

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

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

**Avaliação imuno-histoquímica e ultra-estrutural
da matriz extracelular da medula óssea de
camundongos submetidos à
desnutrição protéica**

Maria Emília Favero

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Primavera Borelli

São Paulo
2003

DEDALUS - Acervo - CQ



30100005714

Ficha Catalográfica

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

F273a Favero, Maria Emilia
Avaliação imuno-histoquímica e ultra-estrutural da matriz extracelular da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica / Maria Emilia Favero. -- São Paulo, 2003.
92p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas. Curso de Mestrado Interinstitucional com a Universidade Estadual de Londrina.
Orientador: Borelli, Primavera

1. Hematologia 2. Desnutrição protéico-calórica : Medicina
I. T. II. Borelli, Primavera, orientador.

616.15 CDD

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

Maria Emília Favero

**Avaliação imuno-histoquímica e ultra-estrutural da matriz
extracelular da medula óssea de camundongos submetidos
à desnutrição protéica**

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dra. Primavera Borelli
orientador/presidente**

**Profa. Dra. Marinilce Fagundes dos Santos
1º. examinador**

**Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas
2º. examinador**

São Paulo, 5 de novembro de 2003.

Ao meu pai, Orlando Favero (*in memoriam*).
Com honestidade e muito trabalho deixou nos como herança, o maior bem
de todos, o CONHECIMENTO.

À Lucinda Favero, minha mãe, minha amiga, minha fortaleza.
Pela sua sabedoria e dedicação integral aos seus oito filhos.
Seu exemplo me ensina a continuar sempre.

À minha irmã, Neuza Marina Favero
Ao meu irmão Cláudio Favero
Com carinho, amizade e apoio constante contribuíram para a minha
formação pessoal e profissional.

Ao meu irmão Fernando Fávero, sua esposa Deusa G.T.R. Fávero e seus
filhos Gregório e Frederico, pelo carinho e amizade, principalmente durante
o período de realização deste trabalho.

Ao meu irmão, Roberto Aparecido Fávero (*in memoriam*).
Uma mente brilhante que desistiu de viver seus sonhos.
Que sua alma descanse em DEUS.

Aos demais irmãos e cunhadas
Nicomedes Favero e Nívea Maria Haggi Favero
Antônio Favero Sobrinho e Dione Dantas Favero
Luís Carlos Favero e Elaine Velozo Favero
Neusa Maria Vilas Bôas Favero
Que juntamente com seus filhos fazem parte da nossa grande família
proporcionando-me muitos momentos de felicidade.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, porque Dele recebi o dom da vida e nele encontro forças para superar as adversidades, que não são poucas. Pois, “SE DEUS É POR NÓS QUEM SERÁ CONTRA NÓS?” (Romanos 8:31).

À Profa. Dra. Primavera Borelli, pelo empenho na viabilização do programa de mestrado interinstitucional USP/UEL em Análises Clínicas, mas principalmente por aceitar meu pedido de orientação, proporcionando-me a oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço pelo estímulo, confiança e orientação efetiva em todas as etapas de desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitor E. Arana-Chavez, pela disponibilização de seu laboratório e pela atenção e valiosa colaboração na realização das análises ultra-estruturais.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Zaidan Dagli, pela disponibilização de seu laboratório, valiosa colaboração na padronização das técnicas histológicas e imuno-histoquímicas e pelas sugestões na fase de qualificação.

Ao Prof. Dr. José Guilherme Xavier, pela colaboração nas análises histomorfométricas.

Ao amigo Ricardo Ambrósio Fock. Sempre alegre, faz com que as longas horas de experimento sejam mais agradáveis. Agradeço pelos momentos de convívio e pelo inestimável apoio profissional em várias etapas do desenvolvimento deste trabalho, principalmente pelo auxílio na coleta de material biológico.

À amiga Solange Lúcia Blatt, pela colaboração na realização das análises do mielograma e pelos momentos de convívio.

Ao Marco Aurélio Ramirez Vinolo, pela grande colaboração na realização do processo de desnutrição dos animais.

Aos demais amigos do Laboratório de Hematologia Experimental: Ana Cristina, Mariana, Marcelo, Mônica, Amanda e Antônio Altair, pela colaboração e pelos momentos agradáveis de convívio.

Às professoras Edna Maria Vissoci Reche e Leda Mezzaroba, por terem acreditado na capacitação docente, pelo esforço e dedicação na viabilização do programa de mestrado interinstitucional, e que, junto com os demais docentes do departamento PALD deram suporte ao programa Minter, proporcionando a capacitação da "família Minter".

Aos docentes do Minter: Lígia Ferreira Gomes, Adhemar Longatto Filho, Hermínia K. Kanamura, Primavera Borelli, Adelaide José Vaz, Rosário D. C. Hirata, Ana Campa, Marina Baquerizo Martinez, Roxane M. F. Piazza, Dulcinéia Saes Parra Abdalla, Raul Cavalcante Maranhão, Ricardo David Couto e Emerson S. Lima, pelos ensinamentos e oportunidade de convívio.

Aos colegas de disciplina José Wander Breganó e Aparecida de Lourdes Perim, pelo incentivo e colaboração durante a minha ausência.

Aos docentes de Nefrologia do CCS/UEL, Dr. Altair J. Mocelin, Dr. Vinicius D.A. Delfino e Dr. Waldir Eduardo Garcia, pela amizade, confiança no meu trabalho e pelo apoio e estímulo constantes.

Aos funcionários do Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação: Marcelo A.H. Costa, Jair Antônio de Macedo e Izaltino Farias, pela amizade, dedicação ao trabalho e valiosa colaboração principalmente no período de minha ausência.

À Marina Aparecida de Campos, secretária do Departamento PALD-UEL, Elaine M. Ychico, Jorge de Lima e Ana Maria Dantas, da secretaria de pós-graduação (FCF-USP) pela atenção e colaboração dispensada aos alunos do programa Minter e pela gentileza no atendimento.

À amiga e colega de disciplina Sandra R.Q. Carvalho, sempre alegre e disposta a ajudar todos os que estão ao seu redor. Sua amizade é um presente de DEUS.

Aos amigos da FAMÍLIA MINTER: Ingridt, Egídio, Helena, Regina, Sirlei, e especialmente Alessandra, Jair e Emerson, meus queridos companheiros no "Big Brother Minter".

Às amigas Nice e Maristela, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos de maior dificuldade, dando apoio e consolo, mas também em muitos momentos de alegria, por isso são amigas para a vida inteira.

Hoje, olhando para o passado, vejo claramente que muita gente me fez ser
mais feliz.

Uns são indispensáveis porque foram fundamentais para o meu
crescimento.

Outros simplesmente porque, sendo amigos, compartilham os bons e os
maus momentos.

E alguns são importantes porque, sendo diferentes de mim, me ensinam
coisas novas.

Com estas pessoas, estou aprendendo a apostar nas virtudes de cada um e,
com certeza, hoje sou um pouco de cada uma destas pessoas.

SUMÁRIO

<i>LISTA DE ABREVIATURAS</i> -----	<i>i</i>
<i>LISTA DE FIGURAS</i> -----	<i>ii</i>
<i>LISTA DE TABELAS</i> -----	<i>iii</i>
<i>RESUMO</i> -----	<i>iv</i>
<i>ABSTRACT</i> -----	<i>v</i>
<i>1 Introdução</i> -----	<i>1</i>
1.1 Nutrição e Desnutrição-----	2
1.2 Células sangüíneas, tecido hemopoético e microambiente medular-----	4
1.3 Matriz Extracelular-----	9
1.3.1 Colágenos-----	11
1.3.2 Fibronectina-----	13
1.3.3 Laminina-----	15
1.3.4 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos-----	17
1.4 Hemopoese e Desnutrição-----	19
<i>2 Objetivos</i> -----	<i>23</i>
<i>3 Material e Métodos</i> -----	<i>25</i>
3.1 Animais-----	26
3.2 Rações-----	26
3.3 Processo de Desnutrição-----	28
3.4 Avaliação da concentração de proteínas e lípidos, e do teor de umidade das rações-----	28
3.5 Avaliação do estado nutricional dos animais-----	28
3.5.1 Determinação de proteínas plasmáticas-----	29
3.6 Avaliação hematológica do sangue periférico-----	29
3.7 Avaliação da celularidade medular-----	30
3.7.1 Mielograma-----	30
3.7.2 Avaliação histomorfométrica da celularidade medular-----	31
3.8 Distribuição da MEC da medula óssea de camundongos-----	32
3.8.1 Avaliação imuno-histoquímica de Fibronectina e Laminina da matriz extracelular da medula óssea-----	32
3.9 Avaliação citoquímica ultra-estrutural para identificação de proteoglicanos da MEC da medula óssea de camundongos-----	33
3.9.1 Processamento das amostras-----	33
3.9.2 Cortes e análise estrutural-----	34
3.10 Análise Estatística-----	35

<i>4 Resultados</i> -----	36
4.1 Avaliação da concentração protéica das rações -----	37
4.2 Avaliação do estado nutricional -----	37
4.2.1 Consumo diário de ração e de proteínas -----	37
4.2.2 Variação de peso corporal e concentração de proteínas plasmáticas -----	37
4.3 Avaliação hematológica do sangue periférico -----	39
4.4 Avaliação da celularidade da medula óssea - Mielograma -----	41
4.5 Avaliação histomorfométrica da medula óssea -----	42
4.6 Distribuição da MEC da medula óssea de camundongos -----	47
4.6.1- Avaliação histoquímica -----	47
4.6.2 Avaliação imuno-histoquímica -----	51
4.7. Avaliação ultra-estrutural de proteoglicanos da MO -----	56
<i>5 Discussão</i> -----	60
<i>6 Conclusão</i> -----	77
<i>7 Referências bibliográficas</i> -----	79
<i>ANEXOS</i>	

LISTA DE ABREVIATURAS

AH	Ácido hialurônico
CS	Condroitin sulfato
CS-PG	Proteoglicano condroitin sulfato
CTH	Célula tronco hemopoética
DPE	Desnutrição protéico-energética
DS	Dermatan sulfato
DS-PG	Proteoglicano dermatan sulfato
FCF	Fator de crescimento fibroblástico
FCH	Fatores de crescimento hemopoético
FN	Fibronectina
GAG	Glicosaminoglicano
GM-CSF	Fator de crescimento granulocítico- monocítico
HE	Hematoxilina e Eosina
HS	Heparan sulfato
HS-PG	Proteoglicano heparan sulfato
LN	Laminina
MEC	Matriz extracelular
MH	Microambiente hemopoético
MO	Medula óssea
PAS	Reação do ácido periódico de Schiff
PG	Proteoglicano
TGF-β	Fator transformante do crescimento β

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Microambiente hemopoético.....	08
Figura 2	Influência da interação celular com a MEC.....	10
Figura 3	Estrutura modular da molécula de fibronectina.....	14
Figura 4	Representação esquemática da molécula de laminina.....	15
Figura 5	Consumo diário de ração e proteínas, variação de peso corporal de camundongos Swiss, adultos, machos.....	38
Figura 6	Mielograma.....	42
Figura 7	Avaliação histológica da medula óssea - HE	44
Figura 8	Avaliação histológica da medula óssea - HE (62,5x).....	45
Figura 9	Avaliação histomorfométrica da medula óssea de camundongos Swiss webster, adultos, machos.....	46
Figura 10	Avaliação histoquímica: Reação do PAS.....	48
Figura 11	Avaliação histoquímica: Coloração Azul de alcian.....	49
Figura 12	Avaliação histoquímica: Coloração Tricrômico de Masson.....	50
Figura 13	Avaliação imuno-histoquímica – Fibronectina	52
Figura 14	Avaliação imuno-histoquímica - Fibronectina.....	53
Figura 15	Avaliação imuno-histoquímica –Laminina	54
Figura 16	Avaliação imu-histoquímica -Laminina.....	55
Figura 17	Avaliação ultra-estrutural da MO de camundongos.....	57
Figura 18	Avaliação ultra-estrutural da MO de camundongos.....	58
Figura 19	Avaliação citoquímica ultra-estrutural da MO de camundongos...59	

