, S.; GREIMERS, R.; BEGUIN, Y.; GOTHOT, A. Increased binding and defective migration across fibronectin of cycling hemopoietic progenitor cells. *Blood*, Orlando, v.99, n.6, p.2023-2031, 2002.
- GIETZEN, D.W. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. *J. Nutr.*, Bethesda, v.123, p.610-625, 1993.
- GIETZEN, D.W.; MAGRUM, L.J. Molecular mechanisms in the brain involved in the anorexia of branched chain amino acid deficiency. *J. Nutr.*, Bethesda, v.131, n.3, suppl., p.851S-855S, 2001.
- GILMAN-SACHS, A. From its earliest days as the Coulter counter, the flow cytometer has evolved into a powerful clinical tool for studying the intrinsic and extrinsic properties of individual cells. *Anal. Chem.*, Columbus, v.66, n.13, 1994.
- GOLDEN, M.H.N. The development of concepts of malnutrition. *J. Nutr.*, Bethesda, v.132, p.2117-2122, 2002.
- GONZALEZ, C.; NAJERA, O.; CORTES, E.; TOLEDO, G.; LOPEZ, L.; BETANCOURT, M.; ORTIZ, R. Hydrogen peroxide-induced DNA damage and DNA repair in lymphocytes from malnourished children. *Environ. Mol. Mutagen.*, New York, v.39, n.1, p.33-42, 2002.
- GONZÁLEZ, C.; VILLASEÑOR, L.; BETANCOURT, M. Cinetic de la proliferación *in vitro* de linfocitos de niños desnutridos. *Rev. Invest. Clin.*, Mexico, v.42, p.18-22, 1990.
- GOOD, R.A.; LORENZ, E. Nutrition, immunity, aging, and cancer. *Nutr. Rev.*, Secaucus, v.46, p.62-67, 1988.

- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. *J. Biol. Chem.*, Birmingham, v.177, p.751, 1949.
- GÖTHERT, J.R.; JANE, S.M.; BEGLEY, C.G. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S 12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.100, n.31, p.992-997, 2003.
- 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 Pediatr.*, New Delhi, v.18, p.287-292, 1981.
- GREAVES, M.F.; TILLEY, I.; COLMAN, S.M. M10 CD34 Cluster Workshop Section. In: SCHLOSSMAN, S.B.L.; GILKS, W.; HARLAN, J.; KISHIMOTO, T.; MORIMOTO, C.; RITZ, J. eds. *Leukocyte typing V: white cell differentiation antigens*. Oxford: Oxford University Press, 1995. p.840. (International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens).
- GREAVES, M.F.; TITLEY, I.; COLMAN, S.M. Report on the CD34 cluster workshop. In: SCHLOSSMAN, S.B.L.; GILKS, W.; HARLAN, J.; KISHIMOTO, T.; MORIMOTO, C.; RITZ, J. eds. *Leukocyte typing. 5th V: white cell differentiation antigens*. Oxford: Oxford University Press, 1995. p.840-846. (International Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens).
- GRIMBLE, G.K.; SILK, D.B. The nitrogen source of elemental diets: an unresolved issue? *Nutr. Clin. Pract.*, Baltimore, v.5, p.227-230, 1990.

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

GUBIN, A.N.; NJOROGUE, J.M.; BOUFARD, G.G.; MILLER, J. Gene expression in proliferating human erythroid cells. *Genomics*, Orlando, v.59, p.168-177, 1999.

HALL, M.A.; CURTIS, D.J.; METCALF, D.; ELEFANTY, A.G.; SOURRIS, K.; ROBB, L.; GÖTHERT, J.R.; JANE, S.M.; BEGLEY, C.G. The critical regulator of embryonic hematopoiesis, SCL, is vital in the adult for megakaryopoiesis, erythropoiesis, and lineage choice in CFU-S 12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v. 131, p.992-997, 2003.

HARRIS, M.C.; LEVITT, J.; DOUGLAS, S.D.; GERDES, J.S.; POLIN, R.A. Effect of fibronectin on adherence of neutrophils from newborn infants. *J. Clin. Microbiol.*, Washington, v.21, p.243-246, 1985.

HARRISON, D.E.; JORDAN, C.T.; ZHONG, R.K.; ASTLE, C.M. Productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Exp. Hematol.*, New York, v.21, p.206-219, 2000.

HASEGAWA, M.; FUJIMOTO, M.C.; POE, J.; STEEBER, D.A.; LOWELL, C.A.; TEDDER, T.F. A CD19- dependent signaling pathway regulates autoimmunity in lyn-deficient mice. *J. Immunol.*, Bethesda, v.7, p.2469-2478, 2001.

HATTONI, K.; UCHIDA, K.; AKAZA, H. Proliferating cell nuclear antigen cyclin in human transitional cell carcinoma. *Br. J. Urol.*, London, v.75, p.162, 1995.

- HAYLOCK, D.N.; MAKINO, S.; DOWSE, T.L.; TRIMBOLI, S.; NIUTTA, S.; TO, L.B.; JUTTNER, C.A.; SIMMONS, P.J. Ex vivo hematopoietic progenitor cell expansion. *ImmunoMethods*, San Diego, v.5, n.3, p.217-225, 1994.
- HOFFMAN-GOETZ, L.; MCFARLANE, D.M.; BISTRAN, B.R.; BLACKBURN, G.L.; Febrile and plasma iron response of rabbits injected with endogenous pyrogen from malnourished patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.34, p.1109-1115, 1983.
- HOLYOAKE, T.L.; NICOLINI, F.E.; EAVES, C.J.; Functional differences between transplantable human hematopoietic stem cells from fetal liver, cord blood, and adult marrow. *Exp. Hematol.*, New York, v.27, p.1418-1427, 1999.
- HOWELL, W.M.; BLACK, D.A. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. *Experientia*, Basel, v.36, n.8, p.1014-1015, 1980.
- HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, Seattle, v.29, n.4, p.577-580, 1981.
- IACOPETTA, B.J.; MORGAN, E.H.; YEOH, G.C. Transferrin receptors and iron uptake during erythroid cell development. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.687, p.204-210, 1982.
- ICHIKAWA, Y.; PLUZNIK, D.H.; SCHS, L. *In vitro* control of the development of macrophage and granulocyte colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.56, p.488-495, 1966. *Biological Procedures Online*, v.4,

n.11, p.10-23, 2002. Disponível 10/09/03.
<http://www.biologicalprocedures.com/bpo/arts/1/contents.htm>.

IKUTA, K.; KINA, T.; MACNEIL, I.; UCHIDA, N.; PEAULT, B.; CHIEN, Y.-H.; WEISSMAN, I.L. A development switch in thymic lymphocyte maturation potential occurs at the level of hematopoietic stem cells. *Cell*, New York, v.62, n.2, p.863-874, 1990.

IRLES, C.; SYMONS, A.; MICHEL, F.; BAKKER, T.R.; VAN DER MERWE, P.A.; ACUTO, O. CD45 ectodomain controls interaction with GEMs and Lck activity for optimal TCR signaling. *Nat. Immunol.*, Brentwood, v.4, n.2, p.189-197, 2003.

ISAKOW, N. WANGE, R.L.; BURGESS, W.H.; WATTS, J.D.; AEBERSOLD, R.; SAMELSON, L.E. ZAP-70 binding specificity to T cell receptor tyrosine-based activation motifs: The tandem SH2 domains of ZAP-70 bind distinct tyrosine-based activation motifs with varying affinity. *J.Exp. Med.*, v.181, p.375-380, 1995.

JENNING, C.D; FOON, A. Recent advances in flow cytometry application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*, Orlando, v.90, n.8, p.2863-2892, 1997.

JIANG, Y.; ZHAO, R.C.H.; VERFAILLIE, C.M. Abnormal integrin-mediated regulation of chronic myelogenous leukemia CD34⁺ cell proliferation: *Bcr/Abl* up-regulates the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27Kip, which is relocated to the cell cytoplasm and incapable of regulating cdk2 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.97, n.12, p.10538-10543, 2000.

- KAJIWARA, K.; NISHIZAKI, T.; ORITA, T.; NAKAYAMA, H.; AOKI, H.; ITO, H. Silver colloid staining technique for analysis of glioma malignancy. *J. Neurosurg.*, Charlottesville, v.73, n.1, p.113-117, 1990.
- KAMPSCHMIDT, R.F.; UPCHURCH, H.F. Possible involvement of leukocytic endogenous mediator in granulopoiesis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Malden, v.155, p.89-93, 1977.
- KATO, K.; KOYANAGI, M.; OKADA, H.; TAKANASHI, T.; WONG, Y.W.; WILLIAMS, A.F.; OKUMURA, K.; YAGITA, H. CD48 is a counter-receptor for mouse CD2 and is involved in T cell activation. *J. Exp. Med.*, v.176, p. 1241-1249, 1992.
- KAUFFMAN, C.A.; JONES, P.G.; KLUGER, M.J. Fever and malnutrition: endogenous pyrogen/interleukin-1 in malnourished patients. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.44, p.449-452, 1986.
- KEENAN, R.A.; MOLDAWER, L.L.; YANG, R.D.; KAWAMURA, I.; BLACKBURN, G.L.; BISTRAN, B.R. An altered response by peripheral leukocytes to synthesis or release leukocytes endogenous mediator in critically protein-malnourished patients. *J. Lab. Clin. Med.*, Saint Louis, v.100, p.844-857, 1982.
- KEMP, J.D.; THORSON, J.A.; MCALMONT, T.H.; HOROWITZ, M.; COWDERY, J.S.; BALLAS, Z.K. Role of the transferrin receptor in lymphocyte growth: a rat igg monoclonal antibody against the murine transferrin receptor produces highly selective inhibition of t and b cell activation protocol. *J. Immunol.*, Bethesda, v.138, p.2422-2426, 1987.
- KEUSCH, G.T. History of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J. Nutr.*, Bethesda, v.133, p.336-340, 2003.

KEUSH, G.T.; FARTHING, M.J.G. Nutrition and infection. *Ann. Rev. Nutr.*, Palo Alto, v.6, p.131-154, 1986.

KINASHI, T.; SPRINGER, T.A. Steel factor and c kit regulate cell matrix adhesion. *Blood*, Orlando, v.83, p.1033-1038, 1989.

KISHIHARA, K.; PENNINGER, J.; WALLACE, V.A.; KUNDIG, T.M.; KAWAI, K.; WAKEHAM, A.; TIMMS, E.; PFEFFER, K.; OHASHI, P.S.; THOMAS, M.L. Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon 6 protein tyrosine phosphatase deficient mice. *Cell*, New York, v.74, n.1, p.143-156, 1993.

KLASING, G.G. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *J. Nutr.*, Bethesda, v.118, p.1436-1445, 1988.

KLEIN, F.; FELDHAHN, N.; SANGGYU, L.; WANG, H.; FIAMMENTA, C.; VON EISTERMANN, M.; TORIBIO, M.L.; SAUER, H.; WARTENBERG, M.; BARATH, V.S.; KRÖNKE, M.; WERNET, P.; ROWLY, J.D.; MÜSCHEN, M. Lymphoid differentiation in human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.100, n.11, p.6747-6752, 2003.

KORNBERG, A.; DAFT, F.S.; SEBRELL, W.H. Granulocutopenia and amnemia in rats fed diets of low casein content. *Science*, Washington, v.103, p.646-648, 1946.

KOURY, M.J. Programmed cell death (apoptosis) in hematopoiesis. *Exp. Hematol.*, New York, v.20, p.391-394, 1992.

KOURY, M.J.; BONDURANT, M.C. Erythropoietin retards DNA breakdown and prevents programmed cell death death in eryhroid progenitor cells. *Science*, Washington, v.248, p.378-381, 1990.

- KOZOPAG, K.M.; YANG, T.; BUCHAN, H.L.; ZHOU, P.; CRAIG, R.W. MCL-1, a gene expressed in programmed myeloid cell differentiation, has sequence similarity to BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, v.90, n.8, p.3516-3520, 1993.
- KRONENWETT, R.; MARTIN, S.; HASS, R. The role of cytokines and adhesion molecules for mobilization of peripheral blood stem cells. *Stem Cells*, Dayton, v.18, p.320-330, 2000.
- KUTI, S.; WESSELS, J.T.; BÜRNING, H.J.; SCHILBACH, K.; SCHUMM, M.; SELTZ, G.; LÖFFLER, J.; BADER, P.; SCHIEGEL, P.G.; NIETHAMMER, D.; HANDGRETINGER, R. Identification of a novel class of human adherent CD34⁺ stem cells that give rise to SCID - repopulating cells. *Blood*, Orlando, v.101-103, p.869-876, 2003.
- LAJOLO, F.M.; ZUCAS, S.M.; DOMINGUES, J.B. Estudo bromatológico de concentrados protéicos obtidos a partir de *Sardinella murita* e *Tilapia melanopleura*. *Arch. Latinoam. Nutr.*, Caracas, v.25, p.67-77, 1975.
- LAMUS, E.R. Desnutriton e infecciones: importancia en la salud publica. *Arch. Venez. Pueric. Pediatr.*, Caracas, v.41, p.75-93, 1975.
- LANZA, F.; HEALY, L.; SUTHERLAND, D.R. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. *J. Biol. Regul. Homeostatic Agents*, Milano, v.1, p.11, 2001.
- LANZA, F.; MORETTI, S.; CASTAGNARI, B. CD34⁺ leukemic cells assessed by diferent CD34 monoclonal antibodies. *Leuk. Lymphoma*, Jersey, v.18, p.25-30, 1995.

- LEDBETTER, J.A.; HERZENBERG, L.A. Xenogeneic monoclonal antibodies to mouse lymphoid differentiation antigens. *Immunol. Rev.*, Copenhagen, v.47, p.63-90, 1979.
- LEE, G.R.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. *Wintrobe's clinical hematology*. 9.ed. London: Lea & Febiger, 1996. p.1564-1588.
- LEMISCHKA, I. Stem cell dogmas in the genomics era. *Rev. Clin. Exp. Hematol.*, Oxford, v.5, p.15-25, 2001.
- LESOURD, B.M. Nutrition and immunity in the elderly: modification of immune responses with nutritional treatments. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.66, n.2, p.478-484, 1997.
- LÉVESQUE, J.P.; LEAVESLEY, D.I.; NIUTTA, S.; NIUTTA, S.; VADAS, M.; SIMMONS, P.J. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *J. Exp. Med.*, v.181, p.1805, 1995.
- LIAO, H.X.; MONTEFIORI, D.C.; PATEL, D.D.; LEE, D.M.; SCOTT, W.K.; PERICAK, V.; HAYNES, B.F. Linkage of the CCR5832 mutation with a functional polymorphism of CD45-RA. *J. Immunol.*, Bethesda, v.165, p.148, 2001.
- LIU, Y.J.; MASON, D.Y.; JOHNSON, G.D.; ABBOT, S.; GREGORY, C.D.; HARDIE, D.L.; GORDON, J.; MACLENNAN, J.C. Germinal center cells express bcl-2 protein after activation by signals which prevent their entry into apoptosis. *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v.21, p.1905-1910, 1991.
- LÖFFLER, A.; KUFER, P.; ZEFTTL, F.; DANIEL, P.T.; SCHWENKENBECHER, J.M.; RIETHMÜLLER, G.; DÖRKEN, B.;

- BARGOU, C.A. Recombinant bispecific single-chain antibody, CD19 x CD3, induces rapid and high lymphoma-directed cytotoxicity by unstimulated T lymphocytes. *Blood*, Orlando, v.95/96, p.2098-2103, 2000.
- LOKEN, M.R.; SHAH, V.O.; DATTILIO, K.L.; CIVIN, C.I. Flow cytometric analysis of human bone marrow. Normal erythroid development. *Blood*, Orlando, v.69, p.255-263, 1987.
- LOKEN, M.R.; SHAH, V.O.; DATTILIO, K.L.; CIVIN, C.I. Flow cytometric analysis of human bone marrow. I. Normal erythroid development. *Blood*, Orlando, v.69, p.255-263, 1987.
- LOMNITZER, R.; ROSEN, E.U.; GEEFHUYSEN, J.; RABSON, A.R. Defective leukocyte inhibitory factor (LIF) production by lymphocytes in children with kwashiorkor. *S. Afr. Med. J.*, v.50, p.1820, 1976. *apud* CHANDRA, R.J., ed. *Nutrition and immunology*. New York: Alan R. Liss, 1988. 342p. (Contemporary issues in clinical nutrition, v.11).
- LÓPES, M.C.; ROUX, M.E. Impaired differentiation of IgA B cell precursors in the Peyer's patches of protein depleted rats. *Dev. Comp. Immunol.*, v.13, p.253-262, 1989.
- LORD, B.I.; TESTA, N.G. The hemopoietic system; structure and regulation. In: TESTA, N.G.; GALE, R.P. *Haematopoiesis: long-term effects of chemotherapy and radiation*. New York: Marcel Dekker, 1989. p.1.
- LORENZI, T.F. *Manual de hematologia: propedêutica e clínica*. 3.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2003. p. 84-142.
- LORENZI, T.F.; JAMRA, M. Hemopatias malignas: da morfologia à biologia molecular. *SBHH*, v.2, n.3, p.6-17, 1997.

- LUNN, P.G.; NORTHROP-CLEWES, C.A. The impact of gastrointestinal parasites on protein-energy malnutrition in man. *Proc. Nutr. Soc.*, Wallingford, v.52, n.1, p.101-111, 1993.
- LYRA, J.S.; MADI, K.; MAEDA, C.T.; SAVINO, W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J. Pathol.*, Bognor Regis, v.171, N.3, p.231-236, 1993.
- LYRA, J.S.; MADI, K.; MAEDA, C.T.; SAVINO, W. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J. Pathol.*, Bognor Regis, v.171, p.231-236, 1993.
- MACEY, M.G.; MCCARTHY, D.A.; VAN AGTHOVEN, A.; NEWLAND, A.C. How should CD34+ cells be analysed? A study of three classes of antibody and five leucocyte preparation procedures. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.204, p.175-188, 1997.
- MAGA, G.; HUBSCHER, U. DNA polymerase epsilon interacts with proliferating cell nuclear antigen in primer recognition and elongation. *Biochemistry*, Columbus, v.24/34, n.3, p.891-901, 1995.
- MAGA, G.; JONHSON, Z.O.; STUCKI, M.; SPADARI, S.; HUBSCHER, U. Dual mode of interaction of DNA polymerase epsilon with proliferating cell nuclear antigen in primer binding and DNA synthesis. *J. Mol. Biol.*, Sidcup, v.285, n.1, p.259-267, 1999.
- MAINADIÉ, M.; GERLAND, L.; AHO, S.; GIRODON, F.; BERNIER, M.; BRUNET, C.; CAMPOS, L.; DALPHARD, S.; DENEYS, V.; FALKENRODT, A.; JACOB, M.C.; KÜHLEIN, E.; LECALVEZ, G.; MOSCOVTCHENKO, P.; PHILIP, P.; CARLI, P.M.; FAURE, G.C.; BENÉ, M.C. Clinical value of the quantitative expression of the three epitopes of

300 cases of acute myeloid leukemia. *Haematologica*, Pavia, v.87, p.795-803, 2002.

MAJDIC, O.; STOCKCL, J.; PICKI, W.F. Signaling and induction of enhanced adhesiveness via the hematopoietic progenitor cell surface molecule CD34. *Blood*, Orlando, v.83, p.1226-1302, 1994.

MAJETI, R.; XU, Z.; PARLOW, T.G.; OLSON, J.L.; DAIKH, D.L.; KILEEN, N.; WEISS, A. An inactivating point mutation in the inhibitory wedge of CD45 causes lymphoproliferation and autoimmunity. *Cell*, New York, v.103, p.1059-1070, 2000.

MALEK, S.N.; DORDAI, D.I.; REIN, J.; DINTZIZ, H.; DESIDERIO, S. Malignant transformation of early lymphoid progenitors in mice expressing an activated Blk tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.95, p.7351-7356, 1998.

MALEK, S.N.; DORDAI, D.I.; REIN, J.; DINTZIZ, H.; DESIDERIO, S. Malignant transformation of early lymphoid progenitors in mice expressing an activated Blk tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.95, p.7351-7356, 1998.

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. *Eur. J. Clin. Nutr.*, Basingstoke, v.54, p.561-564, 2000.

MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. Os substratos das vias metabólicas: nutrição. In: _____. *Bioquímica básica*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. cap.18, p.243-253.

- MASON, D. Subsets of CD4⁺ T cells defined by their expression of different isoforms of the leukocyte-common antigen CD45. *Biochem. Soc. Trans.*, Colchester, v.20, p.188, 1992.
- MASSUMOTO, SM. Avaliação da cultura de progenitores hematopoéticos e análise de células CD34⁺ após transplante autólogo de medula óssea. São Paulo, 1998. 85p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- MASSUMOTO, SM.; MASSUMOTO, C.; ALVES, A.A. Manual prático de criopreservação. *Stem Cell Hematopoiética*, 2001.
- MATHUR, M.; RAMALINGASWAMI, V.; DEO, M.G. Influence of protein deficiency on 19S antibody-forming cells in rats and mice. *J. Nutr.*, Bethesda, v.102, p.841-846, 1972.
- MATUTES, E. Contribution for immunophenotype in the diagnosis and classification of haemopoietic malignancies. *J. Clin. Pathol.*, London, v.48, p.194-197, 1995.
- MAYANI, H.; GUILBERT, L.J.; JANOWSA-WIECZOREK, A. Biology of the hematopoietic microenvironment. *Eur. J. Haematol.*, Copenhagen, v.49, p.225-233, 1992.
- McCONKEY, D.J.; AGUILAR-SANTELISES, M.; HARTZELL, P.; ERIKSON, J.; MELLSTEDT, H.; ORRENIUS, S.; JONDAL, M. Induction of DNA fragmentation in chronic B-lymphocytic leukemia cells. *J. Immunol.*, Bethesda, v.146, n.3, p.1072-1076, 1991.
- McCONKEY, D.J.; NICOTERA, P.; HARTZELL, P.; BOLLOMA, G.; WYLLIE, A.H.; ORRENIUS, S. Glucocorticoids activate a suicide process in

- thymocytes through an elevation of cytosolic Ca^{++} concentration. *Arch. Biochem. Biophys.*, Orlando, v.269, p.365-370, 1989.
- MCDONALD, H.R.; SCHREYER, M.; HOWE, R.C.; BRON, C. Selective expression of CD-8 (Ly-2) subunit on activated thymic gamma/delta cells. *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v.20, n.4, p.927-930, 1990.
- McKENNA, S.L.; COTTER T.G. Functional aspects of apoptosis in hematopoiesis and consequences of failure. *Adv. Cancer Res.*, San Diego, v.71, p.121-164, 1997.
- McLAREM, D.S., FARIS, R.; ZEKIAN, B. The liver during recovery from protein-calorie malnutrition. *J. Trop. Med. Hyg.*, Oxford, v.71, p.174-281, 1968.
- McMURRAY, D.N. Cell-mediated immunity in nutritional deficiency. *Prog. Food Nutr. Sci.*, Oxford, v.8, p.193-228, 1984.
- MELTON, E. Alterations in the intrathymic differentiation in a model of immunodeficiency due to protein deprivation. Doctor thesis. Faculty of Pharmacy and Biochemistry. University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.1990.
- MELTON, E; ROUX, M.E. Detection of TdT positive cells in the mesenteric lymph nodes of immunodeficient rats: Study of their antigenic phenotype. *Reg. Immunol.*, v.2, p.408-413, 1989.
- METCALF, D. Hematopoietic regulators: redundancy or subtlety? *Blood*, Orlando, v.82, p.3515-3523, 1993.

- METCALF, D. *Hemopoietic colonies: In vitro cloning of normal and leukemic cells*. Berlin: Springer-Verlag, 1997. 227p. (Recent results in cancer research, 61).
- METCALF, D. The granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Science*, Washington, v.229, n.4708, p.16-22, 1985.
- METCALF, D. *The hemopoietic colony stimulating factors*. Amsterdam: Elsevier, 1984. 493p.
- METCALF, D. The hemopoietic regulators: an embarrassment of riches. *BioEssays*, New York, v.14, p.799-805, 1992.
- METCALF, D.; NICOLA, N.A. The hemopoietic colony stimulating factors: from biology to clinical applications. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 329 p.
- MITNACHT, R.; BISCHOF, A.; TORRES-NAGEL, N.H.; HUNIG, T. Opposite CD4/CD8 lineage decisions of CD4⁺8⁺ mouse and rat thymocytes to equivalent triggering signals: correlation with thymic expression of a truncated CD8 alpha chain in mice but not rats: *J. Immunol.*, Bethesda, v.160, n.2, p.700-707, 1998.
- MIYAKE, K.; WEISSMAN, I.L.; GREENBERGER, J.S.; KINCADE, P.W. Evidence for a role of the integrin VLA-4 in lympho-hemopoiesis. *J. Exp. Med.*, v.173, p.599, 1991.
- MOHANDAS, N.; PRENANT, M. Three-dimensional model of bone marrow. *Blood*, Orlando, v.50, p.633-643, 1978.
- MOLICA, S.; MANNELLA, A.; CRISPINO, G.; DATTILO, A.; LEVATO, D. Comparative flow cytometric evaluation of BCL-2 oncoprotein in

- CD5+and CD5- B-cell lymphoid choronic leukemias. *Haematologica*, Pavia, v.82, p.555-559, 1997.
- MONTEIRO, C.A.; MONDINI, L.; TORRES, A.M.; DOS REIS, I.M. Patterns of intra-familiar distribution of undernutrition: methods and applications for developing societies. *Eur. J. Clin. Nutr.*, Basingstoke, v.51, p.800-803, 1997.
- MOORE, M.A.S. Interleukin-3: na overview. In: SCHRADER, J.W. *Interleukin-3: the panspecific hemopoietin*. New York: Academic Press, p.219.
- MUENCH, M.O.; SUSKIND, D.L.; BÁRCENA, A. Isolation, growth and identification of colony-forming cells with erytroid, myeloid, dentritic cell and NK-cell potential from human fectal liver. *Biol. Proc.*, v.4, p.10-23, 2002.
- MUÑOZ, E.; MARCOS, A.; UNZAGA, M.T. Effect of protein deficiency on the lysossomal enzyme activiies of the spleen and thymus of weanling rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.111, p.2133-2141, 1981.
- MURRAY, A.W.; HUNT, T. *The cell cycle: an introduction*. New York: Oxford University Press, 1993. 251 p.
- MURRAY, A.W.; KIRSCHNER, M.W. Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature*, London, v.339, n.6222, p.275-280, 1989.
- MURTHY, P.B.; RAHUIN, M.A.; TULPULE, P.G. Lymphocyte proliferation kinetics in malnourished children measured by differential chromatid staining. *Br. J. Nutr.*, Wallingford, v.114, p.445-450, 1982.

- MUTCHINICK, O.; LISKER, R.; RUZ, L.; SALAMANCA, F.; ARMENDARES, S. Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition. *Ann. Genet.*, Paris, v.22, p.129-132, 1979.
- MYRVIK, Q.N. Immunology and nutrition. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.O.; SHIKE, M., eds. *Modern nutrition in health and disease*. 8.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1994. p.623-662.
- NAGATA, S.; GOLSTEIN, P. The faz death factor. *Science*, Washington, v.267, p.1506-1509, 1995.
- NAKAHATA, T.; OGAWA, M. Identification in culture of a class hemopoietic colony forming units extensive captably to self-renew and generate multipotential hemopoietic colonies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.79, p.3843-3847, 1982.
- NEEL, B.G. Role of phosphatases in lymphocyte activation. *Curr. Opin. Immunol.*, Haywards Heath, v.9, p.405-457, 1997.
- NEUMANN, C.G.; LAWLOR, G.J.R.; STIEHM, E.R.; SWENSEID, M.E.; NEWTON, C.; HERBERT, J.; AMMANN, A.J.; JACOB, M. Immunologic responses in malnourished children. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.28, p.89-104, 1975.
- NICOLA, N.A. *Guidebook to cytokines and their receptors*. Cytokines and their receptors. Oxford: Oxford University Press, 1994. New York. 261 p.
- NIKICICZ, E.P.; NORBACK, D.H. Argyrophilic nucleolar organiser region (AgNOR) staining in normal bone marrow cells. *J. Clin. Pathol.*, London, v.43, p.723-727, 1990.

- NISHIO, H.; TADA, J.; HASHIAYA, M.; HIRM, J.; ESTEVE, J.; SUDA, T. CD34. Workshop panel report. In: KSHIMOTO, T. eds. *Leukocyte typing VI*. Oxford: Oxford University Press, 1997. p.974-984.
- NOTI, J.D.; REINEMANN, B.C.; JOHNSON, A.K. The leukocyte integrins are regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms in a leukemic cell that overexpresses protein kinase C- ξ . *Int. J. Oncol.*, Athens, v.19, n.6, p.1311-1318, 2001.
- NOVA, E.; SAMARTÍN, S.; GÓMEZ, S.; MORANDÉ, G.; MARCOS, A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. *Eur. J. Clin. Nutr.*, Basingstoke, v.56, p.534-537, 2002.
- NUNEZ, G.; LONDON, L.; HOCKENBERY, D.; ALEXANDER, M.; MCKEAM, J.P.; KORSMEYER, S.J. Deregulated *Bcl-2* gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J. Immunol.*, Bethesda, v.144, n.9, p.3602-3610, 1990.
- O'FARRELL, P.H.; EDGAR, B.A.; LAKICH, D.; LEHNER, C.F. Directing cell division during development. *Science*, Washington, v.246, n.4930, p.635-640, 1989.
- OGAWA, M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, Orlando, v.84, p.2844-2853, 1993.
- OGAWA, M.; MATSUZAKI, Y.; NISHIKAWA, S.; HAYASHI, S.-I.; KUNISADA, T.; SUDO, T.; KINA, T.; NAKAUCHI, H.; NISHIKAWA, S.-I. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J. Exp. Med.*, v.174, p.63-71, 1991.