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição percentual das rações.....	27
Tabela 2	Concentração de proteínas, lípidos e umidade das rações.....	37
Tabela 3	Concentração de proteínas totais e albumina plasmática.....	38
Tabela 4	Eritrograma de camundongos Swiss webster, adultos machos.....	40
Tabela 5	Leucograma de camundongos Swuis webster, adultos, machos.....	41

RESUMO

A desnutrição protéico-energética (DPE) é a causa mundial mais comum de desnutrição. Geralmente, é encontrada em crianças, idosos, pacientes com neoplasia e doenças crônicas ou pacientes submetidos a quimioterapia e nutrição parenteral, ou ainda em pacientes sob dieta radical. A DPE modifica a resposta imune específica e inespecífica, e desta forma a associação entre doença e DPE é freqüente. Alguns estudos indicam que a desnutrição grave produz vários efeitos celulares, como redução ou perda da capacidade de proliferação, em vários órgãos. Como consequência da constante e elevada demanda de proteína pelo tecido hemopoético, este pode apresentar alterações qualitativas e quantitativas em condições de desnutrição protéica. A hemopoese é um processo altamente regulado em vários níveis, destacando-se a participação do microambiente hemopoético (MH). Neste trabalho, avaliamos as alterações da matriz extracelular (MEC) da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica. Camundongos Swiss, 2 a 3 meses de idade, foram colocados em gaiolas metabólicas individuais e receberam dieta controle por 14 dias. Após este período de adaptação, foram separados em dois grupos, ao quais receberam ração controle (20% de proteína) ou ração hipoprotéica (4% de proteína) e água *ad libitum*. Exceto pelo conteúdo protéico, as duas rações foram idênticas e isocalóricas. Os experimentos foram realizados quando os animais do grupo desnutrido atingiram perda de 20 a 25% do peso corporal inicial. As amostras de sangue foram coletadas por punção cardíaca e simultaneamente, células da medula óssea e cortes histológicos de esternos foram obtidos para a realização de análises histológicas, imunohistoquímicas e ultra-estruturais. Observamos aumento na expressão de fibronectina e laminina na medula óssea de camundongos desnutridos, particularmente na região endosteal. Ultra-estruturalmente, observamos rarefação celular, com aumento do espaço intercelular e de MEC. Também observamos alterações na distribuição de proteoglicanos. Estas alterações microambientais relacionadas à composição da MEC e à organização da medula óssea podem estar modificando a fisiologia da célula tronco e contribuindo para a instalação da hipotrofia medular e, ao menos em parte, sendo responsáveis pela suscetibilidade às infecções.

ABSTRACT

Protein-energy malnutrition (PEM) is the most common type of malnutrition in the world. It is usually found in children, the elderly, patients suffering from neoplasia or chronic disease, patients undergoing chemotherapy, or even under parenteral nutrition, as well as in patients under radical diets. PEM modifies both specific and non specific resistance of organisms to infectious agent, thus disease are frequently associated with protein malnutrition. The exact mechanisms underlying these findings are not clear. Severe malnutrition produces several cellular effects and the results of some studies indicate loss or reduction in cell proliferation in several organs. The elevated and constant demand of the haemopoietic tissue for protein leads to the condition that both qualitative and quantitative alterations may be found when protein malnutrition is installed. Hemopoiesis is thight regulated at several levels, including the complex structure of the hemopoietic microenvironment (HM). In this work we studied alterations in the extracelular matrix (ECM) oh the HM from undernourished mice. Male outbred Swiss mice, 2 to 3 months of age, were placed in individual "metabolic cages", and received the control diet for 14 days. After this period of adaptation, they were subsequently separated into two groups receiving either the control or the low-protein diet and water *ad libitum*. The control diet contained 20% protein and the hypoproteic only 4%. Except for the protein content, the two diets were identical and isocaloric. Mice were to experimental assays when undernourished group attained the 20-25% loss of their original body weight. Blood samples were collected via cardiac punctures, and concomitantly bone marrow cells and sternum sections were obtained to histological, imunohistological and ultrastructural studies. The expression of fibronectin and laminin were higher in undernourished mice, mainly in the endosteal area. At ultrastructural level, we observed reduction in the cellular composition with larger spaces between the cells and increase of the MEC. Alterations in the proteoglycan distribution were also seen. The microenvironmental alterations concerning to the MEC composition and of the bone marrow organization observed in this work, can be related to the modified physiology of the stem cell and can contribute to installation of the hypotrophy marrow. At least in part, these findings can be responsible for the susceptibility to infections.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nutrição e Desnutrição

A alimentação é uma necessidade primária dos seres vivos. Os alimentos constituem a principal fonte de nutrientes para a produção da energia necessária à manutenção das funções orgânicas em todos os estágios de desenvolvimento da vida, como por exemplo, formação de novas células e tecidos, manutenção de gradientes iônicos, processos de secreção e detoxificação, geração de calor e locomoção (KARLSON et al., 1982; SMITH; WILLIAMSON, 1992). A dieta adequada deve fornecer carboidratos, proteínas, lipídeos, vitaminas, sais minerais e água em quantidade suficiente para suprir as necessidades nutricionais individuais (COTRAN et al., 2000). 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 de uma determinada população e que contribuem para uma dieta inadequada (SMITH; JAMES, 1992). Dentre as alterações nutricionais que ocorrem em termos mundiais, a desnutrição é a mais freqüente. Nesta desordem, a deficiência ou ausência de um ou mais nutrientes pode ser de origem primária, decorrente de uma dieta inadequada, ou secundária a uma doença de base (BARON, 1997).

O termo desnutrição protéico-calórica (DPC) ou protéico-energética (DPE) refere-se a um conjunto de condições clínicas decorrentes da deficiência protéica e, ou calórica, que ocorrem em vários graus de severidade. Nos países em desenvolvimento a principal causa de DPE é primária, acometendo principalmente lactentes e crianças. Já nos países industrializados a DPE, geralmente é secundária, estando associada a outras doenças e acometendo tanto crianças como adultos (BARON, 1997). As manifestações clínicas da DPE dependem do grau e severidade da deficiência protéico-calórica, da causa e duração da mesma, bem como da idade do indivíduo e da associação ou não com outras doenças. As formas clínicas características são o *Kwashiorkor*, causado por carência essencialmente protéica uma vez que o aporte de carboidratos encontra-se

normal ou mesmo em excesso, e o *Marasmus*, situação decorrente da deficiência prolongada tanto de proteínas quanto de carboidratos. Quadros clínicos intermediários podem surgir pela associação de vários graus de privação proteica com diversos graus de deficiência calórica (DE ANGELIS, 1986). Estas síndromes podem cursar com retardo no crescimento, alterações psico-motoras e alterações histológicas e funcionais em diversos órgãos como coração, pulmão, fígado, rins, trato gastrointestinal, sistemas endócrino e imunológico (AUGUSTO et al., 1995; COTRAN et al., 2000; DE ANGELIS, 1986).

Alterações hematológicas quantitativas como anemia, leucopenia, linfocitopenia e neutropenia (ALVES, 1995; AUGUSTO, 1995; BARON, 1997; BORELLI et al., 1995; COTRAN et al., 2000; DE ANGELIS, 1986; GARCIA, 1992; LEE; HERBERT, 1999; MARTINS et al., 1971) são um reflexo do comprometimento dos órgãos linfo-hemopoéticos em condições de desnutrição (BORELLI et al., 1995, VITURI et al., 2000), e estão associadas a modificações da resposta imune e dessa forma, aumentando a suscetibilidade a infecções (GROSS; NEWBERNE, 1980; SCRIMSHAW, 1975; TOMKINS, 1986; VICTORIA; HERNANDEZ, 1990). A associação desnutrição-infecção é responsável pelo alto índice de morbidade e mortalidade principalmente entre as crianças (BEISEL, 1977; CHANDRA et al., 1986).

Historicamente, o termo Imunidade significa "o estado de proteção contra doenças infecciosas". Segundo Abbas et al. (1997) os processos de defesa do organismo contra o agente invasor são mediados por células e moléculas que compõem o sistema imune e que combateriam a infecção por meio de estratégias distintas. Contudo, entendemos a imunidade e a resposta inflamatória como processos fisiológicos do organismo, ou seja, os mecanismos classicamente vistos como proteção e que envolvem a resposta inespecífica e específica constituem-se em eventos interligados e capazes de modular todo o metabolismo independentemente da existência de processos lesivos e, segundo Reichelin (1993) esta modulação ocorre, provavelmente, via eixo neuro-imuno-endócrino.

1.2 Células sangüíneas, tecido hemopoético e microambiente medular

O tecido sanguíneo é constituído por três populações distintas de células que são responsáveis por funções essenciais à sobrevivência do organismo: os *eritrócitos* transportam oxigênio e gás carbônico; as *plaquetas* participam de diferentes etapas e processos da hemostasia sangüínea e os *leucócitos*, mais conhecidos pela função de proteção contra os agentes patogênicos ou estruturas reconhecidas como estranhas ou "non-self", constituem o sistema imune (ALBERTS et al., 1994). Entretanto, os leucócitos, assim como as plaquetas, apresentam múltiplas funções inclusive regulatórias. Os leucócitos constituem-se em um grupo heterogêneo de células que podem ser classificadas quanto às suas características morfológicas em três linhagens: *granulócitos* (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), *linfócitos* (células T, células B e células NK) e *monócitos*. Estas células circulam pelo corpo via sangüínea e, ou linfática, e a migração destas para os diferentes tecidos sólidos é um dos fatores fundamentais para o desenvolvimento adequado da resposta imune dos organismos vertebrados (ABBAS et al., 1997; BORELLI et al., 1995; BORELLI et al., 1998; BROWN, 1997).

Em indivíduos saudáveis, a concentração de células sangüíneas permanece relativamente constante, pois as células senescentes são removidas e constantemente substituídas por células recém-formadas de forma que, nestes indivíduos, cerca de um trilhão de células são produzidas diariamente (NARDI; ALFONSO, 1999). As células sangüíneas originam-se a partir de uma célula precursora indiferenciada e pluripotente, a célula tronco hemopoética (CTH) ou "stem cell". Esta célula caracteriza-se pela elevada capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação (ALBERTS et al., 1994; DZIERZAK et al., 1998; LEITMAN; READ, 1996).

A produção de células sangüíneas (hemopoese) é um processo complexo caracterizado pela constante produção, maturação e liberação de eritrócitos, leucócitos e plaquetas para a circulação (LEITMAN; READ,

1996). Durante a ontogenia, em mamíferos, a hemopoese ocorre em diferentes localizações anatômicas como: esplâncnopleura para-aórtica, região aorto-gônado-mesonéfrica, saco vitelino, fígado, baço, linfonodos e medula óssea (DZIERZAK et al., 1998). Em humanos, após o nascimento e por toda a vida adulta, fisiologicamente a medula óssea (MO) será o principal sítio anatômico responsável pela formação das células sangüíneas. Em algumas condições patológicas, o baço também pode atuar como órgão hemopoético (MAYANI et al., 1992). Tendo em vista que o tempo de vida das células sangüíneas na circulação é relativamente curto, e que a MO possui a capacidade de regular a produção celular, seja de uma ou de várias populações, como mecanismo de adaptação a condições fisiológicas ou patológicas (ABOUD; LICHTMAN, 1995), o tecido hemopoético caracteriza-se pela plasticidade e alta taxa de renovação celular (ALBERTS et al., 1994; NARDI; ALFONSO, 1999) e conseqüentemente, apresenta elevada exigência de nutrientes. Desta forma, podemos supor que este tecido possa ser modificado em condições de desnutrição (BORELLI et al., 1995, 2001).