- OHNO, H. Effects of testosterone on cell proliferation and apoptosis in BBN-induced mouse urinary bladder carcinogenesis. *Yonago Acta Med.*, Tottori-ken, v.43, p.121-130, 2000.
- OLMOS, S.; REINOSO, M.F.; MARQUEZ, M.G.; ROUX, M.E. Cytogenetic studies in bone marrow cells from Wistar rats in protein malnutrition. *Metabolism*, Bethesda, v.50, p.1025-1029, 2001.
- OLTVAI, Z.N.; MILLIMAN, C.L.; KORSMEYER, S.J. *Bcl-2* heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, New York, v.74, p.609-619, 1993.
- OLWEUS, J.; LUND-JOHANSEN, F.; TERSTAPPEN, L.W. Expression of cell surface markers during differentiation of CD34⁺, CD38^{lo} fetal and adult bone marrow cells. *ImmunoMethods*, San Diego, v.5, n.3, p.179-188, 1994.
- OPAS, M. Substratum mechanics and cell differentiation. *Int. Rev. Cytol.*, San Diego, v.150, p.119-137, 1994.
- ORKI, S.H.; ZON, L.I. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat. Immunol.*, Brentwood, v.3, p.323-328, 2002.
- ORTIZ, R.; BETANCOURT, M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *J. Nutr.*, Bethesda, v.114, p.472-476, 1984.
- ORTIZ, R.; BETANCOURT, M. Length of cell cycle *in vitro* and sister chromatid exchanges (SCE) frequency in bone marrow cells from severely malnourished rats. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.232, p.71-75, 1990.

- PARDEE, A.B. G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science*, Washington, v.246, p.603-608, 1989.
- PEDERSEN, B.K.; BRUUNSGAARD H. Nutrition, age and immunity in exercise. In: PEDERSEN, B.K., ed. *Exercise immunology*. New York: Landes, 1997. p.150-169.
- PELOSI, G.; BRESAOLA, E.; MANFRIN, E.; RODELLA, S.; SCHIAVON, I.; IANNUCCI, A. Immunocytochemical detection of cell proliferation-related antigens in cytologic smears of human malignant neoplasms using PC10, reactive with proliferating cell nuclear antigen, and Ki-67: a comparative study. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, Northfield, v.118, n.5, p.510-516, 1994.
- PEREIRA, J. *Estudo de células precursoras em leucemias agudas: identificação e fator prognóstico das proteínas Bcl-2, Bax e CD95/Fas/APO-1*. São Paulo, 2000. 227p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.
- PERRETA, M.; GARRIDO, F.; OLIVA, P. Hepatic RNA polymerase activity in protein caloric malnutrition (PCM) in rats and the effect of of refeeding. *IRCS Med. Sci.*, Lancaster, v.9, p.456, 1981.
- PERRETA, M.; GARRIDO, F.; OLIVA, P. Hepatic RNA polymerase activity in protein caloric malnutrition (PCM) in rats and the effect of of refeeding. *IRCS Med. Sci.*, Lancaster, v.9, p.456, 1981.
- PERRY, S.S.; PIERCE, L.J.; SLAYTON, W.B.; SPANGRUDE, G.J. Characterization of thymic progenitors in adult mouse bone marrow. *J. Immunol.*, Bethesda, v.170, n.4, p.1877-1886, 2003.

- PETERS, W.P.; HOLLAND, J.F.; SENN, H.; RHOMBERG, W.; BENERJEE, T. Corticosteroid administration and localized leukocyte, mobilization in man. *N. Engl. J. Med.*, Waltham, v.282, p.342-345, 1972.
- PINES, J. Cyclins: wheels within heels. *Cell Growth Differ.*, Birmingham, v.2, p.305-310, 1991.
- PLOTON, D.; MENAGER, M.; JEANNESSON, P.; HIMBER, G.; PIGEON, F.; ADNET, J.-J. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic nucleoprotein of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem. J.*, Dordrecht, v.18, n.1, p.5-14, 1986.
- POWANDA, M.C.; BEISEL, W.R. Metabolic effects of infection on protein and energy status. *J. Nutr.*, Bethesda, v.133, p.3225-3275, 2003.
- QUESENBERRY, P.J. Hemopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: BEUTLER, E.; LICHTMAN, M.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J., eds. *Williams hematology*. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1995. cap.22, p.211-228.
- RAMDATH, D.D.; GOLDEN, M.H.N. Non-hematological aspects of iron nutrition. *Nutr. Res. Rev.*, Wallingford, v.2, p.29-50, 1989.
- RANE, S.G.; REDDY, E.P.; JAKs STATs and Src kinases in hematopoiesis. *Oncogene*, Basingstoke, v.21, p.3295-3358, 2002.
- REDMOND, H.P.; SHOU, J.; KELLY, C.J.; SREIBER, S.; MILLER, E.; LEON, P.; DALY, J.M. Immunossuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition. *Surgery*, Saint Louis, v.110, n.2, p.311-317, 1991.

- REDMOND, H.P.; SHOU, J.; KELLY, J.; LEON, P.; DALY, J.M. Protein-calorie malnutrition impairs host defense against *Candida albicans*. *J. Surg. Res.*, Orlando, v.50, p.552-559, 1991.
- REDMOND, H.P.; SHOU, J.; KELLY, J.; LEON, P.; DALY, J.M. Protein-calorie malnutrition impairs host defense against *Candida albicans*. *J. Surg. Res.*, v.50, p.552-559, 1991.
- REDMOND, H.P.E.; LIEBERMAN, M.D.; HOFFMAN, K.; SHOU, J.; REYNOLDS, J.V.; GOLDFINE, J.; JOHNSTON, R.B.P.; DALY, J.M. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. *Arch. Surg.*, Chicago, v.126, p.192-196, 1991.
- 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-76a Rodent Diet. *J. Nutr.*, Bethesda, v.123, n.11, p.1939-1951, 1993.
- REIF, S.; LU, R.B.; TANO, M.; TERRANOVA, V.; YOUNG, C.; FISHER, J.; PETELL, J.; LEBENTHAL, E. Perinatal food restriction in rats reduces the content but not concentration of liver extracellular matrix proteins. *J. Nutr.*, Bethesda, v.123, p.811-816, 1993.
- RIOS, M.; WILLIAMS, D.A. Systematic analysis of the ability of stromal cell lines derived from different murine adult tissues to support maintenance of hematopoietic stem cells *in vitro*. *J. Cell. Physiol.*, New York, v.145, p.434-443, 1990.
- RODKEY, F.L. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. *Clin. Chem.*, Baltimore, v.1, p.478, 1965.

- RODRIGUEZ-TARDUCHY, G.; COLLINS, M.; LOPEZ-RIVAS, A. Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO J.*, Oxford, v.9, p.2997-3002, 1990.
- ROSE, P.M.; HOPPER, A.F.; WANNEMACHER Jr., R.W. Cell population changes in the intestinal mucosa of protein depleted or starved rats. I. Changes in mitotic cycle time. *J. Cell Biol.*, New York, v.50, p.887-892, 1971.
- ROSEN, E.; BUCHANAN, N.; HANSEN, J.D.L. Evolution of kwashiorkor and marasmus. *Lancet*, London, v.2, n.7878, p.458, 1974. [Letter].
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan*, São Paulo, v.20, p.315-328, 1947.
- ROTHERLAND, G.; SCHMITZ, G.; ADORT, D.; BARLAGE, S.; GRAMATZKI, M.; HANENBERG, H.; HONKES, H.G.; JANOSSV, G.; KNUCHEL, R.; LUDWIG, W.D.; NBE, T.; NERL, C.; ORFAO, A.; SERKE, S.; SONNEN, R.; TICJELLI, A.; WÖRMANN, B. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematopoietic malignancies. *Leukemia*, Basingstoke, v.10, p.877-895, 1996.
- ROUSSEL, P.; BELENGER, P.; AMALRIC, T.; HERNANDEZ-VERDUM, D. Nucleolin is an AgNOR protein; this property is determined by its amino-terminal domain independently of its phosphorylation state. *Exp. Cell Res.*, Orlando, v.203, p.259-269, 1992.
- ROUX, M.E; LÓPES, M.C. Impairment of IgA expression and cell mediated immunity observed on Peyer's patches of protein depleted rats at weaning and then fed on 20% casein. In: MESTECKY, J.; MCGHEE, J.R.;

- BIENENSTOCK, J., *et al.*(eds). *Recent Advances in Mucosal Immunology, Part A. Plenum, 1987, p.847-855.*
- ROZENGURT, E. Early signals in the mitogenic response. *Science*, Washington, v.234, n.4773, p.161-166, 1986.
- RUDIN, C.E.; GARLAND, J.M.; JOYNER, M.V. Concordant expression of class II and class III CD34 epitopes on haemopoietic cells in leukapheris and cord blood samples with CD45/CD34 dual staining. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v.97, p.488-491, 1997.
- RUIZ-ARGUELLES, A. Flow cytometry in the clinical laboratory: principles, applications and problems. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v.211, p.13-27, 1992.
- SALIMONU, L.S.; OJO-AMAIZE, E.; WILLIAMS, A.M.O.; JOHNSON, A.O.K.; COOKE, A.R.; ADEKUNLE, F.A.; ALM, G.V.; WIGZELL, H. Depressed Natural Killer cell activity in children with protein-calorie malnutrition. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, New York, v.24, p.1-7, 1983.
- SATO, S.; JANSEN, P.; TEDDLER, T.F. CD19 and CD22 expression reciprocally regulates tyrosine phosphorylation of Vav protein during B Lymphocyte signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.94, p.13158-13162, 1997.
- SAWADA, K.; KRANTZ, S.B.; DAI, C.H.; KOURY, S.T.; HORN, S.T.; GLICK, A.D.; CIVIN, C.I. Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J. Cell. Physiol.*, New York, v.142, p.219-230, 1990.

- SAXENA, Q.B.; SAXENA, R.K.; ADLER, R.H. Effect of protein-calorie malnutrition on the levels of natural and inducible cytotoxic activities in mouse spleen cells. *Immunology*, Oxford, v.51, p.727-733, 1984.
- SCHAFER, K.A. The cell cycle: a review. *Vet. Pathol.*, Lawrence, v.35, p.461-478, 1998.
- SCRIMSHAW, N.S. Historical concepts of interactions, synergism and antagonism between nutrition and infection. *J. Nutr.*, Bethesda, v.133, p.3165-3215, 2003.
- SEAMAN, J.P.; KJELDSGERG, C.R.; LINKER, A. Gelatinous transformation of the bone marrows. *Hum. Pathol.*, Orlando, v.9, n.6, p.685-692, 1978.
- SEIFTER, E.; RETTURA, G.; REISSMAN, D.; KAMBOSOS, D.; LEVENSON, S.M. Nutritional response to feeding L-phenyllactic, shikimic and D-quinic acids in weanling rats. *J. Nutr.*, Bethesda, v.101, p.747-754, 1971.
- SELLINS, K.S.; COHEN, J.J. Gene induction by γ -irradiation leads to DNA fragmentation in lymphocytes. *J. Immunol.*, Bethesda, v.139, p.3199-3206, 1987.
- SERKE, S.; HUHN, D. Expression of class I, II, and III epitopes of the CD34 antigen by normal and leukemic hematopoietic cells. *Cytometry*, New York, v.26, p.154-160, 1996.
- SHINGAL, V.; MATHUR, M.; SOOD, S.K. Erythropoiesis in protein deficiency: a ferrokinetic study in male albino rats. *Ind. J. Exp. Biol.*, v.19, n.6, p. 577-579, 1981.
- SIENA, S.; BREGNI, M.; BRANDO, B.; BELLI, N.; LANSDORP, P.M.; BONADONNA, G.; GIANNI, M. Flow cytometry to estimate circulating

- hematopoietic progenitors for autologous transplantation: comparative analysis of different CD34 monoclonal antibodies. *Haematologica*, Pavia, v.76, n.4, p.330-333, 1991.
- SILVA, M.; GRILLO, T.D.; BENITO, A.; RICHARD, C.; NUNEZ, G.; FERNANDEZ-LUNA, J.L. Erythropoietin can promote erythroid progenitor survival by repressing apoptosis through bcl-xl and bcl2. *Blood*, Orlando, v.88, p.1576-1582, 1996.
- SMETANA, K. Are nucleoli participating in programmed cell death? *J. Appl. Biomed.*, České Budejovice, v.1, n.2, p.93-97, 2003. Disponível em 15/07/2003: http://www.zsf.jcu.cz/jab/1_2/contentjab1_2.htm.
- SMITH, C.M.D. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control*, Tampa, v.10, n.1, p.9-16, 2003.
- SMITH, R.; JAMES, W.P.T. Nutrição: base bioquímica. In: WEATHERALL, D.J.; LEDINGHAM, J.G.G.; WARRELL, D.A. *Oxford tratado de medicina interna*. 2.ed. São Paulo: Roca, 1992. v.2, p.83-86.
- SOEDE-BOBOK, A.A., TOUW, I.P. Molecular understanding of hematopoietin/cytokine receptor signaling defects in hematopoietic disorders. *J. Mol. Med.*, Shannon, v.75, n.7, p.470-477, 1997.
- SOUZA, I.P. *Desnutrição proteica: efeito sobre a ativação, espalhamento, fagocitose, e atividade fungicida de macrófagos peritoniais de camundongos*. São Paulo, 1995. 86p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- SOUZA, I.P.; KANG, H.C.; NARDELLI, L.; BORELLI, P. Desnutrição protéica: efeitos sobre a fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoniais. *Bras. J. Pharm. Sci.*, São Paulo, v.37, n.2, p.143-151, 2001.

- SOVALAT, H.; RACADOT, E.P.H.; FUCHS, P.; LEWANDOVSKY, H.; BILLOT, M. Comparative analysis of class I, II and III epitope detection CD34 monoclonal antibodies by quantitative flow cytometry. *Hematol. Cell Ther.*, Berlin, v.30, p.23-30, 1998.
- SPIVAK, J.L.; FERRIS, D.K.; FISCHER, J.; NOGA, S.J.; ISAACS, M.; CONNOR, E.; HANKINS, W.D. Cell cycle-specific behavior of erythropoietin. *Exp. Hematol.*, New York, v.24, p.141-150, 1996.
- SPIVAK, J.L.; FISCHER, J.; ISAACS, M.A.; HANKINS, D. Protein kinases and phosphates are involved in erythropoietin mediated signal transduction. *Exp. Hematol.*, New York, v.20, p.500-504, 1992.
- SPIVAK, J.L.; HOGANS, B.B. The *in vivo* metabolism of recombinant human erythropoietin in the rat. *Blood*, Orlando, v.73, p.90-99, 1989.
- STEEN, R.; TIJONNFJORD, G.; GAUDERNAK, G.; BRINCH, L.; EGELAND, T. Differences in the distribution of CD34 epitopes on normal hematopoietic progenitor cells and leukaemic blast cells. *Br. J. Haematol.*, Oxford, v.94, p.597-605, 1996.
- STINNETT, J.D. *Nutrition and the immune response*. Boca Raton: CRC Press, 1983. 150p.
- SUDA, A.K.; MATHUR, M.; DEO, K.; DEO, M.G. Kinetics of mobilization of neutrophils and their marrow pool in protein-calorie deficiency. *Blood*, Orlando, v.48, p.865-875, 1976.
- SUSKIND, R.; SIRISHINHA, S.; VITHAYASAI, V.; EDELMAN, R.; DAMRONGSAK, D.; CHARUPATANA, C.; OLSON, R.E. Immunoglobulins and antibody response in children with protein-calorie malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.29, p.836-841, 1976.

- SUTERLAND, D.R.; EAVES, A.C.; EAVES, C.J. Quantitative assay for human hematopoietic progenitor cells. In: GEE, A.P., ed. *Bone marrow processing and purging: a practical guide*. Boca Raton: CRP Press, 1991. p.155-171.
- TAKIZAWA, F.; KINET, J.; ADAMCZEWSKI, M. Binding of phycoerythrin and its conjugates to murine low affinity receptors for immunoglobulin g. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.162, p.269-272, 1993.
- TAVASSOLI, M. et al. Gelatinous transformation of bone marrow in prolonged sel-induced starvation. *Scand. J. Haematol.*, Copenhagen, v.16, p.311-319, 1976.
- TAVASSOLI, M.; MINGUELL, J.J. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, Malden, v.196, n.4, p.367-373, 1991.
- TCHILIAN, E.Z.; WALLACE, D.L.; WELLS, R.S.; FLOWER, D.R.; MORGAN, G.; BEVERLEY, P.C.L. A deletion in the gene encoding the CD45 antigen in a patient with SCID. *J. Immunol.*, Bethesda, v.166, n.2, p.1308-1313, 2001.
- TEIXIDÓ, J.; HEMLER, M.E.; GREENBERGER, J.S.; ANKLESSARIA, P. Role of β_1 and β_2 integrins in the adhesion of human CD34^{hi} cells to bone marrow stroma. *J. Clin. Invest.*, v.90, p.358, 1993.
- TESTA, N.G. *The regulation of cell lineages in haemopoiesis*. In: *Haematology and Transfusion*, 1991.

- TICE, R.R.; IVETT, J.L. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In: IRONS, R.D., ed. *Toxicology of the blood and bone marrow*. New York: Raven Press, 1985. p.119-140. (Target organ toxicology series).
- TILL, J.E.; McCULLOCH, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.*, Charlottesville, v.14, p.213, 1961.
- TILL, J.E.; McCULLOCK, E.A. Direct measurement of radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.*, Charlottesville, v.14, n.2, p.213-222, 1961.
- TITLEY, I.; HEALY, L.E.; SCOTT, M.; AMOS, T.A.; GORDON, M.Y. Extent of variability inherent in measurements of CD34 positive cells in different human hemopoietic tissues. *Bone Marrow Transplant.*, Basingstoke, v.16, p.611-616, 1995.
- TOMKINS, A. Malnutrition, morbidity and mortality in children and their mothers. *Proc. Nutr. Soc.*, Wallingford, v.59, p.135-146, 2000.
- TORUN, B.; CHEW, F. Protein-energy malnutrition. In: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C., eds. *Modern nutrition in health and disease*. 9.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. p.963-988.
- TRENTIN, J.J. Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v.65, p.621-628, 1971.
- TRENTIN, J.J. Hemopoietic microenvironments. *Transplant. Proc.*, New York, v.10, p.77-82, 1978.

- TSITSIKOV, E.; GUTIERRES-ARAMOS, J.C.; GEHA, R.I.F. Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Washington, v.94, p.10844-10849, 1997.
- TSURIMOTO, T. PCNA binding proteins. *Front. Biosci.*, Tampa, v.4, p.D849-D858, 1999.
- TUNG, J.W.; KUNNAVATANA, S.S.; HERZENBER, L.A.; HERZENBERG, L.A. The regulation of CD5 expression in murine T cells. *BMC Mol. Biol.*, London, v.2, n.5, p.141-2199, 2001.
- TUSHINSKI, R.J.; OLIVER, I.T.; GUILBERT, L.J.; TYNAN, P.W.; WARNER, J.R.; STANLEY, E.R. Survival of mononuclear phagocytes depends on a lineage-specific growth factor that the differentiated cells selectively destroy. *Cell*, New York, v.28, n.1, p.71-81, 1982.
- VAISMAN, N.; HAHN, T. Tumor necrosis factor alpha and anorexia-cause or effect? *Metabolism*, Bethesda, v.40, p.720-723, 1991.
- VICTORIA, J.W.; HERNANDEZ, V.Q. Efecto del estado nutricional de los pacientes sometidos a cirugía electiva. *Rev. Gastroenterol. Mex.*, Mexico, v.55, p.207-210, 1992.
- VILTER, R.W. The anaemia in protein-calorie malnutrition. In: OLSON, R.E., ed. *Protein-calorie malnutrition*. New York, London: Academic Press, 1975. p.257-261.
- VITURI, C.L. *Efeito da desnutrição protéica sobre a matriz extracelular da medula óssea de camundongos*. São Paulo, 2001. 131p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

- VITURI, C.L.; BORELLI, P.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A.Z. Alterations of the bone marrow in extracellular matrix in undernourished mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v.33, p.889-895, 2000.
- WAGNER, R.; MORGAN, G.; STROBEL, S. A prospective study of CD45 isoform expression in haemophagocytic lymphohistiocytosis: an abnormal inherited immunophenotype in one family. *Clin. Exp. Immunol.*, Oxford, v.99, n.2, p.216-220, 1995.
- WAITZBERG, D.L.; PLOPPER, C.; TERRA, R.M. Postoperative total parenteral nutrition. *World J. Surg.*, Secaucus, v.23, p.560-564, 1999.
- WALKER, I.D.; MURRAY, B.J.; HOGARTH, P.M.; KELSO, A.; MCKENZIE: Comparison of thymic and peripheral T cell Ly-2/3 antigens. *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v.14, n.10, p.906-910, 1984.
- WARBRICK, E. The puzzle of PCNA's many partners. *BioEssays*, New York, v.22, n.11, p.997-1006, 2000.
- WARBRICK, E.; HEATHERINGTON, W.; LANE, D.P.; GLOVER, D.M. PCNA binding proteins in *Drosophila melanogaster*: the analysis of a conserved PCNA binding domain. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v.26, n.17, p.3925-3932, 1998.
- WATANABLE, S.; ARAI, K. Roles of the JAK-STAT system in signal transduction via cytokine receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, London, v.6, n.5, p.587-596, 1996.
- WATERLOW, J.C. *Malnutrición proteico-energetica*. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1996. 501p. (Publicação científica, n.555).

- WATERLOW, J.C.; ALLYENE, G.A.O. Protein malnutrition in children: advances in knowledge in last ten years. *Adv. Protein Chem.*, San Diego, v.25, p.117-241, 1971.
- WATSON, J.V.; CHAMBERS, S.H.; SMITH, P.J. A pragmatic approach to the analysis of DNA histograms with a definable G1 peak. *Cytometry*, New York, v.8, p.1-8, 1987.
- WEINSTEIN, R.; RIORDAN, M.A.; WENC, K.; KRECZKO, S.; ZHOU, M. DAINIAK, N. Dual role of fibronectin in hematopoietic differentiation. *Blood*, v.73, p.111, 1988.
- WEISSMANN, I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, New York, v.100, p.157-168, 2000.
- WHARTON, B. Protein energy malnutrition: problems and priorities. *Acta Paediatr. Scand.*, Oslo, v.374, suppl., p.5-14, 1991.
- WHETTON, A.D.; GRAHAM, G.J. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Cell Biol.*, New York, v.9, p.233-238, 1999.
- WILLIAMS, C.; OXON, B.M.; LOND, H. Kwashiorkor: a nutritional disease of children associated with a maize diet. *Lancet*, London, v.16, p.1151-1152, 1935.
- WILLIAMS, D.A.; RIOS, M.; STEPHENS, C.; PATEL, V.P. Fibronectin and VLA-4 in haemopoietic stem cell-microenvironment. *Nature*, v.352, p.438, 1991.

- WILLIAMS, G.T.; SMITH, C.A.; SPOONCER, E.; DEXTER, T.M.; TAYLOR, D.R. Hematopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature*, London, v.343, n.6253, p.76-79, 1990.
- WILLIAMS, L.T.; ESCOBEDO, J.A.; FANTL, W.J.; TURCK, C.W.; KLIPPEL, A. Interactions of growth factors receptors with cytoplasmatic signaling molecules. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, Woodbury, v.56, p.243-250, 1991.
- WORK, T.H.; IFEKWUNI, A.; JELLIFFE, D.B.; JELLIFFE, P.; NEUMANN, C.G. Tropical problems in nutrition. *Ann. Inter. Med.*, Philadelphia, v.79, n.5, p.701-711, 1973.
- WORK, T.H.; IFEKWUNIGWE, A.; JELLIFFE, D.B.; JELLIFFE, P.; NEUMAN, C.G. Tropical problems in nutrition. *Ann. Intern. Med.*, Philadelphia, v.79, p.707-711, 1973.
- WYLLIE, A.H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, London, v.284, p.555-556, 1980.
- XAVIER, J.G. Repercussões estruturais da desnutrição protéica e renutrição em tecidos linfo-hematopoéticos de camundongos. São Paulo, 1999. 254p. Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo.
- XAVIER, J.G.; BORELLI, P.; EL-CHEIKH, M.C.; BOROJEVIC, R. Nutritional protein deficiency: lymphocyte depletion, fibrosis and myofibroblast activation in spleen. *Int. J. Exp. Pathol.*, Oxford, 1998.
- XAVIER, J.G.; VITURI, C.; FÁVERO, M.E.; ALVAREZ-SILVA, M.; FOCK, R.; ARANA-CHAVEZ, V.; BORELLI, P. Desnutrição protéica: alterações no

microambiente indutor da hemopoese. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, Santos, v.25, supl.2, p.31, res.097, 2003. Congresso da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 26, Congresso Nacional do Colégio Brasileiro de Hematologia, 19, São Paulo, 2003).

YANG, E.; ZHA, J.P.; JOCKEL, J.; BOISE, L.H.; THOMPSON, C.B.; KORSMEYER, S.J. Bad, a heterodimeric partner for bcl-x(l) and bcl-2, displaces bax and promotes cell-death. *Cell*, New York, v.80, n.2, p.285-291, 1995.

ZHOU, Y.K.; LEVESQUE, J.P.; HATZFELD, A.; CARDOSO, A.A.; LI, M.L.; SANSILVESTRI, P.; HATZFELD, J. Fibrinogen potentiates the effect of interleukin-3 on early human hematopoietic progenitors. *Blood*, v.82, p.800, 1993.

ZILCH, C.F.; WALKER, A.M.; TIMON, M.; GOLF, L.K.; WALLACE, D.L.; BEVERLY, P.C.L. A point mutation within CD45 exon: at is the cause of variant CD45RA splicing in humans. *Eur. J. Immunol.*, Weinheim, v.28, p.22, 1998.

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

ANEXO I

➤ **Meio de Cultura de Células Hematopoéticas**

♦ **Meio Fisher** (GIBCO-LIFE TECHNOLOGIES®,USA) utilizado para os ensaios de cultura líquida, SENDO suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab®, Brasil) e 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma Chemical Company, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma® Chemical Company, EUA). O pH foi ajustado a 7,4 sendo o meio a seguir filtrado em membrana Millipore® (Millipore, USA), (poro de 0,22 µm de diâmetro, previamente esterilizada). Em ambiente de fluxo laminar o meio foi acondicionado em frascos de vidro estéreis e, após prova de esterilização, armazenados a 4°C.

➤ **Meio semi-sólido de Metilcelulose:**

Constituintes :

- ❖ **Soro albumina bovina** (Boehringer Mannheim, USA) 10g% em meio de Iscove 1x (Sigma® Chemical Company, EUA). Filtrar em membrana Millipore® (Millipore, USA), com poro de 0,22 µm de diâmetro, previamente esterilizada.
- ❖ **Metilprednisolona** com concentração final de 496,35 g/mol (Solu-Medrol: Metilprednisolona, succinato sódico – 125 mg - Pharmacia & Upjohn)
- ❖ **2-mercaptoetanol** com concentração final de 14,2 mol/L.
- ❖ **Meio Iscove** (IMDM GIBCO-LIFE TECHNOLOGIES®,USA),

➤ **Método citoquímico pelo AgNOR**

Reagentes:

Fixador Carnoy.

Álcool etílico absoluto	p.a.	600 mL
Clorofórmio	p.a.	300 mL

Ácido acético	p.a.	100 mL
Solução 1.		Solução 2: (preparada no dia do uso)
3,0 mL de água deionizada		5,0 mL de água deionizada
0,1 g de gelatina		1,5 g de AgNO ₃
0,05 mL de ácido fórmico		

Solução de Trabalho:

No momento do uso preparar a solução de trabalho da seguinte maneira:

Solução 1 + Solução 2 - proporção de 1: 2 (v/v)

❖ Procedimento

1. as lâminas, previamente fixadas, devem ser recobertas ou imersas na solução de trabalho e mantidas em câmara escura (ao abrigo da luz), na temperatura ambiente (22-25 °C) pelo período de 25 minutos;
2. a seguir, retirar as lâminas e lavá-las, cuidadosamente, com água deionizada e, posteriormente, colocá-las, sob imersão, em álcool etílico absoluto pelo período de 3 minutos;
3. contracorar com verde de malaquita, durante 10 minutos;
4. recobrir a preparação com lamínula.

A contagem de AgNORs foi realizada sob a microscopia óptica em aumento de 1000x levando-se em consideração o tipo celular e o número de marcações.