Em indivíduos saudáveis, a CTH circula livremente no sangue periférico, entretanto, a hemopoese ocorre somente quando esta célula está seletivamente retida no espaço extravascular da medula óssea (BENTLEY, 1982; NILSSON et al., 2001; TAVASSOLI; MINGUELL, 1991). Neste espaço, as células hemopoéticas em maturação apresentam padrão de distribuição heterogêneo, formando regiões específicas para as diferentes linhagens (NILSSON et al., 2001). Lord e seus colaboradores mostraram que as CTH, bem como as células progenitoras comprometidas da linhagem granulocítica e eritróide apresentam distribuição espacial bem definida no eixo longitudinal do fêmur de camundongos e que esta distribuição não é um processo aleatório (LORD et al., 1975; FRASSONI et al., 1982). As CTH são encontradas, preferencialmente, na região adjacente ao osso em associação com o endóstio (GONG, 1978; NILSSON et al., 2001). Estas evidências sugerem que a medula óssea apresenta regiões microgeográficas adequadas para o desenvolvimento da hemopoese (MAYANI, 1992). Análises estruturais da medula óssea por microscopia eletrônica de

transmissão mostraram que os megacariócitos estão em contato direto com vasos, favorecendo a hipótese de que as plaquetas são liberadas diretamente na circulação (MOHANDAS; PRENANT, 1978; WEISS, 1965). A eritropoese ocorre tanto na região perivascular (WEISS, 1965) quanto na região central do espaço medular (MOHANDAS; PRENANT, 1978) e a granulopoese ocorre em regiões distantes dos vasos (MOHANDAS; PRENANT, 1978; WEISS, 1965).

Em condições fisiológicas, as células hemopoéticas estão intimamente associadas às células do estroma medular e substâncias sintetizadas por estas células, formando nichos celulares (SCHOFIELD, 1978) e que, em conjunto, compõem o microambiente hemopoético (MH). Estudos *in vitro* mostraram que as células do estroma medular podem sintetizar várias citocinas, inclusive fatores de crescimento hemopoético (FCH), e moléculas da matriz extracelular (MEC) indicando que estas células desempenham papel importante na regulação da hemopoese. (MAYANI et al., 1992).

Fazem parte da estrutura do estroma medular os diferentes tipos de células estromais: células reticulares, macrófagos, adipócitos e células endoteliais, as moléculas da MEC, os FCH, além de linfócitos T e monócitos (BENTLEY, 1982; MAYANI et al., 1992; NILSSON et al., 2001). Entre as células estromais são reconhecidos dois tipos de células reticulares: as fibroblásticas e as adventíciais. As primeiras integram os cordões hemopoéticos, emitindo extensões citoplasmáticas que envolvem as células hemopoéticas em maturação, em especial granulócitos, sugerindo uma relação funcional entre as mesmas (LA PUSHIN; TRENTIN, 1977; WESTEN; BANTON, 1979) e são os componentes principais do estroma medular. As células adventíciais situam-se ao redor dos seios venosos formando uma camada que recobre a superfície vascular e estão envolvidas na regulação da migração de células sanguíneas maduras para a circulação (MAYANI et al., 1992, WEISS, 1965). Os macrófagos são encontrados no centro das ilhas eritróides (ou eritrons) desempenhando papel importante na maturação eritróide; na região perivascular recobrimo parcialmente a superfície

endotelial dos sinusóides e de onde emitem prolongamentos citoplasmáticos que se projetam para a luz vascular englobando células senescentes ou danificadas, ou ainda, como macrófagos dispersos entre as células hemopoéticas (BESSIS; BRENTON-GORIUS, 1962; MAYANI, et al., 1992; WEISS, 1972). As células endoteliais formam a parede dos vasos e aparentemente podem controlar a migração celular através da parede vascular (TAVASSOLI; MINGUELL, 1991). O papel dos adipócitos no processo de hemopoese ainda não foi compreendido, porém podem ser considerados como reserva de lipídeos necessários para o metabolismo celular durante o processo de proliferação (NARDI; ALFONSO, 1999) e estudos *in vitro* sugerem que estas células podem produzir FCH (MAYANI et al., 1992), podendo, portanto, desempenhar papel regulador na hemopoese. Trabalhos têm mostrado que os osteoblastos podem secretar citocinas que estimulam o desenvolvimento da hemopoese e que, portanto, esta célula também pode ser considerada como membro do estroma medular (TAICHMAN et al., 1996).

Diante das evidências obtidas em estudos *in vivo* e *in vitro*, o MH apresenta-se como uma estrutura compartimentalizada, altamente organizada e dinâmica, na qual, o estroma medular, além de atuar como parênquima de sustentação para as células hemopoéticas, é absolutamente fundamental para o processo de hemopoese (Figura 1), possibilitando a proliferação, diferenciação e maturação das células precursoras (BENTLEY, 1982; LEITMAN; READ, 1996; NARDI; ALFONSO, 1999; NILSSON et al., 2001). A hemopoese é, portanto, um processo rigorosamente controlado em diferentes níveis e que depende: *(i)* da existência de células precursoras multipotentes com capacidade de auto-renovação, proliferação e diferenciação; *(ii)* da ação regulatória de fatores de crescimento e outras citocinas; *(iii)* dos componentes do microambiente medular, bem como das relações arquiteturais desse microambiente; *(iv)* da ação hormonal (estrógenos, andrógenos, hormônios tireoideanos, corticosteróides, adrenalina, etc.) e *(v)* do estado nutricional do indivíduo (ARAI et al., 1990;

ATHENS et al., 1961; BORELLI et al., 1995; CHANDRA, 1988; PETERS et al., 1972; VITURI et al., 2000; WEISS, 1972).

Microambiente hemopoético

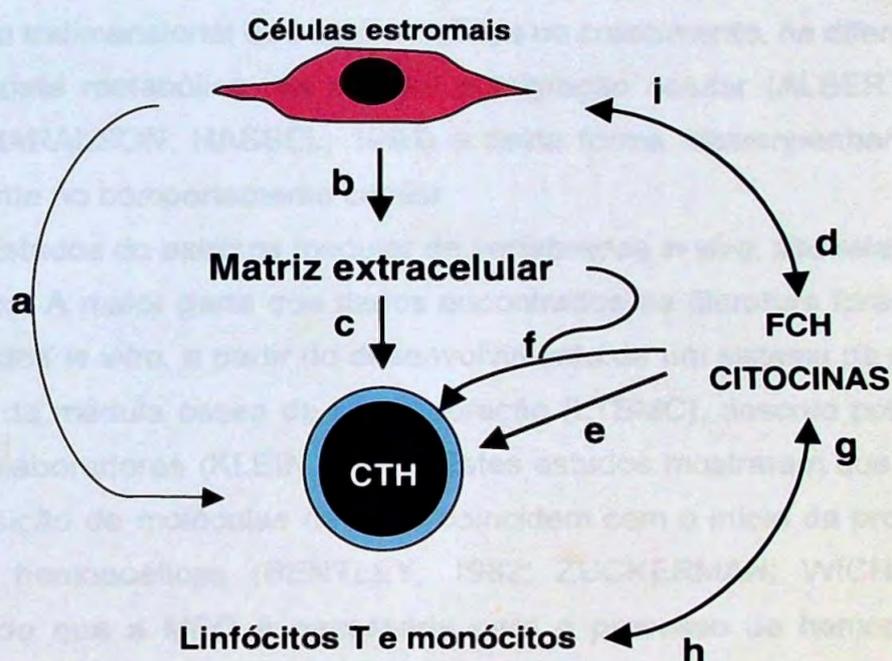


Figura 1- Microambiente hemopoético. Representação esquemática dos componentes da matriz extracelular do MH e a influência destes sobre a proliferação e diferenciação da célula tronco hemopoética (CTH). As células estromais (células reticulares, macrófagos, células endoteliais e adipócitos) estão associadas diretamente a CTH via contato direto célula-célula (a). Estas células também podem produzir moléculas que constituem a matriz extracelular (b), as quais, por sua vez, interagem com a CTH (c), e são fonte de citocinas e fatores de crescimento hemopoético (FCH) (d). Estas substâncias podem ser apresentadas diretamente a CTH (e) ou via associação com componentes da MEC (f). Linfócitos T e monócitos podem produzir citocinas e desta forma influenciar a hemopoese. As células estromais e acessórias (linfócitos T e monócitos) produzem as citocinas, mas também podem ser reguladas por estas substâncias (h,i). (Fonte: MAYANI, 1992).

1.3 Matriz Extracelular

A MEC foi inicialmente considerada como um suporte inerte e com função de estabilizar a estrutura física dos tecidos. Porém, estudos sobre a estrutura e composição da MEC têm mostrado que, além da manutenção da arquitetura tecidual, seus componentes interagem entre si para formar uma estrutura tridimensional que está envolvida no crescimento, na diferenciação, na resposta metabólica, na adesão e migração celular (ALBERTS et al., 1994; HARALSON; HASSEL, 1995) e desta forma, desempenhando papel importante no comportamento celular.

Estudos do estroma medular de vertebrados *in vivo*, são relativamente escassos. A maior parte dos dados encontrados na literatura foram obtidos de estudos *in vitro*, a partir do desenvolvimento de um sistema de cultura de células da medula óssea de longa duração (LTBMC), descrito por Dexter e seus colaboradores (KLEIN, 1995). Estes estudos mostraram que a síntese e deposição de moléculas da MEC coincidem com o início da produção de células hemopoéticas (BENTLEY, 1982; ZUCKERMAN; WICHA, 1983), sugerindo que a MEC é necessária para o processo de hemopoese. Na medula óssea, as moléculas da MEC em conjunto com as células estromais e os fatores de crescimento formam o microambiente hemopoético indutivo, cujas propriedades regulatórias são, aparentemente, determinadas por interações tipo célula-célula, célula-FCH e célula-MEC (GORDON, 1988; ROSENDAAL, KRENÁCS, 2000).

As interações diretas célula-célula podem ocorrer via moléculas de adesão celular (CAMs) ou via "gap junctions" (ROSENDAAL; KRENÁCS, 2000). Entretanto, as interações célula-MEC são mediadas por receptores da família das integrinas (KLEIN, 1995) e podem regular o comportamento celular, via sinalização celular mediada pelos receptores celulares ou modulando a resposta celular desencadeada pelos FCH (Figura 2) (STREULLI, 1999).

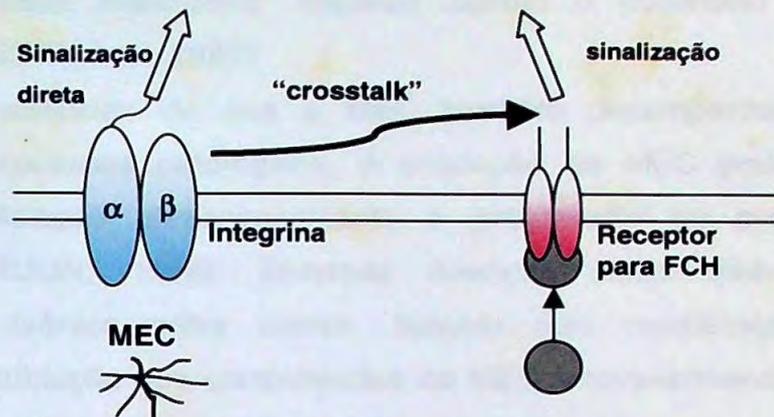


Figura 2- Influência da interação celular com a MEC. (a) Desencadeamento da sinalização celular diretamente, via receptor da família das integrinas. (b) Modulação da sinalização desencadeada pelos FCH. (Fonte: STREULI, 1999).

A proliferação e diferenciação de células progenitoras hemopoéticas pode ocorrer após estímulo pelos FCH exógenos (METCALF, 1986) ou em cultura de células estromais derivadas da medula óssea (DEXTER, 1977). Entretanto, FCH biologicamente ativos não foram detectados no sobrenadante do meio de cultura de células estromais da medula óssea (GORDON et al., 1987) sugerindo que, os FCH produzidos pelas células estromais estejam compartimentalizadas na superfície da célula ou em componentes específicos da MEC, regulando assim a hemopoese (GORDON et al. 1987; KLEIN, 1995).

De modo geral, a MEC é formada por moléculas de natureza protéica, por glicosaminoglicanos e proteoglicanos. Interações individuais entre estes elementos resultam na formação de estruturas macromoleculares complexas e, variações no tipo e quantidades relativas destes componentes conferem as propriedades físicas características dos diferentes tecidos (GORDON, 1988). Os principais tipos de moléculas da MEC da medula óssea já descritos são: (i) proteínas colagênicas: principalmente *colágeno tipo I e III* (BENTLEY et al., 1984; KLEIN, 1995) e os *tipos IV, V e VI* (FERNÁNDEZ; MINGUELL, 1996; KLEIN, 1995); (ii) proteínas não colagênicas ou adesivas: *fibronectina* (KLEIN, 1995; YOSHIKAWA, 1996), *laminina* (GU et al., 1999; KLEIN, 1995), *tenascina* (KLEIN, 1995), *hemonectina* (PETERS et al., 1990) e *trombospondina* (LONG & DIXIT, 1990) e (iii) glicosaminoglicanos/

proteoglicanos: *ácido hialurônico, heparan sulfato e condroitin sulfato* (KLEIN, 1995; OGURI et al., 1987).