ANEXO II

ESTATÍSTICA DA CULTURA LÍQUIDA (PLAQUEADO CÉLULAS TOTAIS)

CÉLULAS TOTAIS

Descricao das variaveis e fatores do modelo

Fatores	# niveis	Niveis			
GRUPO	2	Desnut	Nutrid		
MIX	2	Cmix	Smix		
DIAS	4	1D	2D	3D	5D

Variavel dependente: CT

Numero de observacoes lidas : 64
Numero de observacoes utilizadas : 64

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : CT

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	58.12156406	58.12156406	102.3516	0.000
MIX	1	179.79457656	179.79457656	316.6167	0.000
DIAS	3	17.11561719	5.70520573	10.0468	0.000
GRUPO*MIX	1	17.39932656	17.39932656	30.6401	0.000
GRUPO*DIAS	3	2.32267969	0.77422656	1.3634	0.265
MIX*DIAS	3	53.67379219	17.89126406	31.5064	0.00
GRUPO*MIX*DIAS	3	4.00286719	1.33428906	2.3497	0.084
Residuo	48	27.25737500	0.56786198		
Total	63	359.68779844			

Media : 4.08515625
Raiz Quad. QMres. : 0.75356617
Coef. Variacao : 18.44644680

Teste "Duncan" para a variavel: "CTm"
g.l = 48 qme = 0.568 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	CTm	grupo
GRUPO = Desnut DIAS = 1D			
Cmix	4	3.810000	a
Smix	4	2.215000	b
GRUPO = Desnut DIAS = 2D			
Cmix	4	2.387500	a
Smix	4	2.247500	a
GRUPO = Desnut DIAS = 3D			
Cmix	4	4.687500	a
Smix	4	1.792500	b
GRUPO = Desnut DIAS = 5D			
Cmix	4	6.262500	a
Smix	4	1.655000	b
GRUPO = Nutrid DIAS = 1D			
Cmix	4	5.402500	a
Smix	4	3.440000	b
GRUPO = Nutrid DIAS = 2D			
Cmix	4	6.092500	a
Smix	4	3.200000	b
GRUPO = Nutrid DIAS = 3D			
Cmix	4	8.130000	a
Smix	4	2.787500	b
GRUPO = Nutrid DIAS = 5D			
Cmix	4	9.317500	a
Smix	4	1.935000	b

Teste "Duncan" para a variavel: "CTm"
g.l = 48 qme = 0.568 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao

significativamente diferentes.

GRUPO	n	CTm	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Nutrid	4	5.402500	a
Desnut	4	3.810000	b
----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----			
Nutrid	4	6.092500	a
Desnut	4	2.387500	b
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----			
Nutrid	4	8.130000	a
Desnut	4	4.687500	b
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----			
Nutrid	4	9.317500	a
Desnut	4	6.262500	b
----- MIX = Smix DIAS = 1D -----			
Nutrid	4	3.440000	a
Desnut	4	2.215000	b
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----			
Nutrid	4	3.200000	a
Desnut	4	2.247500	a
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----			
Nutrid	4	2.787500	a
Desnut	4	1.792500	a
----- MIX = Smix DIAS = 5D -----			
Nutrid	4	1.935000	a
Desnut	4	1.655000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "CTm"
 g.l = 48 qme = 0.568 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

DIAS	n	CTm	grupo
----- GRUPO = Desnut MIX = Cmix -----			
5D	4	6.262500	a
3D	4	4.687500	b
1D	4	3.810000	b
2D	4	2.387500	c
----- GRUPO = Desnut MIX = Smix -----			
2D	4	2.247500	a
1D	4	2.215000	a
3D	4	1.792500	a
5D	4	1.655000	a
----- GRUPO = Nutrid MIX = Cmix -----			
5D	4	9.317500	a
3D	4	8.130000	b
2D	4	6.092500	c
1D	4	5.402500	c
----- GRUPO = Nutrid MIX = Smix -----			
1D	4	3.440000	a
2D	4	3.200000	a
3D	4	2.787500	a
5D	4	1.935000	b

BLASTOS

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : BL

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	2.27766533	2.27766533	40.2341	0.000
MIX	1	5.12736133	5.12736133	90.5728	0.000
DIAS	3	1.19546067	0.39848689	7.0391	0.001
GRUPO*MIX	1	1.85024533	1.85024533	32.6839	0.000
GRUPO*DIAS	3	0.67986200	0.22662067	4.0032	0.016
MIX*DIAS	3	1.91512067	0.63837356	11.2766	0.000
GRUPO*MIX*DIAS	3	0.85810867	0.28603622	5.0527	0.006
Residuo	32	1.81153200	0.05661038		
Total	47	15.71535600			


```

Media      : 0.37150000
Raiz Quad. QMres. : 0.23792935
Coef. Variacao : 64.04558513

```

Teste "Duncan" para a variavel: "BLm"
 g.l = 32 qme = 0.057 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

MIX	n	BLm	grupo
----- GRUPO = Desnut DIAS = 1D -----			
Cmix	3	0.200000	a
Smix	3	0.085000	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 2D -----			
Cmix	3	0.153333	a
Smix	3	0.007333	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 3D -----			
Cmix	3	0.320000	a
Smix	3	0.000333	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 5D -----			
Cmix	3	0.463333	a
Smix	3	0.000000	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 1D -----			
Cmix	3	0.393333	a
Smix	3	0.131667	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 2D -----			
Cmix	3	0.630000	a
Smix	3	0.116667	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 3D -----			
Cmix	3	1.690000	a
Smix	3	0.016333	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 5D -----			
Cmix	3	1.736667	a
Smix	3	0.000000	b

Teste "Duncan" para a variavel: "BLm"
 g.l = 32 qme = 0.057 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

GRUPO	n	BLm	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.393333	a
Desnut	3	0.200000	a
----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.630000	a
Desnut	3	0.153333	b
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	1.690000	a
Desnut	3	0.320000	b
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	1.736667	a
Desnut	3	0.463333	b
----- MIX = Smix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.131667	a
Desnut	3	0.085000	a
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.116667	a
Desnut	3	0.007333	a
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	0.016333	a
Desnut	3	0.000333	a
----- MIX = Smix DIAS = 5D -----			
Desnut	3	0.000000	a
Nutrid	3	0.000000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "BLm"
 g.l = 32 qme = 0.057 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

DIAS	n	BLm	grupo
------	---	-----	-------

GRUPO = Desnut MIX = Cmix			
5D	3	0.463333	a
3D	3	0.320000	a
1D	3	0.200000	a
2D	3	0.153333	a
GRUPO = Desnut MIX = Smix			
1D	3	0.085000	a
2D	3	0.007333	a
3D	3	0.000333	a
5D	3	0.000000	a
GRUPO = Nutrid MIX = Cmix			
5D	3	1.736667	a
3D	3	1.690000	a
2D	3	0.630000	b
1D	3	0.393333	b
GRUPO = Nutrid MIX = Smix			
1D	3	0.131667	a
2D	3	0.116667	a
3D	3	0.016333	a
5D	3	0.000000	a

JOVENS

Descricao das variaveis e fatores do modelo

Fatores	# niveis	Niveis			
GRUPO	2	Desnut	Nutrid		
MIX	2	Cmix	Smix		
DIAS	4	1D	2D	3D	5D

Variavel dependente: JOV

Numero de observacoes lidas : 48
Numero de observacoes utilizadas : 48

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : JOV

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	4.34114581	4.34114581	69.0564	0.000
MIX	1	8.10064736	8.10064736	128.8604	0.000
DIAS	3	2.81204192	0.93734731	14.9108	0.000
GRUPO*MIX	1	2.09869488	2.09869488	33.3848	0.000
GRUPO*DIAS	3	1.05529381	0.35176460	5.5957	0.003
MIX*DIAS	3	5.40606766	1.80202255	28.6655	0.000
GRUPO*MIX*DIAS	3	2.11474407	0.70491469	11.2134	0.000
Residuo	32	2.01164016	0.06286375		
Total	47	27.94027568			

Media	:	0.54519167
Raiz Quad. QMres.	:	0.25072645
Coef. Variacao	:	45.98868065

Teste "Duncan" para a variavel: "JOVm"
g.l = 32 qme = 0.063 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	JOVm	grupo
GRUPO = Desnut DIAS = 1D			
Cmix	3	0.260000	a
Smix	3	0.080000	a
GRUPO = Desnut DIAS = 2D			
Cmix	3	0.244667	a
Smix	3	0.065667	a

----- GRUPO = Desnut DIAS = 3D -----				
Cmix	3	0.490000	a	
Smix	3	0.025000	b	
----- GRUPO = Desnut DIAS = 5D -----				
Cmix	3	0.790000	a	
Smix	3	0.000333	b	
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 1D -----				
Cmix	3	0.543333	a	
Smix	3	0.336667	a	
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 2D -----				
Cmix	3	0.730000	a	
Smix	3	0.416667	a	
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 3D -----				
Cmix	3	1.693333	a	
Smix	3	0.150000	b	
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 5D -----				
Cmix	3	2.896667	a	
Smix	3	0.000733	b	

Teste "Duncan" para a variavel: "JOVm"
g.l = 32 qme = 0.063 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	JOVm	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.543333	a
Desnut	3	0.260000	a
----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.730000	a
Desnut	3	0.244667	b
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	1.693333	a
Desnut	3	0.490000	b
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	2.896667	a
Desnut	3	0.790000	b
----- MIX = Smix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.336667	a
Desnut	3	0.080000	a
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.416667	a
Desnut	3	0.065667	a
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	0.150000	a
Desnut	3	0.025000	a
----- MIX = Smix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	0.000733	a
Desnut	3	0.000333	a

Teste "Duncan" para a variavel: "JOVm"
g.l = 32 qme = 0.063 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	JOVm	grupo
----- GRUPO = Desnut MIX = Cmix -----			
5D	3	0.790000	a
3D	3	0.490000	a b
1D	3	0.260000	b
2D	3	0.244667	b
----- GRUPO = Desnut MIX = Smix -----			
1D	3	0.080000	a
2D	3	0.065667	a
3D	3	0.025000	a
5D	3	0.000333	a
----- GRUPO = Nutrid MIX = Cmix -----			
5D	3	2.896667	a
3D	3	1.693333	b
2D	3	0.730000	c
1D	3	0.543333	c
----- GRUPO = Nutrid MIX = Smix -----			
2D	3	0.416667	a

1D	3	0.336667	a
3D	3	0.150000	a
5D	3	0.000733	a

ANEL

Descricao das variaveis e fatores do modelo

Fatores	# niveis	Niveis				
GRUPO	2	Desnut	Nutrid			
MIX	2	Cmix	Smix			
DIAS	4	1D	2D	3D	5D	

Variavel dependente: ANEL

Numero de observacoes lidas : 48
Numero de observacoes utilizadas : 48

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : ANEL

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	7.47569709	7.47569709	27.3637	0.000
MIX	1	11.20859717	11.20859717	41.0275	0.000
DIAS	3	0.43131497	0.14377166	0.5263	0.667
GRUPO*MIX	1	0.51607343	0.51607343	1.8890	0.179
GRUPO*DIAS	3	1.94190998	0.64730333	2.3694	0.089
MIX*DIAS	3	1.83147847	0.61049282	2.2346	0.103
GRUPO*MIX*DIAS	3	0.54071964	0.18023988	0.6597	0.583
Residuo	32	8.74230907	0.27319716		
Total	47	32.68809981			

Media : 0.95760208
Raiz Quad. QMres. : 0.52268266
Coef. Variacao : 54.58244763

Teste "Duncan" para a variavel: "ANELm"
g.l = 32 qme = 0.273 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	ANELm	grupo
----- GRUPO = Desnut DIAS = 1D -----			
Cmix	3	0.640000	a
Smix	3	0.416667	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 2D -----			
Cmix	3	0.573333	a
Smix	3	0.253333	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 3D -----			
Cmix	3	1.103333	a
Smix	3	0.062667	b
----- GRUPO = Desnut DIAS = 5D -----			
Cmix	3	1.453333	a
Smix	3	0.001000	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 1D -----			
Cmix	3	1.893333	a
Smix	3	1.110000	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 2D -----			
Cmix	3	2.290000	a
Smix	3	0.966667	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 3D -----			
Cmix	3	1.860000	a
Smix	3	0.976667	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 5D -----			

Cmix	3	1.713333	a
Smix	3	0.007967	b

Teste "Duncan" para a variavel: "ANELm"
g.l = 32 qme = 0.273 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	ANELm	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	1.893333	a
Desnut	3	0.640000	b
----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	2.290000	a
Desnut	3	0.573333	b
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	1.860000	a
Desnut	3	1.103333	a
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	1.713333	a
Desnut	3	1.453333	a
----- MIX = Smix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	1.110000	a
Desnut	3	0.416667	a
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.966667	a
Desnut	3	0.253333	a
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	0.976667	a
Desnut	3	0.062667	b
----- MIX = Smix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	0.007967	a
Desnut	3	0.001000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "ANELm"
g.l = 32 qme = 0.273 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	ANELm	grupo
----- GRUPO = Desnut MIX = Cmix -----			
5D	3	1.453333	a
3D	3	1.103333	a
1D	3	0.640000	a
2D	3	0.573333	a
----- GRUPO = Desnut MIX = Smix -----			
1D	3	0.416667	a
2D	3	0.253333	a
3D	3	0.062667	a
5D	3	0.001000	a
----- GRUPO = Nutrid MIX = Cmix -----			
2D	3	2.290000	a
1D	3	1.893333	a
3D	3	1.860000	a
5D	3	1.713333	a
----- GRUPO = Nutrid MIX = Smix -----			
1D	3	1.110000	a
3D	3	0.976667	a
2D	3	0.966667	a
5D	3	0.007967	b

SEGMENTADOS

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : SEG

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados	Quadrado medio	Valor F	PR > F
		Sequencial			

GRUPO	1	1.78401697	1.78401697	6.1622	0.018
MIX	1	28.04767057	28.04767057	96.8805	0.000
DIAS	3	1.31854520	0.43951507	1.5181	0.229
GRUPO*MIX	1	0.02193930	0.02193930	0.0758	0.785
GRUPO*DIAS	3	0.74241807	0.24747269	0.8548	0.474
MIX*DIAS	3	4.64756154	1.54918718	5.3511	0.004
GRUPO*MIX*DIAS	3	0.52568707	0.17522902	0.6053	0.616
Residuo	32	9.26425283	0.28950790		
Total	47	46.35209154			

```

-----
Media      :      1.38475417
Raiz Quad. QMres. :      0.53805938
Coef. Variacao :      38.85594982

```

Teste "Duncan" para a variavel: "SEGM"
 g.l = 32 qme = 0.290 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

MIX	n	SEGM	grupo
----- GRUPO = Desnut DIAS = 1D -----			
Cmix	3	1.643333	a
Smix	3	0.850000	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 2D -----			
Cmix	3	2.030000	a
Smix	3	0.638333	b
----- GRUPO = Desnut DIAS = 3D -----			
Cmix	3	2.203333	a
Smix	3	0.301667	b
----- GRUPO = Desnut DIAS = 5D -----			
Cmix	3	1.863333	a
Smix	3	0.005733	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 1D -----			
Cmix	3	1.606667	a
Smix	3	1.236667	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 2D -----			
Cmix	3	2.176667	a
Smix	3	0.776667	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 3D -----			
Cmix	3	2.966667	a
Smix	3	1.050000	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 5D -----			
Cmix	3	2.703333	a
Smix	3	0.103667	b