Existem evidências de que a MEC também desempenha papel importante em processos patológicos. A produção de MEC pode estar envolvida na iniciação, desenvolvimento e progressão de processos neoplásicos (BRUIJN, 1988). Diversas doenças como diabetes e glomerulonefrite crônica entre outras, cursam com modificações na quantidade e distribuição dos componentes da MEC, provavelmente, como consequência de alterações na biossíntese ou no metabolismo destas substâncias (BRUIJN et al., 1988).

Modificações no microambiente medular foram observadas em diversas condições debilitantes crônicas como: anorexia nervosa, neoplasias, infecções crônicas, síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e DPE (BÖHM, 2000). O conjunto de alterações encontradas nestas doenças foi denominado degeneração gelatinosa da medula óssea e caracteriza-se pela redução no número de células hemopoéticas, atrofia das células adiposas e deposição de substância gelatinosa no espaço extracelular (BÖHM, 2000; SEN et al., 2003). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na patogênese destas alterações, bem como sobre a composição da MEC alterada.

1.3.1 Colágenos

Os colágenos fazem parte de uma grande família de proteínas cuja característica principal é a sua longa e rígida estrutura formada por 3 cadeias polipeptídicas, denominadas cadeias α , que estão organizadas em fita tripla helicoidal (ALBERTS et al., 1994; HARALSON; HASSELL, 1995). Nos organismos vertebrados foram identificados pelo menos 30 tipos de cadeias α estruturalmente e geneticamente distintas, formando 19 tipos de colágenos (ALBERTS et al., 1994; KLEIN, 1995). As moléculas de colágeno são produzidas pelos fibroblastos e os diferentes tipos de colágeno estão distribuídos em regiões específicas do organismo, conferindo aos tecidos

suas propriedades físicas características (ALBERTS et al., 1994; HARALSON; HASSELL, 1995).

Os colágenos tipo I e III podem ser produzidos, *in vitro*, por fibroblatos derivados do estroma medular (BENTLEY et al., 1982; KLEIN, 1995), e foram identificados como componentes da MEC do tecido hemopoético normal de seres humanos (BENTLEY, 1984) e de ratos (BENTLEY, 1984; HAMILTON, CAMPBELL, 1991). Em camundongos, o colágeno tipo I foi detectado, com positividade variável e apenas na região do endósteo, mas o tipo III não foi detectado no microambiente medular (NILSSON et al., 1998). A inibição da síntese de colágeno I e III, *in vitro*, resultou na supressão da proliferação e diferenciação de células progenitoras, sugerindo que o colágeno pode atuar como componente adesivo na fixação de vários tipos de células hemopoéticas ao estroma medular e, ou desempenhar um papel na organização da MEC (FERNÁNDEZ; MINGUELL, 1996).

O colágeno IV, sintetizado pelas células endoteliais (ZUCKERMAN; WICHA, 1983), foi detectado, principalmente, como componente da membrana basal dos vasos sangüíneos (NILSSON et al., 1998). Assim como o colágeno I, quantidades variáveis de colágeno IV foram detectadas na região do endósteo da medula óssea de camundongos (NILSSON et al., 1998), região de alta afinidade para as células-tronco hemopoéticas. Em condições fisiológicas, o colágeno IV não apresenta propriedades adesivas para as células hemopoéticas, mas na leucemia mielóide crônica, as células progenitoras aderem a este tipo de colágeno (KLEIN, 1995).

As células estromais derivadas da medula óssea de seres humanos podem sintetizar moléculas de colágeno tipo V (KLEIN, 1995) e tipo VI (KLEIN et al., 1995; WILKINS; JONES, 1995). Análise funcional da molécula de colágeno VI mostrou que este tipo de colágeno apresenta-se como substrato adesivo para vários tipos de células hemopoéticas.

Estes dados indicam que o colágeno pode ter um papel importante na regulação da hemopoese *in vivo*, entretanto, existe pouca informação sobre a estrutura e regulação de síntese dos diferentes tipos de colágeno presentes na medula óssea.

1.3.2 Fibronectina

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína adesiva que está presente nos líquidos corporais na forma solúvel e na matriz extracelular na forma insolúvel (ALBERTS et al., 1994). A FN pode ser sintetizada pela maioria das células de origem mesenquimal e pelas células epiteliais (HARALSON; HASSEL, 1995) e está presente em vários tecidos do organismo, desempenhando papel importante em processos fisiológicos, tais como embriogênese, reparação tecidual e homeostasia (POTTS; CAMPBELL, 1994). Estruturalmente, a FN é composta de duas cadeias peptídicas idênticas unidas por pontes dissulfeto na região próxima à extremidade carboxi-terminal (Figura 3). Cada monômero apresenta peso molecular de aproximadamente 220-250 kDa (HARALSON; HASSEL, 1995; POTTS; CAMPBELL, 1994), sendo composto de 3 tipos de sub-unidades modulares de proteínas (tipo F1, F2 e F3 ou Fn1, Fn2 e Fn3, respectivamente). Estes módulos estão organizados em domínios funcionais (Figura 3), que são resistentes à ação proteolítica e apresentam sítios de ligação para outros componentes da MEC, tais como colágeno, trombospondina e glicosaminoglicanos (heparina e condroitin sulfato), para receptores da superfície celular e para proteínas plasmáticas, tais como a fibrina (POTTS; CAMPBELL, 1994 e 1996). Estes domínios estão quimicamente relacionados com as diferentes funções biológicas da fibronectina, as quais incluem, a regulação do crescimento, da diferenciação, da forma e da migração celular, bem como da sua interação com outros componentes da MEC (HARALSON; HASSEL, 1995).

O módulo ¹⁰F3 contém a seqüência RGD (Arg-Gly-Asp) que está envolvida na interação entre as células e a molécula de fibronectina, via receptores da família das integrinas (POTTS; CAMPBELL, 1994 e 1996). Este módulo exerce apenas uma atividade adesiva parcial e sítios sinérgicos presentes nos módulos ⁸F3 e ⁹F3 também estão envolvidos na interação entre as integrinas e a FN (POTTS; CAMPBELL, 1996).

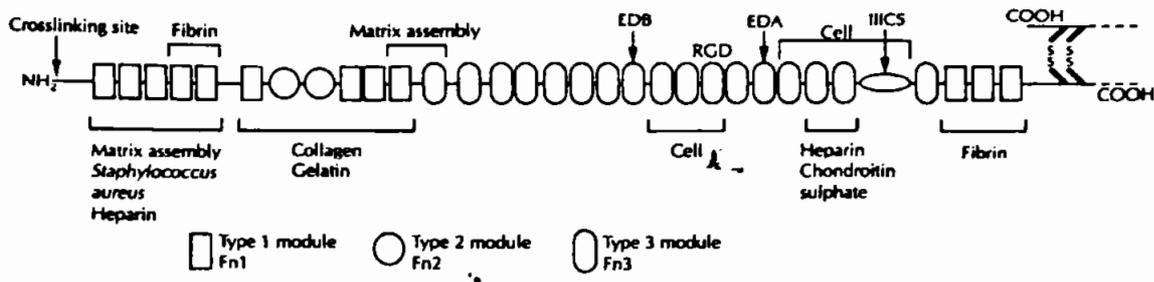


Figura 3- Estrutura modular da molécula de fibronectina mostrando a posição dos módulos F1, F2 e F3, as regiões ED-A, ED-B e III-CS, a seqüência RGD envolvida na interação com receptores da família das integrinas presente no módulo ¹⁰F3 e os demais domínios de ligação desta molécula (Fonte: POTTS; CAMPBELL, 1994).

Em condições fisiológicas, a FN foi identificada na medula óssea, *in situ* (BENTLEY et al., 1984; HAMILTON; CAMPBELL, 1991; NILSSON et al., 1998) e está envolvida na adesão e maturação de células da linhagem eritróide, adesão de precursores linfóides bem como de células progenitoras hemopoéticas multipotentes (KLEIN, 1995), e pode modular negativamente a hemopoese inibindo a proliferação de células mielóides induzida pelo GM-CSF ou pelo "stem cell factor" (KLEIN, 1995).

As células precursoras eritróides (BFU-E e CFU-E) ligam-se a superfícies cobertas com FN. Estas células expressam uma proteína de 140 kDa que foi identificada como receptor de adesão da superfamília da integrinas determinando sua ancoragem à matriz (GORDON, 1988). Existem evidências de que a diferenciação dos progenitores eritróides depende do contato com a FN (PATEL; LODISH, 1987 em GORDON, 1988). Durante o desenvolvimento eritróide a expressão de integrinas para FN é perdida na fase de exonucleação das células, resultando em perda da adesão celular ao estroma (CLARK et al., 1992; TAVASSOLI; MINGUELL, 1991). Os progenitores granulocíticos, por sua vez, apresentam menor tendência de ligação com a FN (GORDON, 1988).

Alterações na quantidade e na distribuição tecidual de FN podem desempenhar papel importante no desenvolvimento dos mecanismos etiopatogênicos de diversas condições patológicas.

1.3.3 Laminina

A laminina (LN) é uma glicoproteína extracelular composta de 3 tipos de cadeias polipeptídicas denominadas α (400kDa), β (230kDa) e γ (220kDa), unidas por pontes dissulfeto e organizadas em forma de cruz assimétrica (ALBERTS et al., 1994; ENGVALL; WEWER, 1996; HARALSON; HASSEL, 1995). As subunidades de LN são constituídas de módulos específicos, organizados em domínios (Figura 4) com funções autônomas (ENGVALL; WEWER, 1996). Em mamíferos, já foram descritas doze isoformas de lamininas (LN1-LN12), as quais se formam a partir da associação de 11 tipos de cadeias geneticamente distintas, $\alpha 1-\alpha 5$, $\beta 1-\beta 3$ e $\gamma 1-\gamma 3$ (SILER et al, 2000).

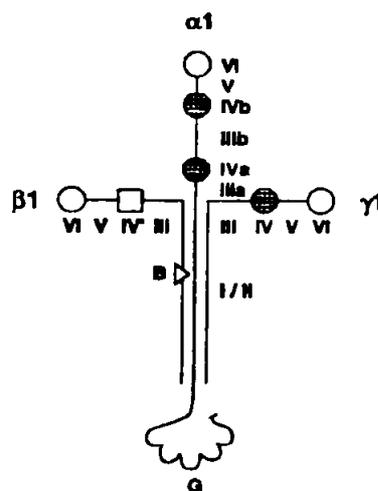


Figura 4- Representação esquemática da molécula de laminina. As subunidades α , β e γ apresentam domínios globulares e em forma de bastão indicados pelos algarismos romanos. A cadeia α , apresenta um domínio extra na região carboxiterminal (G), e domínio B está presente apenas na cadeia β (Fonte: ENGVALL; WEWER, 1996).

A LN1 ($\alpha 1$, $\beta 1$, $\gamma 1$), isolada de tumor murino, foi a primeira isoforma a ser caracterizada (EKBLUM, 1996) e a sua expressão está restrita a membrana basal. Porém, as outras isoformas de laminina apresentam distribuição muito mais ampla (SILER et al., 2000). As lamininas podem ser sintetizadas pelas células epiteliais, células endoteliais, células musculares,

fibroblastos, células leucêmicas com capacidade de diferenciação em eritrócitos e megacariócitos (GEBERHIWOT et al., 2000), entre outras. A expressão das várias isoformas, particularmente da cadeia α , é específica para o tipo celular e tecido (MINER et al. 1997), e apresentam funções estruturais, de adesão e sinalização celulares, modulando o comportamento celular, particularmente a diferenciação e a migração celular pela interação com receptores da superfície celular (GEBERHIWOT et al., 2000; KOCH et al., 1999). As interações celulares com as lamininas ainda não foram completamente caracterizadas, mas pelo menos parcialmente, as atividades exercidas pela laminina resultam da interação de domínios específicos com as integrinas. Estudos *in vitro* mostraram que as lamininas apresentam variações na especificidade de ligação a receptores celulares indicando que as diferentes isoformas são funcionalmente distintas (GU et al., 1999; SILER et al., 2000). Diversos receptores da superfamília das integrinas ($\alpha1\beta1$, $\alpha2\beta1$, $\alpha3\beta1$, $\alpha6\beta1$, $\alpha6\beta4$, $\alpha7\beta1$, $\alpha9\beta1$, $\alpha v\beta3$) ligam-se às diferentes isoformas de LN com diferentes graus de afinidade (GU et al., 1999).

As lamininas são encontradas na matriz extracelular do MH produzido em cultura de células hematopoéticas (ZUCKERMAN; WICHA, 1983), e sua expressão na medula óssea de camundongos é intensa nos sinusóides e arteríolas, pequena na região central e no endóstio (NILSSON et al., 1998). Gu et al. (1999) sugerem que as isoformas expressas na medula óssea de camundongos são: LN-2 ($\alpha2$, $\beta1$, $\gamma1$), LN-8 ($\alpha4$, $\beta1$, $\gamma1$) e LN-10 ($\alpha5$, $\beta1$, $\gamma1$) e que a LN-1 não é expressa neste tecido.

Células sangüíneas de diversas linhagens interagem com a laminina, *in vitro*, e esta adesão pode ter influencia na proliferação, maturação e sobrevivência destas células (GU et al., 1999). Porém, suas funções na medula óssea ainda não estão completamente esclarecidas.

1.3.4 Glicosaminoglicanos e Proteoglicanos

A superfamília dos proteoglicanos (PGs) é formada por mais de 30 tipos de moléculas (IOZZO, 1998) que diferem quanto ao peso molecular, composição e função biológica (KOLSET; GALLAGHER, 1990). As moléculas de PGs são constituídas por um eixo protéico ao qual ligam-se, covalentemente, um ou mais tipos de cadeias de glicosaminoglicanos (GAGs). Estes, por sua vez, são constituídos de unidades dissacarídicas que se repetem formando longas cadeias, não ramificadas e negativamente carregadas (ALBERTS, et al., 1994; KOLSET; GALLAGHER, 1990; MAYANI, 1995). Os quatro principais grupos de GAGs: (i) ácido hialurônico (AH), (ii) condroitin sulfato (CS) e dermatan sulfato, (iii) heparan sulfato (HS) e heparina, (iv) queratan sulfato, diferem entre si quanto aos resíduos de açúcar das unidades dissacarídicas, pelo tipo de ligação entre seus resíduos, e quanto ao número e localização dos grupos sulfato. Com exceção do ácido hialurônico, todos os demais podem se associar a proteínas formando os proteoglicanos (KOLSET; GALLAGHER, 1990).

Em mamíferos, os PGs são sintetizados por todos os tipos de células (KOLSET; GALLAGHER, 1990), inclusive células do tecido hemopoético (KLEIN, 1995; MINGUELL; TAVASSOLI, 1989). Os PGs são encontrados na superfície de praticamente todos os tipos celulares, onde atuam, juntamente com as integrinas, como receptores para colágeno, fibronectina e fator de crescimento fibroblástico (FCF) e fator transformante do crescimento (TGF- β) (ALBERTS et al., 1994), ou são secretadas para formar a MEC, desempenhando papel importante nas interações célula-célula e entre as células e o microambiente (KOLSET; GALLAGHER, 1990).

Os PGs heparan sulfato (HS-PG), dermatan sulfato (DS-PG) e condroitin sulfato (CS-PG), bem como ácido hialurônico são sintetizados tanto pelas células hemopoéticas (MINGUELL; TAVASSOLI, 1989) quanto pelas células do estroma medular (KLEIN, 1995) e existem evidências de que estas moléculas são importante na regulação da hemopoese.

Os mecanismos de ação dos PG no controle da hemopoese ainda não estão completamente compreendidos, mas existem evidências de que os PG do estroma medular estão envolvidos no estabelecimento e reorganização da MEC devido a interações com outros componentes da MEC, na adesão celular, no controle da proliferação e diferenciação das células hemopoéticas, bem como na apresentação de FCH a estas células.

Gordon et al. (1988) mostraram que o HS-PG liberado no meio de cultura de células de longa duração está envolvido nas interações adesivas dos progenitores hemopoéticos. Alterações no conteúdo e distribuição de cadeias de GAGs resultam na liberação de precursores mielóides do espaço medular (TAVASSOLI; MINGUEL, 1991).

As células estromais produzem citocinas, constitutivamente ou após estimulação. Gordon et al. (1987) sugerem que uma das funções dos GAGs da matriz extracelular da medula óssea possa ser a compartimentalização das citocinas produzidas localmente e a apresentação destas citocinas às células progenitoras hematopoéticas. A Interleucina 3 (IL-3) e o fator de crescimento hemopoético – granulocítico e monocítico (FCH-GM) ligam-se ao HS-PG, e assim podem ser apresentados, na sua forma biologicamente ativa, às células hemopoéticas (DRZENIEK et al. 1999; GORDON, 1987).

As células hemopoéticas precursoras sintetizam CS-PG que podem ser armazenados na forma de grânulos secretores ou se associar à membrana citoplasmática. A presença CS-PG na superfície de células precursoras está envolvida na interação adesiva destas células com as células estromais (MINGUELL; TAVASSOLI, 1989). O PG associado à membrana interage com o domínio de ligação de heparina da molécula de fibronectina (CONGET; MINGUELL, 1994). A FN é considerada como principal componente da adesão celular, entretanto, as interações adesivas dos progenitores hemopoéticos com a FN são, parcialmente mediadas por CS-PG associado à membrana citoplasmática (TAVASSOLI; MINGUELL, 1991).

Khaldoyanidi et al. (1999) relataram o efeito, *in vitro*, do ácido hialurônico no controle da hemopoese. A adição de AH em sistema de

cultura de células de medula óssea de longa duração estimulou a produção de células mielóides e linfóides. O AH pode ativar a cascata de sinais de transdução e induzir a síntese de IL-1 β e IL-6, importantes na regulação da hemopoese. Este GAG liga-se a FCH produzidos localmente, como o GM-CSF, induzindo a atividade proliferativa e maturativa local (GORDON et al., 1987).

A distribuição dos componentes da MEC induziu a hipótese da existência dos nichos hematopoéticos, em especial nas proximidades do endóstio, onde a associação entre os componentes microambientais e as células-tronco viabiliza a atividade hemopoética (SCHOFIELD, 1978; TAICHMAN et al., 1996).

1.4 Hemopoese e Desnutrição

A desnutrição protéica modifica o microambiente hemopoético, conduzindo a hipotrofia da medula óssea e, conseqüentemente, reduzindo a produção de células sanguíneas (BORELLI et al., 1995; GARCIA, 1992; ORTIZ; BETANCOURT, 1984). Alterações estruturais em órgãos linfóides e em áreas timo-dependentes (MUNOZ et al., 1981; XAVIER, 1999) assim como modificações na resposta imune específica e inespecífica do organismo frente a agentes infecciosos (CHANDRA, 1991; GARCIA; BARBIERI, 1986; GROSS; NEWBERNE, 1980; REDMOND et al., 1991) também são observadas em condições de desnutrição protéica. Contudo, os mecanismos exatos que afetam os processos de defesa do organismo ainda não estão totalmente esclarecidos (CHANDRA, 1991).

A literatura é controversa sobre os efeitos da desnutrição na fagocitose, existindo relatos tanto de comprometimento da fagocitose, do consumo de oxigênio e do "burst" respiratório (BELGHITI et al., 1983; BORELLI; NARDINELLI, 2001; SOUZA et al., 2001; REDMOND et al., 1991), como relatos em que essas funções encontram-se normais (DOUGLAS; SCHOPFER, 1974; NAUSEEF et al., 1983; SCHOPFER; DOUGLAS, 1976). Algumas dessas divergências devem-se a utilização de diferentes espécies

de animais, variação na idade dos mesmos, no tipo e intensidade do processo de desnutrição utilizado (BORELLI; NARDINELLI, 2001).

A desnutrição severa produz efeitos celulares e alguns resultados experimentais indicam perda ou redução da 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 óssea. Chandra (1977) encontrou, em crianças desnutridas, diminuição da transformação blástica de linfócitos frente a mitógenos. Foi reportado que as células da medula óssea e do baço de camundongos desnutridos apresentam diminuição na capacidade proliferativa, prolongamento no tempo de proliferação celular e ainda, redução no número de células multipotentes (FRIED, 1978). Alguns trabalhos têm demonstrado que a desnutrição afeta a proliferação e cinética de diferentes linhagens celulares. A recaptação de ferro e a utilização de ferro marcado pelos eritrócitos estão reduzidas, indicando depressão da proliferação do setor eritróide (SINGHAL et al., 1981), o número de CTH apresenta-se reduzido em ratos (DEO et al., 1975) e há alterações na dinâmica da população destas células na medula óssea e baço de camundongos (BELL et al., 1976). Alterações da capacidade proliferativa de linfócitos decorrentes da desnutrição protéica já foram estabelecidas (ORTIZ et al., 1995). Segundo Suda et al. (1976) e Fried et al. (1978), a produção de células mielóides encontra-se comprometida. Borsato (1999) relatou a redução do número de unidade formadora de colônia grânulo-monocítica (CFU-GM) em cultura de progenitores hematopoéticos obtidos da medula óssea de camundongos desnutridos.

Sabe-se que a proliferação e diferenciação de células progenitoras hemopoéticas, ao menos *in vitro*, assim como a sobrevivência das mesmas é induzida por um grupo heterogêneo de glicoproteínas denominadas citocinas (ARAI et al., 1990). Algumas exercem efeito ativador e, ou de proliferação como por exemplo, FCH-GM, enquanto outras, aparentemente, apresentam efeito inibitório sobre a proliferação hemopoética (fator de necrose tumoral α , fator transformante do crescimento β , interferon γ) (ARAI et al., 1990). As citocinas podem, *in vitro*, ser produzidas por diversos componentes do

microambiente hemopoético e exercem seu efeito por meio de ligação a receptores específicos associados à membrana celular (ARAI et al., 1990). A redução da concentração de IL-1 α (BHASKARAM; SIVAKUMAY, 1986; DRABIK et al., 1987; KEENAN et al., 1982) e de IL-2 (CHANDRA; CHANDRA, 1986) foi relatada em algumas situações de desnutrição, podendo ser um dos mecanismos envolvidos na imunodepressão desta condição (KLASSING, 1988). Entretanto, estes achados não foram confirmados por Bradley et al. (1990) que encontraram concentrações normais tanto de IL-1 α quanto de Fator de Necrose Tumoral- α em mulheres desnutridas. Dados preliminares obtidos neste laboratório evidenciaram a redução da produção dessas citocinas em camundongos desnutridos.

BORELLI et al. (1995), em modelo de desnutrição experimental encontraram hipotrofia de medula óssea e retardo na mobilização de células inflamatórias frente a implante de lamínulas em tecido subcutâneo de camundongos e levantaram hipóteses em relação às alterações do microambiente hemopoético, sugerindo possíveis modificações na adesão, migração e liberação de células da medula óssea para o sangue periférico e para os tecidos em função da desnutrição (BORELLI et al., 1998; BORELLI; NARDINELLI, 2001; SOUZA et al., 2001).

Nos últimos dez anos evidenciou-se a importância do estroma e da matriz extracelular tanto no controle da proliferação e da diferenciação celular (MACKAY & IMHOF, 1993) quanto na migração de células do sistema imune (BROWN, 1997). Alterações na celularidade e na arquitetura da medula óssea (BORELLI et al., 1995), bem como alterações na composição da MEC (XAVIER, 1999; VITURI et al., 2000) em condições de desnutrição protéica, sugerem que o comprometimento do microambiente medular apresenta-se como um aspecto importante da desnutrição, podendo ser relevante clinicamente, especialmente em indivíduos a serem submetidos a transplante de medula óssea e ainda, em pacientes sob quimioterapia. Alterações na produção e, ou distribuição de componentes da MEC dos órgãos linfo-hematopoéticos, particularmente do timo foram

evidenciadas por diferentes autores (BORELLI et al., 1995; LYRA et al., 1993; XAVIER, 1999).