Teste "Duncan" para a variavel: "SEGM"
 g.l = 32 qme = 0.290 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

GRUPO	n	SEGM	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Desnut	3	1.643333	a
Nutrid	3	1.606667	a
----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	2.176667	a
Desnut	3	2.030000	a
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	2.966667	a
Desnut	3	2.203333	a
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	2.703333	a
Desnut	3	1.863333	a
----- MIX = Smix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	1.236667	a
Desnut	3	0.850000	a
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.776667	a
Desnut	3	0.638333	a
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	1.050000	a
Desnut	3	0.301667	a


```

----- MIX = Smix DIAS = 5D -----
Nutrid      3      0.103667  a
Desnut      3      0.005733  a

```

Teste "Duncan" para a variavel: "SEGm"
 g.l = 32 qme = 0.290 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

```

DIAS      n      SEGm      grupo
----- GRUPO = Desnut MIX = Cmix -----
3D      3      2.203333  a
2D      3      2.030000  a
5D      3      1.863333  a
1D      3      1.643333  a
----- GRUPO = Desnut MIX = Smix -----
1D      3      0.850000  a
2D      3      0.638333  a
3D      3      0.301667  a
5D      3      0.005733  a
----- GRUPO = Nutrid MIX = Cmix -----
3D      3      2.966667  a
5D      3      2.703333  a
2D      3      2.176667  a b
1D      3      1.606667  b
----- GRUPO = Nutrid MIX = Smix -----
1D      3      1.236667  a
3D      3      1.050000  a
2D      3      0.776667  a b
5D      3      0.103667  b

```

EOSINÓFILOS

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : EOS

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	0.00632502	0.00632502	3.5879	0.067
MIX	1	0.02965102	0.02965102	16.8199	0.000
DIAS	3	0.02443106	0.00814369	4.6196	0.009
GRUPO*MIX	1	0.00065269	0.00065269	0.3702	0.547
GRUPO*DIAS	3	0.01047106	0.00349035	1.9799	0.137
MIX*DIAS	3	0.02648673	0.00882891	5.0083	0.006
GRUPO*MIX*DIAS	3	0.01293606	0.00431202	2.4460	0.082
Residuo	32	0.05641133	0.00176285		
Total	47	0.16736498			

```

-----
Media      :      0.03297917
Raiz Quad. QMres. :      0.04198636
Coef. Variacao :      127.31175816
Teste "Duncan" para a variavel: "EOSm"
g.l = 32 qme = 0.002 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

```

```

MIX      n      EOSm      grupo
----- GRUPO = Desnut DIAS = 1D -----
Cmix      3      0.133333  a
Smix      3      0.000333  b
----- GRUPO = Desnut DIAS = 2D -----
Cmix      3      0.033000  a
Smix      3      0.000333  a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 3D -----
Cmix      3      0.002000  a
Smix      3      0.000333  a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 5D -----

```

Cmix	3	0.002333	a
Smix	3	0.000333	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 1D -----			
Cmix	3	0.116667	a
Smix	3	0.010000	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 2D -----			
Smix	3	0.043333	a
Cmix	3	0.036667	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 3D -----			
Cmix	3	0.136000	a
Smix	3	0.008333	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 5D -----			
Cmix	3	0.002667	a
Smix	3	0.002000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "EOSm"
g.l = 32 qme = 0.002 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	EOSm	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Desnut	3	0.133333	a
Nutrid	3	0.116667	a
----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.036667	a
Desnut	3	0.033000	a
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	0.136000	a
Desnut	3	0.002000	b
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	0.002667	a
Desnut	3	0.002333	a
----- MIX = Smix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.010000	a
Desnut	3	0.000333	a
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.043333	a
Desnut	3	0.000333	a
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	0.008333	a
Desnut	3	0.000333	a
----- MIX = Smix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	0.002000	a
Desnut	3	0.000333	a

Teste "Duncan" para a variavel: "EOSm"
g.l = 32 qme = 0.002 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	EOSm	grupo
----- GRUPO = Desnut MIX = Cmix -----			
1D	3	0.133333	a
2D	3	0.033000	b
5D	3	0.002333	b
3D	3	0.002000	b
----- GRUPO = Desnut MIX = Smix -----			
5D	3	0.000333	a
3D	3	0.000333	a
2D	3	0.000333	a
1D	3	0.000333	a
----- GRUPO = Nutrid MIX = Cmix -----			
3D	3	0.136000	a
1D	3	0.116667	a
2D	3	0.036667	b
5D	3	0.002667	b
----- GRUPO = Nutrid MIX = Smix -----			
2D	3	0.043333	a
1D	3	0.010000	a
3D	3	0.008333	a
5D	3	0.002000	a

LINFÓCITOS

Quadro de análise de variancia

Variavel Dependente : LINF

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	0.80284960	0.80284960	22.0020	0.000
MIX	1	0.14760790	0.14760790	4.0452	0.053
DIAS	3	0.89788287	0.29929429	8.2021	0.000
GRUPO*MIX	1	0.12283657	0.12283657	3.3663	0.076
GRUPO*DIAS	3	0.46619720	0.15539907	4.2587	0.012
MIX*DIAS	3	0.05399457	0.01799819	0.4932	0.690
GRUPO*MIX*DIAS	3	0.07612624	0.02537541	0.6954	0.562
Residuo	32	1.16767683	0.03648990		
Total	47	3.73517177			

Media : 0.19046250
Raiz Quad. QMres. : 0.19102330
Coef. Variacao : 100.29444074

Teste "Duncan" para a variavel: "LINFm"
g.l = 32 qme = 0.036 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	LINFm	grupo
----- GRUPO = Desnut DIAS = 1D -----			
Smix	3	0.703333	a
Cmix	3	0.693333	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 2D -----			
Cmix	3	0.516667	a
Smix	3	0.130000	b
----- GRUPO = Desnut DIAS = 3D -----			
Cmix	3	0.206667	a
Smix	3	0.021667	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 5D -----			
Cmix	3	0.286667	a
Smix	3	0.000000	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 1D -----			
Cmix	3	0.120000	a
Smix	3	0.090333	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 2D -----			
Smix	3	0.120000	a
Cmix	3	0.117333	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 3D -----			
Cmix	3	0.026667	a
Smix	3	0.014733	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 5D -----			
Cmix	3	0.000000	a
Smix	3	0.000000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "LINFm"
g.l = 32 qme = 0.036 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	LINFm	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Desnut	3	0.693333	a
Nutrid	3	0.120000	b
----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----			
Desnut	3	0.516667	a
Nutrid	3	0.117333	b
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----			
Desnut	3	0.206667	a
Nutrid	3	0.026667	a
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----			
Desnut	3	0.286667	a
Nutrid	3	0.000000	a

----- MIX = Smix DIAS = 1D -----				
Desnut	3	0.703333	a	
Nutrid	3	0.090333	b	
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----				
Desnut	3	0.130000	a	
Nutrid	3	0.120000	a	
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----				
Desnut	3	0.021667	a	
Nutrid	3	0.014733	a	
----- MIX = Smix DIAS = 5D -----				
Desnut	3	0.000000	a	
Nutrid	3	0.000000	a	

Teste "Duncan" para a variavel: "LINFm"
g.l = 32 qme = 0.036 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	LINFm	grupo	
----- GRUPO = Desnut MIX = Cmix -----				
1D	3	0.693333	a	
2D	3	0.516667	a	b
5D	3	0.286667	b	
3D	3	0.206667	b	
----- GRUPO = Desnut MIX = Smix -----				
1D	3	0.703333	a	
2D	3	0.130000	b	
3D	3	0.021667	b	
5D	3	0.000000	b	
----- GRUPO = Nutrid MIX = Cmix -----				
1D	3	0.120000	a	
2D	3	0.117333	a	
3D	3	0.026667	a	
5D	3	0.000000	a	
----- GRUPO = Nutrid MIX = Smix -----				
2D	3	0.120000	a	
1D	3	0.090333	a	
3D	3	0.014733	a	
5D	3	0.000000	a	

MOMA

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : MOMA

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	0.09603352	0.09603352	1.3742	0.250
MIX	1	0.45962102	0.45962102	6.5772	0.015
DIAS	3	1.84442573	0.61480858	8.7979	0.000
GRUPO*MIX	1	0.16697002	0.16697002	2.3894	0.132
GRUPO*DIAS	3	0.05322206	0.01774069	0.2539	0.858
MIX*DIAS	3	2.30024956	0.76674985	10.9722	0.000
GRUPO*MIX*DIAS	3	0.07674723	0.02558241	0.3661	0.778
Residuo	32	2.23618867	0.06988090		
Total	47	7.23345781			

Media	:	0.25256250
Raiz Quad. QMres.	:	0.26434995
Coef. Variacao	:	104.66714162

Teste "Duncan" para a variavel: "MOMAm"
g.l = 32 qme = 0.070 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	MOMAm	grupo
----- GRUPO = Desnut DIAS = 1D -----			
Smix	3	0.045333	a
Cmix	3	0.002000	a

----- GRUPO = Desnut DIAS = 2D -----				
Smix	3	0.086667	a	
Cmix	3	0.060000	a	
----- GRUPO = Desnut DIAS = 3D -----				
Cmix	3	0.313333	a	
Smix	3	0.055000	a	
----- GRUPO = Desnut DIAS = 5D -----				
Cmix	3	1.083333	a	
Smix	3	0.017000	b	
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 1D -----				
Smix	3	0.071667	a	
Cmix	3	0.021000	a	
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 2D -----				
Smix	3	0.357333	a	
Cmix	3	0.093667	a	
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 3D -----				
Smix	3	0.444667	a	
Cmix	3	0.243333	a	
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 5D -----				
Cmix	3	0.986667	a	
Smix	3	0.160000	b	

Teste "Duncan" para a variavel: "MOMAm"
g.l = 32 qme = 0.070 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	MOMAm	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.021000	a
Desnut	3	0.002000	a
----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.093667	a
Desnut	3	0.060000	a
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----			
Desnut	3	0.313333	a
Nutrid	3	0.243333	a
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----			
Desnut	3	1.083333	a
Nutrid	3	0.986667	a
----- MIX = Smix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.071667	a
Desnut	3	0.045333	a
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.357333	a
Desnut	3	0.086667	a
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	0.444667	a
Desnut	3	0.055000	a
----- MIX = Smix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	0.160000	a
Desnut	3	0.017000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "MOMAm"
g.l = 32 qme = 0.070 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	MOMAm	grupo
----- GRUPO = Desnut MIX = Cmix -----			
5D	3	1.083333	a
3D	3	0.313333	b
2D	3	0.060000	b
1D	3	0.002000	b
----- GRUPO = Desnut MIX = Smix -----			
2D	3	0.086667	a
3D	3	0.055000	a
1D	3	0.045333	a
5D	3	0.017000	a
----- GRUPO = Nutrid MIX = Cmix -----			
5D	3	0.986667	a
3D	3	0.243333	b
2D	3	0.093667	b

1D	3	0.021000	b
----- GRUPO = Nutrid MIX = Smix -----			
3D	3	0.444667	a
2D	3	0.357333	a
5D	3	0.160000	a
1D	3	0.071667	a

MITOSE

Quadro de análise de variância

Variável Dependente : MITO					
Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	0.05280133	0.05280133	3.0731	0.089
MIX	1	0.97128300	0.97128300	56.5299	0.000
DIAS	3	0.19448067	0.06482689	3.7730	0.020
GRUPO*MIX	1	0.04889633	0.04889633	2.8458	0.101
GRUPO*DIAS	3	0.00555400	0.00185133	0.1077	0.955
MIX*DIAS	3	0.20422567	0.06807522	3.9621	0.016
GRUPO*MIX*DIAS	3	0.00745900	0.00248633	0.1447	0.932
Residuo	32	0.54981600	0.01718175		
Total	47	2.03451600			

Media : 0.14350000
Raiz Quad. QMres. : 0.13107917
Coef. Variacao : 91.34437251

Teste "Duncan" para a variável: "MITOm"
g.l = 32 qme = 0.017 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra não são
significativamente diferentes.

MIX	n	MITOm	grupo
----- GRUPO = Desnut DIAS = 1D -----			
Cmix	3	0.090000	a
Smix	3	0.000000	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 2D -----			
Cmix	3	0.109333	a
Smix	3	0.000000	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 3D -----			
Cmix	3	0.293333	a
Smix	3	0.000000	b
----- GRUPO = Desnut DIAS = 5D -----			
Cmix	3	0.390000	a
Smix	3	0.000000	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 1D -----			
Cmix	3	0.156667	a
Smix	3	0.010000	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 2D -----			
Cmix	3	0.306667	a
Smix	3	0.000000	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 3D -----			
Cmix	3	0.416667	a
Smix	3	0.000000	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 5D -----			
Cmix	3	0.523333	a
Smix	3	0.000000	b

Teste "Duncan" para a variável: "MITOm"
g.l = 32 qme = 0.017 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra não são
significativamente diferentes.