Considerando que as moléculas da MEC participam ativamente do controle e modulação da hemopoese e que alterações qualitativas ou quantitativas das mesmas podem resultar em desequilíbrio do sistema hematopoético, a compreensão da natureza das alterações dos órgãos linfo-hemopoéticos em consequência da deficiência protéico-calórica pode ser relevante, não só devido ao alto índice de incidência desta síndrome em função de problemas sócio-econômicos, mas também em situações de desnutrição associadas às doenças neoplásicas, quimioterapia, anorexia nervosa, SIDA e doenças crônicas.

Assim, a presença de modificações arquiteturais da medula óssea e do baço observadas em nosso laboratório (BORELLI et al.1995; VITURI et al. 2000; XAVIER; 1999) e as escassas informações sobre as alterações qualitativas e quantitativas na MEC de medula óssea, em situações de desnutrição, motivaram a elaboração deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo caracterizar, in situ, as alterações na MEC da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Avaliação da distribuição de fibronectina e de laminina presentes na matriz extracelular, utilizando técnicas de imuno-histoquímica em microscopia óptica.

2.2.2 Avaliação ultra-estrutural da medula óssea, para identificação de proteoglicanos sulfatados presentes na matriz extracelular de camundongos, utilizando técnica citoquímica em microscopia eletrônica de transmissão.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

O presente trabalho utilizou camundongos Swiss Webster (*Mus domesticus*) machos, de 2 a 3 meses de idade, provenientes de colônias mantidas no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF) da Universidade de São Paulo (USP). Os animais foram alocados em gaioleiro metabólico. Os animais tiveram livre acesso à água e às rações tanto no período de adaptação quanto na indução da desnutrição, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais, com temperatura de 22-25°C e sob ciclo de luz (claro-escuro) de 12 horas.

3.2 Rações

Foram utilizadas duas formulações de ração, as quais diferiram entre si apenas na concentração protéica. A ração basal ou controle (Tabela 1 – ração I), contendo 20% de proteína (BORELLI et al., 1995 e 1998; BORELLI; NARDINELLI, 2001; FRIED, 1978) foi destinada a alimentar os animais do grupo controle e a ração hipoprotéica (Tabela 1 – ração II), contendo 4% de proteína (BORELLI et al., 1995 e 1998; BORELLI; NARDINELLI, 2001; FRIED, 1978; MUÑOZ, et al., 1981) foi destinada à alimentação do grupo desnutrido.

Ambas as rações eram isocalóricas e foram produzidas na forma de granulado. Utilizamos como fonte protéica a caseína (IKAB Chemical B.V., Germany), proteína de alto valor biológico. As misturas salínica e vitamínica empregadas foram elaboradas segundo as recomendações da AIN-93 (REEVES et al., 1993). O amido (Maizena[®]) e o óleo de milho (Mazzola[®]), ambos da Refinação de Milho Brasil, foram adquiridos de lotes comerciais. As rações foram conservadas a -4°C até o momento do uso.

TABELA 1- Composição percentual das rações

COMPONENTES	RAÇÃO I (Normoprotéica)	RAÇÃO II (Hipoprotéica)
PROTEÍNA	20	4
MISTURA SALÍNICA	4	4
MISTURA VITAMÍNICA	1	1
SACAROSE	10	10
ÓLEO DE MILHO	8	8
FIBRA (CELULOSE)	1	1
AMIDO Q.S.P.	100	100

Mistura salínica: Carbonato de cálcio anidro* 357,0g; Fosfato de potássio monobásico* 250,0g; Cloreto de sódio* 74,0g; Sulfato de potássio* 46,4g; Citrato de potássio tripotássico monohidratado* 28,0g; Óxido de magnésio* 24,0g; citrato férrico* 6,06g; Carbonato de zinco* 1,65g; Carbonato manganoso* 0,63g; Carbonato cúprico* 0,30g; Iodato de potássio* 0,01g; Selenato de sódio anidro* 0,1025g; Paramolibdato de amônio tetra hidratado* 0,00795g; Metassilicato de sódio nona hidratado* 1,45g; Sulfato de crômio e potássio doceca hidratado* 0,275g; Ácido bórico* 0,0815g; Fluoreto de sódio* 0,0635g; Carbonato de níquel* 0,0318g; Cloreto de lítio* 0,0174g; Vanadato de amônio* 0,0066g; Sacarose* em pó 209,806g.

Mistura vitamínica: Ácido nicotínico* 3,0g; D-Pantotenato de cálcio** 1,6g; Cloridrato de piridoxina* 0,7g; Cloridrato de Tiamina* 0,6g; Riboflavina** 0,6g; Ácido fólico** 0,2g; D-biotina** 0,02g; Vitamina B₁₂** 2,5g; Vitamina E* 7500 U; Vitamina A** 400.000 U; Vitamina D3* 100.000U; Vitamina K* 0,075g; Sacarose q.s.p. 1000g.

*Merck Chemical S.A.

**Sigma Chemical Company

3.3 Processo de Desnutrição

Os animais foram alocados, aleatoriamente, em gaiolas metabólicas. Inicialmente, foram submetidos a um período de adaptação às novas condições ambientais, com ciclo de luz de 12 horas (GARCIA, 1992; BORELLI et al, 1995). Durante este período os animais receberam *ad libitum*, água e ração comercial (Guabi) até a estabilização do peso corpóreo, sendo pesados, em balança semi-analítica, a intervalos de 48 horas. Após este período, os animais foram separados em dois grupos. O grupo nutrido ou controle (C) passou a receber a ração I (basal) e o grupo desnutrido (D) foi alimentado com a ração II (hipoprotéica). Durante todo o experimento os animais permaneceram sob as mesmas condições ambientais do período de adaptação, recebendo água e as respectivas rações *ad libitum*. As determinações do peso corporal, bem como o consumo de ração, foram realizadas a intervalos de 48 horas.

3.4 Avaliação da concentração de proteínas e lípidos, e do teor de umidade das rações

A determinação da concentração protéica das rações foi realizada pelo método de micro-Kjedahl. A concentração e lípidos e o teor de umidade foram determinados segundo as normas do INSTITUTO ADOLFO LUTZ (1967). As análises foram realizadas no Laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêutica – USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Silvia Cozzolino.

3.5 Avaliação do estado nutricional dos animais

O estado nutricional dos animais foi definido pela curva de peso corpóreo, consumo de ração, e determinação das concentrações de albumina e proteínas totais. A coleta dos diferentes materiais biológicos

utilizados neste trabalho foi realizada quando os animais do grupo desnutrido perderam cerca de 25% do peso corpóreo inicial.

3.5.1 Determinação de proteínas plasmáticas

Para a coleta de sangue os camundongos foram anestesiados com 10 mg/kg de peso, de cloridrato de xilazina (Rompum[®], Bayer) e 100 mg/Kg de peso de cloridrato de cetamina (Cristália). Com o animal sedado, foi realizada a secção cutânea estendendo-se da região torácica até a pubiana, permitindo, dessa maneira a visualização dos órgãos cavitários tanto abdominais como torácicos. Uma alíquota de sangue, colhido por punção cardíaca, foi colocada em frasco contendo 50 UI/mL de heparina (Liquemine[®]). Posteriormente o sangue foi centrifugado a 950g durante 10 minutos. O plasma foi separado e mantido a -40°C até o momento da determinação de proteínas totais pelo método do Biureto (GORNALL, 1949) e de albumina pelo método do Verde de Bromo Cresol (RODKEY, 1965). As determinações foram realizadas em duplicata em analisador bioquímico automatizado COBAS MIRA PLUS (ROCHE).

3.6 Avaliação hematológica do sangue periférico

Alíquota de sangue foi obtida conforme o procedimento descrito no item 3.5.1, porém utilizando-se EDTA 10% como anticoagulante na proporção de 1,5 mg/mL de sangue. Extensões sangüíneas foram confeccionadas imediatamente após a coleta e posteriormente coradas pelo método de May-Grunwald-Giemsa (MGG), modificado (ROSENFELD, 1947) e analisadas ao microscópio óptico para a contagem diferencial de leucócitos e análise morfológica. As determinações do volume hematócrito (método de Strumia), concentração de hemoglobina (método da cianometahemoglobina), contagem de hemácias e leucócitos totais (contagem direta em hemocitômetro), e a contagem de reticulócitos (coloração supravital com azul de cresil brilhante) foram realizados conforme

as técnicas preconizadas por Morris; Davey (1996) e padronizadas pela Disciplina de Hematologia Clínica – FCF/USP.

3.7 Avaliação da celularidade medular

Após a coleta de sangue o animal, ainda sedado, foi sacrificado por exsanguinação, seguida por deslocamento cervical. Realizamos análise macroscópica das cavidades abdominal e torácica, para a detecção de eventuais lesões. O esterno foi retirado para avaliação histomorfométrica e o fêmur para obtenção de células da medula óssea para realização do mielograma.

3.7.1 Mielograma

Para avaliar a celularidade da medula óssea, a cavidade femoral de animais dos grupos controle e desnutrido foram lavadas com solução tampão fosfato pH 7,4 contendo 50 UI/mL de heparina (Liquemine®). A suspensão celular foi colocada em tubos plásticos e homogeneizada com auxílio de pipeta tipo Pasteur. A contagem global das células nucleadas foi realizada em hemocitômetro, a partir de alíquota da suspensão celular diluída 1:20 em meio McCoy's. As contagens foram realizadas em duplicata. Alíquotas da suspensão celular, contendo cerca de 10^6 células/mL, foram citocentrifugadas a 200xg por 5 minutos e a morfologia celular foi avaliada após coloração pelo método de MGG modificado (ROSENFELD, 1947) e da peroxidase pelo método de Graham modificado. A classificação das diferentes etapas de maturação da linhagem granulocítica foi baseada no padrão de cromatina nuclear, na presença ou não de nucléolos, na relação núcleo-citoplasma, no diâmetro e segmentação do núcleo (BORELLI et al., 1995). Assim, foram consideradas quatro etapas maturativas: Blastos – envolvendo o hemocitoblasto e o mieloblasto; formas jovens – englobando as etapas de promielócito e mielócito; formas em anel – correspondentes ao

metamielócito e ao bastonete e, segmentado – envolvendo as formas segmentadas apresentando pelo menos dois lóbulos nucleares.

3.7.2 Avaliação histomorfométrica da celularidade medular

Para a avaliação morfométrica da medula óssea, os esternos obtidos dos camundongos, tanto do grupo controle quanto do grupo desnutrido, foram fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas, descalcificados em EDTA 10% por 7 dias, e incluídos em parafina seguindo o processamento histológico convencional. As análises morfométricas foram realizadas no sistema de análise de imagens computadorizado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. As imagens de cortes histológicos de esterno, com aproximadamente 5 μm de espessura e corados pela HE, foram obtidas a partir de microscópio (Olympus BX50) acoplado a uma câmara de captura de imagem colorida (Sony CCD-Iris) e digitalizadas no formato TIFF “true color” 24 bits ou JPEG em computador Pentium utilizando o programa Image-Pro Plus versão 3.0 (Media Cybernetics). A celularidade total da medula óssea esternal foi determinada pela quantificação da área ocupada pelas células (marcação das áreas coradas) em relação à área livre (não corada) utilizando a opção “segmentação de cor” a partir do “menu” “medida – contagem / tamanho” do programa Image-Pro Plus (Anexo 2). Para cada animal foram analisados 10 campos, sendo 5 na região do endóstio e 5 na região central do corte histológico, utilizando-se a objetiva com aumento de 40x e ocular de 10x. Os campos foram selecionados aleatoriamente, excluindo-se aqueles em que havia presença de artefatos decorrentes do processamento histológico.

3.8 Distribuição da MEC da medula óssea de camundongos

A avaliação histológica e imuno-histoquímica da matriz extracelular da medula óssea foi realizada em esternos obtidos de camundongos, tanto do grupo controle quanto do grupo desnutrido, fixados em formalina tamponada 10% durante uma hora, descalcificados em solução de ácido nítrico 5% por 3 horas e incluídos em parafina seguindo o processamento histológico convencional.

A avaliação histológica foi realizada em lâminas contendo cortes de aproximadamente 5 μ m, corados pelo seguintes métodos: Hematoxilina e Eosina (HE), Reação do ácido periódico de Schiff (PAS), Azul de Alcian, pH 2,5, e Tricrômico de Masson, seguindo-se os procedimentos histológicos rotineiros. Estas colorações foram realizadas no Laboratório Histotech – Lâminas Didáticas Ltda –ME, sob a responsabilidade de Cláudio Arroio.

A marcação imuno-histoquímica das proteínas adesivas, fibronectina e laminina, foi realizada segundo a metodologia proposta por Hsu (1981).

3.8.1 Avaliação imuno-histoquímica de Fibronectina e Laminina da matriz extracelular da medula óssea

Os anticorpos primários, produzidos em coelho, anti-fibronectina humana (DAKO A-0245) e anti-laminina humana (DAKO Z-0097) foram diluídos na proporção de 1:400 e 1:25, respectivamente, em solução tampão fosfato (PBS) 0,02M, pH 7,2 contendo 0,1% de albumina bovina fração V (SIGMA) e 0,2% de azida sódica (Anexo 1.3.3).

Após desparafinização e hidratação (Anexo 1.2.3), os cortes histológicos foram submetidos à etapa de bloqueio da peroxidase endógena com solução de água oxigenada 3% por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, foram cobertos com 50 μ L do respectivo anticorpo primário diluído e incubados em câmara úmida, por cerca de 12 horas a 4°C. A amplificação da reação foi realizada utilizando-se o sistema

de detecção StreptABCompelx-HRP Duet (DAKO K0942). Nesta etapa, os cortes foram incubados com o anticorpo biotilado para imunoglobulina de coelho e camundongo (reagente C) diluído 1:100 em tampão PBS 0,02M (pH 7,2), durante 30 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente. A seguir foram incubados com solução contendo streptavidina (reagente A) e peroxidase (reagente B) diluídos 1:100 em tampão PBS 0,02M (pH 7,2), durante 30 minutos, em câmara úmida e temperatura ambiente. A reação foi visualizada pela aplicação de solução de 3,3 diaminobenzidina (Sigma D-5637) 0,05% em tampão PBS 0,02M (pH 7,2) contendo água oxigenada, grau analítico (Readel de Haën) 0,045%, que foi preparada no momento do uso. Todas as etapas acima foram intercaladas por duas lavagens, de 5 minutos cada, com tampão PBS pH 7,2. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harys, desidratadas em soluções com concentração crescente de etanol, grau analítico (Merck) e montadas com Entelan[®] (Merck). Controles negativos foram incluídos em todos os experimentos e foram obtidos pela omissão do anticorpo na etapa de incubação com anticorpo primário.

3.9 Avaliação citoquímica ultra-estrutural para identificação de proteoglicanos da MEC da medula óssea de camundongos

3.9.1 Processamento das amostras

A identificação ultra-estrutural de proteoglicanos presentes na matriz extracelular da medula óssea foi realizada a partir de esternos, obtidos de camundongos dos grupos controle e desnutrido, conforme descrito no item 3.7. Os fragmentos ósseos com cerca de 1 a 2 mm, já sem camada muscular, foram fixados imediatamente após a coleta. Para cada animal foram obtidos dois fragmentos, dos quais um foi colocado em 5,0 mL de solução fixadora (glutaraldeído 2% e formaldeído 2,4%, diluídos em tampão cacodilato 0,1M e pH 7,4) e o outro em solução fixadora acrescida de 0,2%

de vermelho de rutênio (SIGMA), por um período de 6 horas em temperatura entre 22-25°C, sob agitação lenta (± 50 rpm) e contínua. Em seguida, os fragmentos ósseos, ainda imersos na solução fixadora, foram colocados em geladeira (4°C) por 36 horas. Os fragmentos assim fixados foram descalcificados em solução de EDTA 4,13% (pH 7,2) por um período de 9 dias em temperatura entre 22-25°C e com troca diária da solução descalcificadora. Após a descalcificação os fragmentos fixados na ausência de vermelho de rutênio, 0,2%, foram lavados com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,3), e aqueles fixados em solução contendo vermelho de rutênio 0,2% foram lavados em tampão cacodilato contendo 0,1% de vermelho de rutênio, realizando-se, no mínimo, cinco trocas em intervalos de 15 minutos. Após a lavagem os fragmentos foram colocados em solução de tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1M (pH 7,4) por duas horas e mantidos à temperatura ambiente sob movimento giratório (± 5 rpm). Em seguida, os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool e acetona, infiltrados com resina "SPURR" durante 12 horas, incluídos em resina pura e colocados para solidificar em estufa a 70°C durante 72 horas. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Hematologia Experimental - FCF/USP e no Laboratório dos Tecidos Mineralizados ICB/USP, sob a responsabilidade do Prof. Vitor E. Arana-Chavez.

3.9.2 Cortes e análise estrutural

A seleção da área adequada para a análise ultra-estutural foi realizada pela análise prévia do material em cortes semi-finos de 5 μ m de espessura. Estes cortes foram obtidos de blocos, inicialmente trimados e cortados em ultramicrótomo (Sorvall MT2-B). Os cortes foram corados com solução alcoólica de azul de toluidina 0,25% e observados ao microscópio óptico. Após seleção da área, foram confeccionados pelo menos 2 cortes ultrafinos (1 μ m) de cada fragmento ósseo utilizando-se o mesmo ultramicrótomo, e navalha de diamante (Diatome). Os cortes ultrafinos foram coletados em telas de cobre de 150 "meshes". Um dos cortes foi contrastado com solução

alcoólica de acetato de uranila 2% por 10 minutos, seguida de solução de chumbo a 0,5% por mais 10 minutos. O outro corte não passou pela etapa de contrastação. As preparações assim obtidas foram analisadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL 1010) e fotografadas.

3.10 Análise Estatística

Os resultados quantitativos obtidos nos diferentes experimentos foram submetidos ao teste de homocedasticidade (Teste de Kolmogorov-Smirnov) Os resultados que apresentaram distribuição normal foram analisados estatisticamente pelo teste t, e aqueles com distribuição não normal foram submetidos à análise estatística não-paramétrica empregando-se o teste U de Mann-Whitney, usando-se o programa GraphPad InStat versão 3.00 para Windows 95 (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA). Foram considerados significativos resultados com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da concentração protéica das rações

As rações utilizadas neste trabalho foram avaliadas quanto a concentração de proteínas. A concentração de lipídeos e teor de umidade, também foram analisados (Tabela 2).

Tabela 2- Concentração de proteínas, lipídeos e umidade das rações

COMPONENTE NUTRICIONAL	RAÇÃO I (Normoprotéica)	RAÇÃO II (Hipoprotéica)
PROTEÍNAS (g%)	21,0 ± 1,93 (2)*	4,64 ± 0,91 (2)
LIPÍDIOS (g%)	7,2 (1)	7,0 (1)
TEOR DE UMIDADE (%)	11,8 (1)	5,7 (1)

*Valores entre parênteses indicam o número de lotes de rações analisadas.

4.2 Avaliação do estado nutricional

4.2.1 Consumo diário de ração e de proteínas

Os camundongos que receberam a dieta hipoprotéica (ração II) apresentaram redução no consumo diário de ração (Figura 5A) em relação ao grupo controle, alimentado com a ração I (basal). Conseqüentemente, houve significativa redução na ingestão de proteínas (Figura 5B).

4.2.2 Variação de peso corporal e concentração de proteínas plasmáticas

Os camundongos que receberam ração hipoprotéica apresentaram significativa perda de peso corporal (Figura 5C) e redução da concentração de albumina plasmática quando comparados aos animais do grupo controle (Tabela 3).

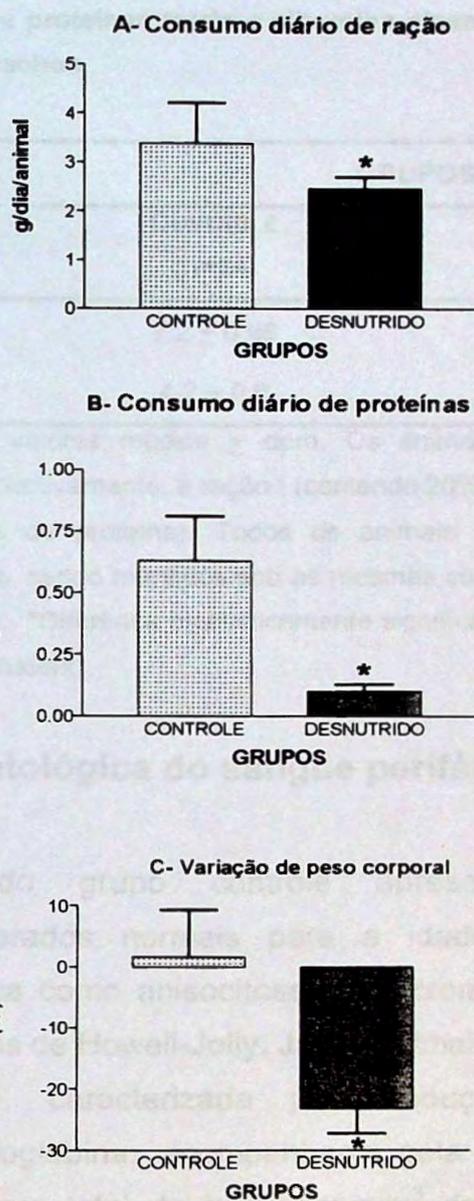


Figura 5- Consumo diário de ração (A) e proteínas (B) e variação de peso corporal (C) de camundongos Swiss webster, adultos, machos. Os parâmetros foram monitorados a cada 48 horas durante todo o período experimental (cerca de 14 dias) e os resultados estão expressos como média \pm dpm. Os animais do grupo controle (n=24) e desnutrido (n=32) receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (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. *Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student).

Tabela 3- Concentração de proteínas totais e albumina plasmática de camundongos Swiss webster, adultos, machos.

	GRUPOS	
	CONTROLE (n=24)	DESNUTRIDO (n=32)
PROTEÍNAS TOTAIS (g/dL)	7,2 ± 0,98	4,8 ± 0,8*
ALBUMINA (g/dL)	4,2 ± 0,6	3,1 ± 0,4*

Resultados expressos em valores médios \pm dpm. Os animais do grupo **controle** e **desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (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. *Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao grupo controle (Teste t-Student).

4.3 Avaliação hematológica do sangue periférico

Os animais do grupo controle apresentaram parâmetros hematológicos considerados normais para a idade e sexo, inclusive morfologia característica como anisocitose e policromasia moderadas e a presença de corpúsculos de Howell-Jolly. Já, os animais do grupo desnutrido apresentaram anemia, caracterizada pela redução significativa na concentração de hemoglobina, acompanhada pela redução do volume hematócrito e do número total de hemácias/mm³ de sangue (Tabela 4). Segundo a classificação morfológica, os animais desnutridos apresentaram anemia microcítica (redução do VCM), porém não houve alteração significativa de HCM em relação ao grupo controle e desta forma a CHCM aumentou significativamente. Houve também redução significativa do número de reticulócitos circulantes (Tabela 4). As características morfológicas observadas neste grupo foram anisocitose discreta, microcitose modera, presença de corpúsculos de Howell-Jolly e ausência de policromasia.

No grupo controle a série leucocitária apresentou predomínio de

linfócitos em relação aos neutrófilos e monócitos, tanto em valores relativos como absolutos. Eosinófilos foram encontrados ocasionalmente e os basófilos não foram observados no sangue periférico dos animais do grupo controle (Tabela 5).

Nos animais desnutridos observamos leucopenia com redução de todos os tipos celulares, porém foi mantido o predomínio de linfócitos sobre neutrófilos e monócitos, tanto em valores relativos como absolutos. Eosinófilos e basófilos não foram encontrados no sangue periférico de animais do grupo desnutrido (Tabela 5).

Tabela 4- Eritrograma de camundongos Swiss webster, adultos, machos.

PARÂMETRO HEMATOLÓGICO	GRUPOS	
	CONTROLE (n=16)	DESNUTRIDO (n=21)
ERITRÓCITOS (milhões/mm ³)	9,43 ± 0,24	8,03 ± 0,38*
HEMOGLOBINA (g/dL)	13,25 ± 0,38	11,34 ± 0,45*
HEMATÓCRITO (%)	39,38 ± 1,63	30,76 ± 1,73*
VCM (fL)	43,81 ± 1,56	38,53 ± 1,39*
HCM (pg)	14,87 ± 0,40	14,34 ± 0,37
CHCM (%)	34,43 ± 1,18	37,93 ± 1,32*
RETICULÓCITOS (células/mm ³)	307.200 ± 32.650	65.520 ± 41.81*

Resultados expressos em valores médios ± SEM. Os animais do grupo **controle e desnutrido** receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (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. *Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) quando comparado com o grupo controle (Teste t-Student).