GRUPO	n	MITOm	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.156667	a
Desnut	3	0.090000	a

----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----				
Nutrid	3	0.306667	a	
Desnut	3	0.109333	a	
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----				
Nutrid	3	0.416667	a	
Desnut	3	0.293333	a	
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----				
Nutrid	3	0.523333	a	
Desnut	3	0.390000	a	
----- MIX = Smix DIAS = 1D -----				
Nutrid	3	0.010000	a	
Desnut	3	0.000000	a	
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----				
Desnut	3	0.000000	a	
Nutrid	3	0.000000	a	
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----				
Desnut	3	0.000000	a	
Nutrid	3	0.000000	a	
----- MIX = Smix DIAS = 5D -----				
Desnut	3	0.000000	a	
Nutrid	3	0.000000	a	

Teste "Duncan" para a variavel: "MITOm"
g.l = 32 qme = 0.017 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	MITOm	grupo	
----- GRUPO = Desnut MIX = Cmix -----				
5D	3	0.390000	a	
3D	3	0.293333	a b	
2D	3	0.109333	b	
1D	3	0.090000	b	
----- GRUPO = Desnut MIX = Smix -----				
1D	3	0.000000	a	
2D	3	0.000000	a	
3D	3	0.000000	a	
5D	3	0.000000	a	
----- GRUPO = Nutrid MIX = Cmix -----				
5D	3	0.523333	a	
3D	3	0.416667	a	
2D	3	0.306667	a b	
1D	3	0.156667	b	
----- GRUPO = Nutrid MIX = Smix -----				
1D	3	0.010000	a	
2D	3	0.000000	a	
3D	3	0.000000	a	
5D	3	0.000000	a	

ERITROBLASTOS

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : ERIT

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	0.21493633	0.21493633	14.0277	0.001
MIX	1	0.77673408	0.77673408	50.6932	0.000
DIAS	3	0.01108783	0.00369594	0.2412	0.867
GRUPO*MIX	1	0.02679075	0.02679075	1.7485	0.195
GRUPO*DIAS	3	0.04313250	0.01437750	0.9383	0.434
MIX*DIAS	3	0.08603575	0.02867858	1.8717	0.154
GRUPO*MIX*DIAS	3	0.07126142	0.02375381	1.5503	0.221
Residuo	32	0.49031200	0.01532225		
Total	47	1.72029067			

Media : 0.18366667
Raiz Quad. QMres. : 0.12378308
Coef. Variacao : 67.39550439

Teste "Duncan" para a variavel: "ERITm"
g.l = 32 qme = 0.015 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	ERITm	grupo
----- GRUPO = Desnut DIAS = 1D -----			
Cmix	3	0.153333	a
Smix	3	0.023333	a
----- GRUPO = Desnut DIAS = 2D -----			
Cmix	3	0.231333	a
Smix	3	0.020000	b
----- GRUPO = Desnut DIAS = 3D -----			
Cmix	3	0.353333	a
Smix	3	0.009000	b
----- GRUPO = Desnut DIAS = 5D -----			
Cmix	3	0.143333	a
Smix	3	0.000333	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 1D -----			
Cmix	3	0.372333	a
Smix	3	0.200000	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 2D -----			
Cmix	3	0.326667	a
Smix	3	0.153333	a
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 3D -----			
Cmix	3	0.406667	a
Smix	3	0.045333	b
----- GRUPO = Nutrid DIAS = 5D -----			
Cmix	3	0.500000	a
Smix	3	0.000333	b

Teste "Duncan" para a variavel: "ERITm"
g.l = 32 qme = 0.015 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	ERITm	grupo
----- MIX = Cmix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.372333	a
Desnut	3	0.153333	b
----- MIX = Cmix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.326667	a
Desnut	3	0.231333	a
----- MIX = Cmix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	0.406667	a
Desnut	3	0.353333	a
----- MIX = Cmix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	0.500000	a
Desnut	3	0.143333	b
----- MIX = Smix DIAS = 1D -----			
Nutrid	3	0.200000	a
Desnut	3	0.023333	a
----- MIX = Smix DIAS = 2D -----			
Nutrid	3	0.153333	a
Desnut	3	0.020000	a
----- MIX = Smix DIAS = 3D -----			
Nutrid	3	0.045333	a
Desnut	3	0.009000	a
----- MIX = Smix DIAS = 5D -----			
Nutrid	3	0.000333	a
Desnut	3	0.000333	a

Teste "Duncan" para a variavel: "ERITm"
g.l = 32 qme = 0.015 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	ERITm	grupo
----- GRUPO = Desnut MIX = Cmix -----			
3D	3	0.353333	a

2D	3	0.231333	a
1D	3	0.153333	a
5D	3	0.143333	a
----- GRUPO = Desnut MIX = Smix -----			
1D	3	0.023333	a
2D	3	0.020000	a
3D	3	0.009000	a
5D	3	0.000333	a
----- GRUPO = Nutrid MIX = Cmix -----			
5D	3	0.500000	a
3D	3	0.406667	a
1D	3	0.372333	a
2D	3	0.326667	a
----- GRUPO = Nutrid MIX = Smix -----			
1D	3	0.200000	a
2D	3	0.153333	a
3D	3	0.045333	a
5D	3	0.000333	a

ANOVA 3 VIAS - CULTURA EM METILCELULOSE (CSS) - PLAQUEADO CÉLULAS TOTAIS

CÉLULAS TOTAIS

Descricao das variaveis e fatores do modelo

Fatores	#	niveis	Niveis	
GRUPO	2	1	2	
MIX	2	1	2	
DIAS	3	7	14	21

Variavel dependente: CT

Numero de observacoes lidas : 36
 Numero de observacoes utilizadas : 36
 Quadro de analise de variancia
 Variavel Dependente : CT

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados	Quadrado medio	Valor F	PR > F
Sequencial					
GRUPO	1	247.69513611	247.69513611	18.6441	0.000
MIX	1	1901.39602500	1901.39602500	143.1184	0.000
DIAS	2	8.68666667	4.34333333	0.3269	0.724
GRUPO*MIX	1	137.24122500	137.24122500	10.3302	0.004
GRUPO*DIAS	2	57.02675556	28.51337778	2.1462	0.139
MIX*DIAS	2	114.05420000	57.02710000	4.2924	0.025
GRUPO*MIX*DIAS	2	37.65846667	18.82923333	1.4173	0.262
Residuo	24	318.85140000	13.28547500		
Total	35	2822.60987500			

Media	:	10.84916667
Raiz Quad. QMres.	:	3.64492455
Coef. Variacao	:	33.59635505

Teste "Duncan" para a variavel: "CTm"
 g.l = 24 qme = 13.285 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

MIX	n	CTm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	22.330000	a
2	3	3.916667	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	28.250000	a
2	3	3.090000	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	17.496667	a
2	3	5.750000	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	15.166667	a

2	3	2.916667	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	12.790000	a
2	3	1.066667	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	12.666667	a
2	3	4.750000	b

Teste "Duncan" para a variavel: "CTm"
g.l = 24 qme = 13.285 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	CTm	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	22.330000	a
2	3	15.166667	b
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	28.250000	a
2	3	12.790000	b
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	17.496667	a
2	3	12.666667	a
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	3.916667	a
2	3	2.916667	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	3.090000	a
2	3	1.066667	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	5.750000	a
2	3	4.750000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "CTm"
g.l = 24 qme = 13.285 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	CTm	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
21	3	28.250000	a
14	3	22.330000	a b
7	3	17.496667	b
----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
7	3	5.750000	a
14	3	3.916667	a
21	3	3.090000	a
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
14	3	15.166667	a
21	3	12.790000	a
7	3	12.666667	a
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			
7	3	4.750000	a
14	3	2.916667	a
21	3	1.066667	a

CLUSTER

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : CLUS

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados	Quadrado medio	Valor F	PR > F
Sequencial					
GRUPO	1	2539242.25000000	2539242.25000000	57.6348	0.000
MIX	1	9841814.69444444	9841814.69444444	223.3860	0.000
DIAS	2	1451205.38888889	725602.69444444	16.4695	0.000
GRUPO*MIX	1	2229546.69444444	2229546.69444444	50.6054	0.000
GRUPO*DIAS	2	830514.50000000	415257.25000000	9.4254	0.001
MIX*DIAS	2	1564385.72222222	782192.86111111	17.7539	0.000
GRUPO*MIX*DIAS	2	877858.38888889	438929.19444444	9.9627	0.001
Residuo	24	1057378.66666667	44057.44444444		
Total	35	20391946.30555556			

Media : 576.13888889
 Raiz Quad. QMres. : 209.89865279
 Coef. Variacao : 36.43195362

Teste "Duncan" para a variavel: "CLUSm"
 g.l = 24 qme = 44057.444 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

MIX	n	CLUSm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	1476.000000	a
2	3	77.000000	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	814.666667	a
2	3	80.333333	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	2549.666667	a
2	3	52.666667	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	485.000000	a
2	3	40.000000	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	520.666667	a
2	3	38.333333	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	748.000000	a
2	3	31.333333	b

Teste "Duncan" para a variavel: "CLUSm"
 g.l = 24 qme = 44057.444 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

GRUPO	n	CLUSm	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	1476.000000	a
2	3	485.000000	b
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	814.666667	a
2	3	520.666667	a
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	2549.666667	a
2	3	748.000000	b
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	77.000000	a
2	3	40.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	80.333333	a
2	3	38.333333	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	52.666667	a
2	3	31.333333	a

Teste "Duncan" para a variavel: "CLUSm"
 g.l = 24 qme = 44057.444 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

DIAS	n	CLUSm	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
7	3	2549.666667	a
14	3	1476.000000	b
21	3	814.666667	c
----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
21	3	80.333333	a
14	3	77.000000	a
7	3	52.666667	a
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
7	3	748.000000	a
21	3	520.666667	a
14	3	485.000000	a
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			

14	3	40.000000	a
21	3	38.333333	a
7	3	31.333333	a

COLONIAS

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : COLO

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados	Quadrado medio	Valor F	PR > F
		Sequencial			
GRUPO	1	2809.00000000	2809.00000000	14.3540	0.001
MIX	1	11808.44444444	11808.44444444	60.3412	0.000
DIAS	2	2437.38888889	1218.69444444	6.2275	0.007
GRUPO*MIX	1	2055.11111111	2055.11111111	10.5016	0.003
GRUPO*DIAS	2	497.16666667	248.58333333	1.2703	0.299
MIX*DIAS	2	1582.38888889	791.19444444	4.0430	0.031
GRUPO*MIX*DIAS	2	397.05555556	198.52777778	1.0145	0.378
Residuo	24	4696.66666667	195.69444444		
Total	35	26283.22222222			

Media : 24.27777778
 Raiz Quad. QMres. : 13.98908305
 Coef. Variacao : 57.62093703

Teste "Duncan" para a variavel: "COLOm"
 g.l = 24 qme = 195.694 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

MIX	n	COLOm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	74.000000	a
2	3	6.666667	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	74.000000	a
2	3	11.333333	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	28.333333	a
2	3	4.333333	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	28.000000	a
2	3	6.000000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	35.333333	a
2	3	5.000000	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	14.666667	a
2	3	3.666667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "COLOm"
 g.l = 24 qme = 195.694 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

GRUPO	n	COLOm	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	74.000000	a
2	3	28.000000	b
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	74.000000	a
2	3	35.333333	b
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	28.333333	a
2	3	14.666667	a
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	6.666667	a
2	3	6.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	11.333333	a
2	3	5.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	4.333333	a
2	3	3.666667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "COLOm"
g.l = 24 qme = 195.694 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	COLOm	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
14	3	74.000000	a
21	3	74.000000	a
7	3	28.333333	b
----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
21	3	11.333333	a
14	3	6.666667	a
7	3	4.333333	a
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
21	3	35.333333	a
14	3	28.000000	a
7	3	14.666667	a
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			
14	3	6.000000	a
21	3	5.000000	a
7	3	3.666667	a

BLASTOS

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : BLAS

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados	Quadrado medio	Valor F	PR > F
----- Sequencial -----					
GRUPO	1	0.12168469	0.12168469	1.2601	0.273
MIX	1	2.49376736	2.49376736	25.8231	0.000
DIAS	2	1.26463217	0.63231608	6.5477	0.005
GRUPO*MIX	1	0.12519803	0.12519803	1.2964	0.266
GRUPO*DIAS	2	0.16387439	0.08193719	0.8485	0.441
MIX*DIAS	2	1.19821372	0.59910686	6.2038	0.007
GRUPO*MIX*DIAS	2	0.16351106	0.08175553	0.8466	0.441
Residuo	24	2.31770733	0.09657114		
Total	35	7.84858675			

Media : 0.27858333
Raiz Quad. QMres. : 0.31075897
Coef. Variacao : 111.54973581

Teste "Duncan" para a variavel: "BLASm"
g.l = 24 qme = 0.097 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	BLASm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	1.210000	a
2	3	0.000000	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	0.766667	a
2	3	0.043667	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	0.634000	a
2	3	0.000000	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	0.083333	a
2	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.556667	a
2	3	0.048667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "BLASm"

g.l = 24 qme = 0.097 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

GRUPO	n	BLASm	grupo
1	3	DIAS = 14	
2	3	1.210000	a
	3	0.634000	b
2	3	DIAS = 21	
1	3	0.083333	a
	3	0.000000	a
1	3	DIAS = 7	
2	3	0.766667	a
	3	0.556667	a
1	3	DIAS = 14	
2	3	0.000000	a
	3	0.000000	a
1	3	DIAS = 21	
2	3	0.000000	a
	3	0.000000	a
2	3	DIAS = 7	
1	3	0.048667	a
	3	0.043667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "BLASm"
 g.l = 24 qme = 0.097 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

DIAS	n	BLASm	grupo
14	3	GRUPO = 1 MIX = 1	
7	3	1.210000	a
21	3	0.766667	a
	3	0.000000	b
7	3	GRUPO = 1 MIX = 2	
21	3	0.043667	a
14	3	0.000000	a
	3	0.000000	a
14	3	GRUPO = 2 MIX = 1	
7	3	0.634000	a
21	3	0.556667	a b
	3	0.083333	b
7	3	GRUPO = 2 MIX = 2	
21	3	0.048667	a
14	3	0.000000	a
	3	0.000000	a

JOVENS

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : JOV

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	7.47020003	7.47020003	6.2755	0.019
MIX	1	29.41073669	29.41073669	24.7072	0.000
DIAS	2	20.82227506	10.41113753	8.7461	0.001
GRUPO*MIX	1	5.64933669	5.64933669	4.7459	0.039
GRUPO*DIAS	2	3.97877172	1.98938586	1.6712	0.209
MIX*DIAS	2	14.24805172	7.12402586	5.9847	0.008
GRUPO*MIX*DIAS	2	3.34682172	1.67341086	1.4058	0.265
Residuo	24	28.56889400	1.19037058		
Total	35	113.49508764			
Media	:	1.06669444			
Raiz Quad. QMres.	:	1.09104105			
Coef. Variacao	:	102.28243529			

Teste "Duncan" para a variavel: "JOVm"
 g.l = 24 qme = 1.191 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao

significativamente diferentes.

MIX	n	JOVm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	4.103333	a
2	3	0.000000	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
2	3	0.010000	a
1	3	0.000000	a
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	4.363333	a
2	3	0.656667	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	1.350000	a
2	3	0.063667	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	0.066667	a
2	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	1.940000	a
2	3	0.246667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "JOVm"

g.l = 24 qme = 1.191 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	JOVm	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	4.103333	a
2	3	1.350000	b
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
2	3	0.066667	a
1	3	0.000000	a
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	4.363333	a
2	3	1.940000	b
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
2	3	0.063667	a
1	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	0.010000	a
2	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.656667	a
2	3	0.246667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "JOVm"

g.l = 24 qme = 1.191 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	JOVm	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
7	3	4.363333	a
14	3	4.103333	a
21	3	0.000000	b
----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
7	3	0.656667	a
21	3	0.010000	a
14	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
7	3	1.940000	a
14	3	1.350000	a
21	3	0.066667	a
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			
7	3	0.246667	a
14	3	0.063667	a
21	3	0.000000	a

ANEL

Quadro de análise de variancia

Variavel Dependente : ANEL

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados	Quadrado medio	Valor F	PR > F
		Sequencial			
GRUPO	1	0.96628900	0.96628900	2.6662	0.116
MIX	1	2.83248900	2.83248900	7.8154	0.010
DIAS	2	2.08197739	1.04098869	2.8723	0.076
GRUPO*MIX	1	0.35521600	0.35521600	0.9801	0.332
GRUPO*DIAS	2	0.42242217	0.21121108	0.5828	0.566
MIX*DIAS	2	0.51808550	0.25904275	0.7148	0.499
GRUPO*MIX*DIAS	2	0.05280517	0.02640258	0.0729	0.930
Residuo	24	8.69815600	0.36242317		
Total	35	15.92744022			

Media : 0.43377778
 Raiz Quad. QMres. : 0.60201592
 Coef. Variacao : 138.78440754

Teste "Duncan" para a variavel: "ANELm"
 g.l = 24 qme = 0.362 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

MIX	n	ANELm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	0.906667	a
2	3	0.030000	a
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	0.452333	a
2	3	0.050000	a
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	1.573333	a
2	3	0.573333	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	0.320000	a
2	3	0.057000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	0.223333	a
2	3	0.100000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.810000	a
2	3	0.109333	a

Teste "Duncan" para a variavel: "ANELm"
 g.l = 24 qme = 0.362 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

GRUPO	n	ANELm	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	0.906667	a
2	3	0.320000	a
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	0.452333	a
2	3	0.223333	a
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	1.573333	a
2	3	0.810000	a
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
2	3	0.057000	a
1	3	0.030000	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
2	3	0.100000	a
1	3	0.050000	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.573333	a
2	3	0.109333	a

Teste "Duncan" para a variavel: "ANELm"
g.l = 24 qme = 0.362 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	ANELm	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
7	3	1.573333	a
14	3	0.906667	a b
21	3	0.452333	b
----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
7	3	0.573333	a
21	3	0.050000	a
14	3	0.030000	a
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
7	3	0.810000	a
14	3	0.320000	a
21	3	0.223333	a
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			
7	3	0.109333	a
21	3	0.100000	a
14	3	0.057000	a

SEGMENTADO

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : SEG

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	3.90655225	3.90655225	3.8195	0.062
MIX	1	18.27705003	18.27705003	17.8699	0.000
DIAS	2	28.59533672	14.29766836	13.9792	0.000
GRUPO*MIX	1	2.40715225	2.40715225	2.3535	0.138
GRUPO*DIAS	2	1.43943117	0.71971558	0.7037	0.505
MIX*DIAS	2	9.60937506	4.80468753	4.6977	0.019
GRUPO*MIX*DIAS	2	1.35777617	0.67888808	0.6638	0.524
Residuo	24	24.54675400	1.02278142		
Total	35	90.13942764			

Media : 1.35169444
Raiz Quad. QMres. : 1.01132656
Coef. Variacao : 74.81916989

Teste "Duncan" para a variavel: "SEGm"
g.l = 24 qme = 1.023 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	SEGm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	1.360000	a
2	3	0.163333	a
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	1.986667	a
2	3	0.253333	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	4.610000	a
2	3	1.713333	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	0.648333	a
2	3	0.611667	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
2	3	0.466667	a
1	3	0.283333	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	3.497000	a
2	3	0.626667	b

Teste "Duncan" para a variavel: "SEGm"
g.l = 24 qme = 1.023 alfa = 0.05

medias ligadas com uma mesma letra nao sao significativamente diferentes.

GRUPO	n	SEGM	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	1.360000	a
2	3	0.648333	a
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	1.986667	a
2	3	0.283333	b
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	4.610000	a
2	3	3.497000	a
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
2	3	0.611667	a
1	3	0.163333	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
2	3	0.466667	a
1	3	0.253333	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	1.713333	a
2	3	0.626667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "SEGM"
g.l = 24 qme = 1.023 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao significativamente diferentes.

DIAS	n	SEGM	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
7	3	4.610000	a
21	3	1.986667	b
14	3	1.360000	b
----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
7	3	1.713333	a
21	3	0.253333	a
14	3	0.163333	a
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
7	3	3.497000	a
14	3	0.648333	b
21	3	0.283333	b
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			
7	3	0.626667	a
14	3	0.611667	a
21	3	0.466667	a

MITOSE

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : MITO

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	0.16673611	0.16673611	6.1640	0.020
MIX	1	1.72922500	1.72922500	63.9270	0.000
DIAS	2	0.88661667	0.44330833	16.3885	0.000
GRUPO*MIX	1	0.06673611	0.06673611	2.4671	0.129
GRUPO*DIAS	2	0.20117222	0.10058611	3.7185	0.039
MIX*DIAS	2	0.87585000	0.43792500	16.1895	0.000
GRUPO*MIX*DIAS	2	0.19553889	0.09776944	3.6144	0.042
Residuo	24	0.64920000	0.02705000		
Total	35	4.77107500			

Media	:	0.24416667			
Raiz Quad. QMres.	:	0.16446884			
Coef. Variacao	:	67.35925271			

Teste "Duncan" para a variavel: "MITOM"
g.l = 24 qme = 0.027 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

significativamente diferentes.

MIX	n	MITOm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	0.800000	a
2	3	0.000000	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	0.256667	a
2	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	0.756667	a
2	3	0.050000	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	0.073333	a
2	3	0.046667	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.893333	a
2	3	0.053333	b

Teste "Duncan" para a variavel: "MITOm"
g.l = 24 qme = 0.027 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	MITOm	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	0.800000	a
2	3	0.756667	a
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
2	3	0.073333	a
1	3	0.000000	a
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
2	3	0.893333	a
1	3	0.256667	b
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
2	3	0.050000	a
1	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
2	3	0.046667	a
1	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
2	3	0.053333	a
1	3	0.000000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "MITOm"
g.l = 24 qme = 0.027 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	MITOm	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
14	3	0.800000	a
7	3	0.256667	b
21	3	0.000000	b
----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
14	3	0.000000	a
21	3	0.000000	a
7	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
7	3	0.893333	a
14	3	0.756667	a
21	3	0.073333	b
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			
7	3	0.053333	a
14	3	0.050000	a
21	3	0.046667	a

ERITROBLASTO

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : ERIT

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados Sequencial	Quadrado medio	Valor F	PR > F
GRUPO	1	1.20414044	1.20414044	8.0735	0.009
MIX	1	2.09863511	2.09863511	14.0709	0.001
DIAS	2	0.95551606	0.47775803	3.2033	0.058
GRUPO*MIX	1	1.00200100	1.00200100	6.7182	0.016
GRUPO*DIAS	2	0.41591839	0.20795919	1.3943	0.267
MIX*DIAS	2	0.68422772	0.34211386	2.2938	0.123
GRUPO*MIX*DIAS	2	0.29245117	0.14622558	0.9804	0.390
Residuo	24	3.57953333	0.14914722		
Total	35	10.23242322			

Media : 0.27772222
 Raiz Quad. QMres. : 0.38619583
 Coef. Variacao : 139.05831191

Teste "Duncan" para a variavel: "ERITm"
 g.l = 24 qme = 0.149 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

MIX	n	ERITm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	1.093333	a
2	3	0.000000	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	0.196667	a
2	3	0.003333	a
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	1.316667	a
2	3	0.153667	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	0.351667	a
2	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.156667	a
2	3	0.060667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "ERITm"
 g.l = 24 qme = 0.149 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

GRUPO	n	ERITm	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	1.093333	a
2	3	0.351667	b
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	0.196667	a
2	3	0.000000	a
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	1.316667	a
2	3	0.156667	b
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	0.003333	a
2	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.153667	a
2	3	0.060667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "ERITm"
 g.l = 24 qme = 0.149 alfa = 0.05
 medias ligadas com uma mesma letra nao sao
 significativamente diferentes.

DIAS	n	ERITm	grupo
------	---	-------	-------

GRUPO = 1 MIX = 1			
7	3	1.316667	a
14	3	1.093333	a
21	3	0.196667	b
GRUPO = 1 MIX = 2			
7	3	0.153667	a
21	3	0.003333	a
14	3	0.000000	a
GRUPO = 2 MIX = 1			
14	3	0.351667	a
7	3	0.156667	a
21	3	0.000000	a
GRUPO = 2 MIX = 2			
7	3	0.060667	a
21	3	0.000000	a
14	3	0.000000	a

LINFOCITOS

Quadro de análise de variancia

Variavel Dependente : LINF

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados	Quadrado medio	Valor F	PR > F
Sequencial					
GRUPO	1	0.00205511	0.00205511	2.4334	0.132
MIX	1	0.00205511	0.00205511	2.4334	0.132
DIAS	2	0.00610467	0.00305233	3.6141	0.042
GRUPO*MIX	1	0.00846400	0.00846400	10.0218	0.004
GRUPO*DIAS	2	0.01111356	0.00555678	6.5795	0.005
MIX*DIAS	2	0.01111356	0.00555678	6.5795	0.005
GRUPO*MIX*DIAS	2	0.00610467	0.00305233	3.6141	0.042
Residuo	24	0.02026933	0.00084456		
Total	35	0.06728000			

Media	:	0.01533333			
Raiz Quad. QMres.	:	0.02906124			
Coef. Variacao	:	189.52981321			

Teste "Duncan" para a variavel: "LINFm"
g.l = 24 qme = 0.001 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	LINFm	grupo
GRUPO = 1 DIAS = 14			
2	3	0.010000	a
1	3	0.000000	a
GRUPO = 1 DIAS = 21			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
GRUPO = 1 DIAS = 7			
2	3	0.127333	a
1	3	0.000000	b
GRUPO = 2 DIAS = 14			
1	3	0.046667	a
2	3	0.000000	a
GRUPO = 2 DIAS = 21			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
GRUPO = 2 DIAS = 7			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "LINFm"
g.l = 24 qme = 0.001 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	LINFm	grupo
MIX = 1 DIAS = 14			

2	3	0.046667	a
1	3	0.000000	a
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	0.010000	a
2	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.127333	a
2	3	0.000000	b

Teste "Duncan" para a variavel: "LINFm"
g.l = 24 qme = 0.001 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	LINFm	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
14	3	0.000000	a
21	3	0.000000	a
7	3	0.000000	a
----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
7	3	0.127333	a
14	3	0.010000	b
21	3	0.000000	b
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
14	3	0.046667	a
21	3	0.000000	a
7	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			
14	3	0.000000	a
21	3	0.000000	a
7	3	0.000000	a

EOSINÓFILOS

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : EOS

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados	Quadrado medio	Valor F	PR > F
Sequencial					
GRUPO	1	0.01384544	0.01384544	1.7153	0.203
MIX	1	0.00822044	0.00822044	1.0184	0.323
DIAS	2	0.03029006	0.01514503	1.8763	0.175
GRUPO*MIX	1	0.05792044	0.05792044	7.1756	0.013
GRUPO*DIAS	2	0.01964006	0.00982003	1.2166	0.314
MIX*DIAS	2	0.01122506	0.00561253	0.6953	0.509
GRUPO*MIX*DIAS	2	0.02997506	0.01498753	1.8568	0.178
Residuo	24	0.19372400	0.00807183		
Total	35	0.36484056			

Media : 0.04461111
Raiz Quad. QMres. : 0.08984338
Coef. Variacao : 201.39238860

Teste "Duncan" para a variavel: "EOSm"
g.l = 24 qme = 0.008 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	EOSm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	0.185000	a
2	3	0.000000	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			

1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	0.173333	a
2	3	0.027000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
2	3	0.123333	a
1	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
2	3	0.026667	a
1	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "EOSm"
g.l = 24 qme = 0.008 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	EOSm	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	0.185000	a
2	3	0.000000	b
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	0.000000	a
2	3	0.000000	a
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	0.173333	a
2	3	0.000000	b
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
2	3	0.123333	a
1	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
2	3	0.026667	a
1	3	0.000000	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	0.027000	a
2	3	0.000000	a

Teste "Duncan" para a variavel: "EOSm"
g.l = 24 qme = 0.008 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	EOSm	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
14	3	0.185000	a
7	3	0.173333	a
21	3	0.000000	b
----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
7	3	0.027000	a
21	3	0.000000	a
14	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
14	3	0.000000	a
21	3	0.000000	a
7	3	0.000000	a
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			
14	3	0.123333	a
21	3	0.026667	a
7	3	0.000000	a

MONÓCITO/MACRÓFAGO

Quadro de analise de variancia

Variavel Dependente : MOMA

Fonte de variacao	gl	Soma de quadrados	Quadrado medio	Valor F	PR > F
		Sequencial			
GRUPO	1	30.12180278	30.12180278	4.0967	0.054
MIX	1	956.56180278	956.56180278	130.0962	0.000

DIAS	2	261.83500556	130.91750278	17.8053	0.000
GRUPO*MIX	1	51.76802500	51.76802500	7.0407	0.014
GRUPO*DIAS	2	104.76057222	52.38028611	7.1239	0.004
MIX*DIAS	2	310.36773889	155.18386944	21.1056	0.000
GRUPO*MIX*DIAS	2	105.27855000	52.63927500	7.1591	0.004
Residuo	24	176.46546667	7.35272778		
Total	35	1997.15896389			

```

-----
Media      :      6.74805556
Raiz Quad. QMres. :      2.71159137
Coef. Variacao :      40.18329949

```

Teste "Duncan" para a variavel: "MOMAm"
g.l = 24 qme = 7.353 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

MIX	n	MOMAm	grupo
----- GRUPO = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	12.890000	a
2	3	1.330000	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	25.593333	a
2	3	0.990000	b
----- GRUPO = 1 DIAS = 7 -----			
1	3	3.566667	a
2	3	1.606667	a
----- GRUPO = 2 DIAS = 14 -----			
1	3	10.343333	a
2	3	2.070000	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 21 -----			
1	3	12.286667	a
2	3	1.510000	b
----- GRUPO = 2 DIAS = 7 -----			
1	3	6.736667	a
2	3	2.053333	b

Teste "Duncan" para a variavel: "MOMAm"
g.l = 24 qme = 7.353 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

GRUPO	n	MOMAm	grupo
----- MIX = 1 DIAS = 14 -----			
1	3	12.890000	a
2	3	10.343333	a
----- MIX = 1 DIAS = 21 -----			
1	3	25.593333	a
2	3	12.286667	b
----- MIX = 1 DIAS = 7 -----			
2	3	6.736667	a
1	3	3.566667	a
----- MIX = 2 DIAS = 14 -----			
2	3	2.070000	a
1	3	1.330000	a
----- MIX = 2 DIAS = 21 -----			
2	3	1.510000	a
1	3	0.990000	a
----- MIX = 2 DIAS = 7 -----			
2	3	2.053333	a
1	3	1.606667	a

Teste "Duncan" para a variavel: "MOMAm"
g.l = 24 qme = 7.353 alfa = 0.05
medias ligadas com uma mesma letra nao sao
significativamente diferentes.

DIAS	n	MOMAm	grupo
----- GRUPO = 1 MIX = 1 -----			
21	3	25.593333	a
14	3	12.890000	b
7	3	3.566667	c

----- GRUPO = 1 MIX = 2 -----			
7	3	1.606667	a
14	3	1.330000	a
21	3	0.990000	a
----- GRUPO = 2 MIX = 1 -----			
21	3	12.286667	a
14	3	10.343333	a b
7	3	6.736667	b
----- GRUPO = 2 MIX = 2 -----			
14	3	2.070000	a
7	3	2.053333	a
21	3	1.510000	a