Tabela 5- Leucograma de camundongos Swiss webster, adultos, machos.

PARÂMETRO HEMATOLÓGICO	GRUPOS	
	CONTROLE (n=16)	DESNUTRIDO (n=21)
LEUCÓCTOS TOTAIS (células/ mm ³)	3.157 ± 408	845 ± 154*
BASTONETES (células/ mm ³)	25**	0**
SEGMENTADOS (células/ mm ³)	1.045 ± 270	176 ± 71*
EOSINÓFILOS (células/ mm ³)	13**	0**
BASÓFILOS (células/ mm ³)	0**	0**
LINFÓCITOS (células/ mm ³)	1.914 ± 249	663 ± 97*
MONÓCITOS (células/ mm ³)	83 ± 23	7 ± 3*

Resultados em valores médios ± SEM. Os animais do grupo controle e desnutrido receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (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. *Diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) quando comparado com o grupo controle (Teste U de Mann-Whitney). ** Não foi possível realizar a análise estatística porque o desvio padrão de um dos parâmetros é igual a zero.

4.4 Avaliação da celularidade da medula óssea - Mielograma

Observamos redução significativa do número de células nucleadas totais e no número de células blásticas na medula óssea de animais desnutridos (Figuras 6A e B). A redução no número de células da linhagem granulocítica foi significativa nos animais desnutridos quando comparados com os respectivos controles, havendo comprometimento de todas as etapas maturativas dos granulócitos neutrófilos (Figuras 6C, D, E) e dos eosinófilos (Figura 6F). As séries eritrocitária (Figura 6G) e linfoplasmocitária (Figura 6H) também apresentaram redução significativa em relação aos animais controles. A série mono-macrofágica, embora reduzida nos animais desnutridos, não apresentou diferença significativa em relação aos animais controles (Figura 6I).

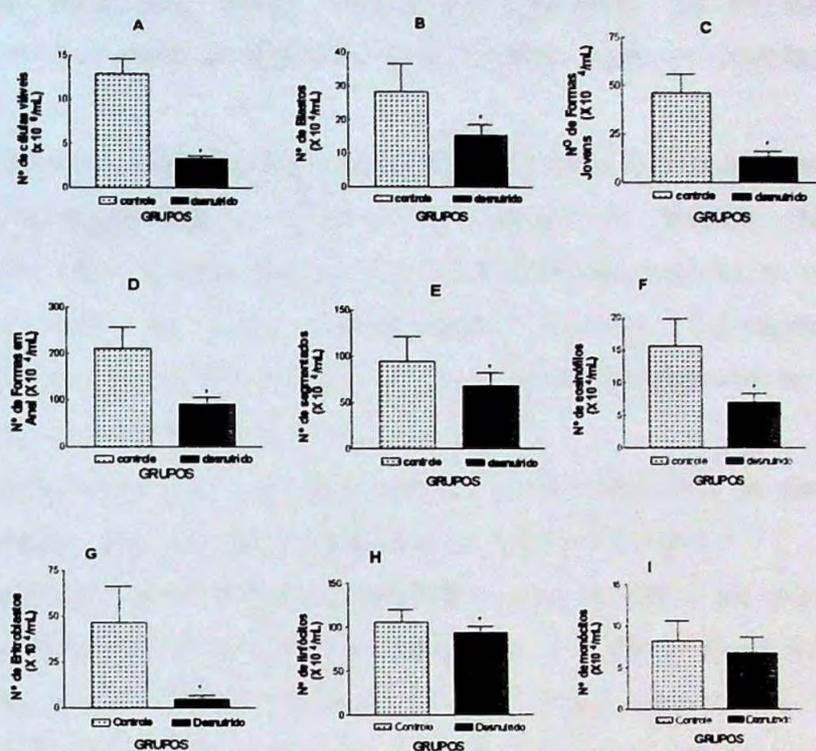


Figura 6- Mielograma. Resultados, expressos, em valores médios \pm dpm ($\times 10^4/\text{mL}$) do número total de células nucleadas (A) e dos diferentes tipos celulares (B a I) presentes na medula óssea de camundongos Swiss, adultos, machos. Os animais do grupo **controle** ($n=13$) e **desnutrido** ($n=18$) receberam, respectivamente, a ração I (contendo 20% de proteína) e a ração II, hipoprotéica (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 (em todas as etapas maturativas); (H) número de células linfo-plasmocitárias e (I) número de células mono-macrofágicas. *A diferença observada entre os grupos foi significativa ($p \leq 0,05$, teste t-Student).

4.5 Avaliação histomorfométrica da medula óssea

Em camundongos, o estroma celular da medula óssea é constituído predominantemente por uma população hemopoética, heterogênea, de células eritróides, granulocíticas, monocítica, linfo-plasmocitárias e megacariocíticas, em diferentes estágios de diferenciação e de maturação, constituindo os cordões hematopoéticos (Figura 7). Nesse tecido são

encontradas arteríolas, veias, vênulas e capilares. Os sinusóides estão presentes em grande quantidade percorrendo toda a cavidade medular (Figura 8).

As células eritróides podem ser identificadas como ninhos de células pequenas e densamente coradas, enquanto as células da linhagem granulocítica são células grandes com núcleo eucromático, células com núcleo em anel ou com segmentação nuclear. Considerando esta classificação os granulócitos são o tipo celular predominante na MO de camundongos saudáveis (Figura 7).

Os adipócitos não são freqüentes na MO esternal de camundongos normais quando comparada com a medula óssea humana.

A medula óssea dos camundongos pertencentes ao grupo controle apresentou-se histologicamente normal para a idade (Figura 8A) Contudo, nos animais desnutridos observamos profundas alterações histológicas (Figura 8B). A celularidade total da MO de camundongos do grupo controle ocupou em média, 79,97% do espaço medular enquanto nos animais desnutridos a celularidade total ocupou 29,23% do espaço medular (Figura 9).

Aparentemente, os animais desnutridos apresentam maior número de adipócitos na medula óssea ao comparar-se com os respectivos controles (Figura 7B).

Confirmando os dados obtidos no mielograma, a análise histológica evidencia nos animais desnutridos, uma medula óssea atrófica (Figura 7B e 8B), 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 MO (Figura 7B).

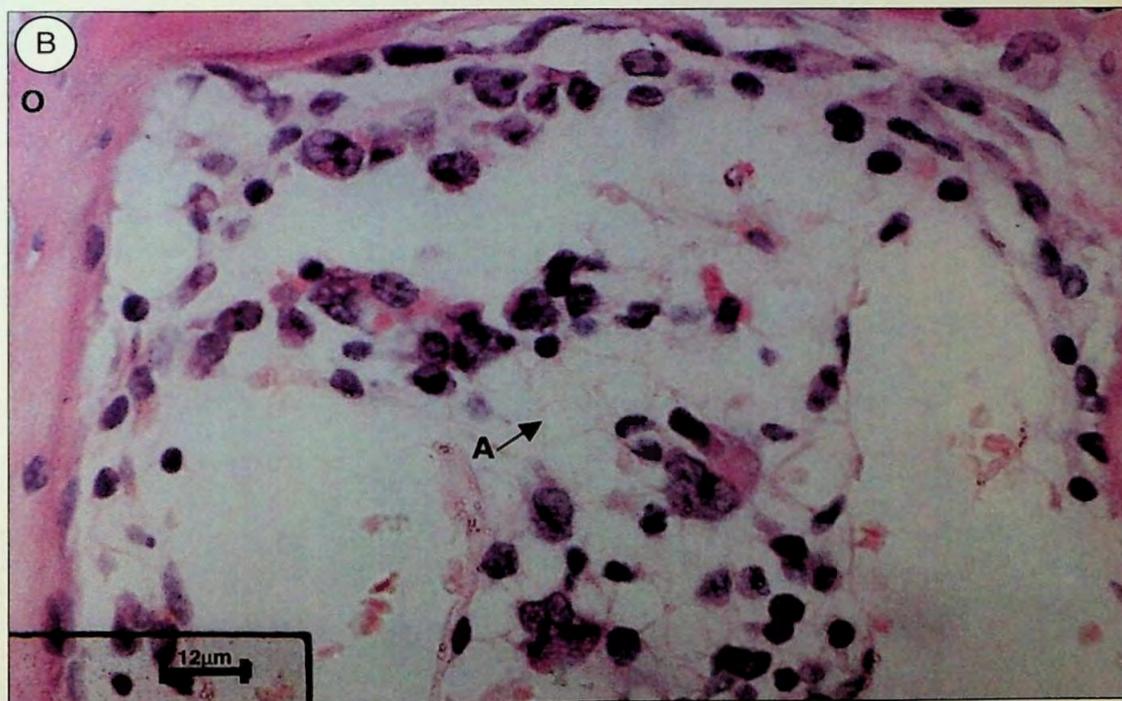
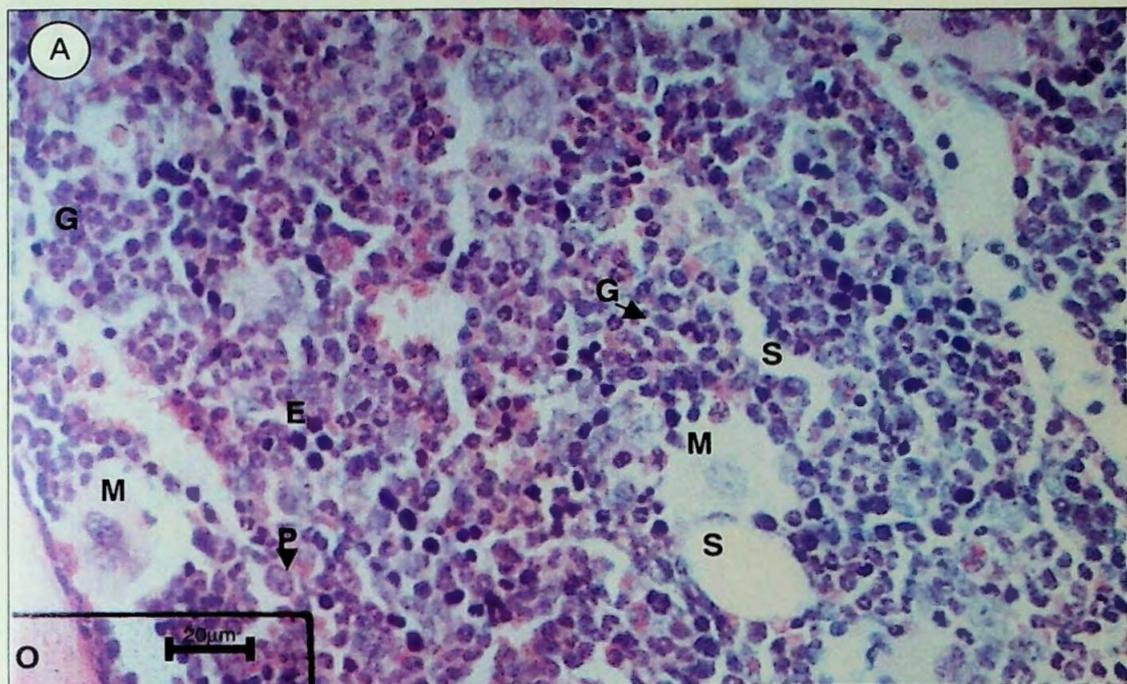


Figura 7- Avaliação histológica da medula óssea (Hematoxilina-Eosina).

Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos Swiss adultos, machos.

(A) Animal do grupo controle: medula óssea apresentando população heterogênea de células em diferentes estágios de maturação e **(B)** animal do grupo desnutrido evidenciando medula óssea atrófica com comprometimento das linhagens hemopoéticas.

M- megacariócitos, **E-** linhagem eritróide, **G,** linhagem granulocítica, **P-** células precursoras, **A-** adipócitos, **S-** sinusóide, **O-** osso.

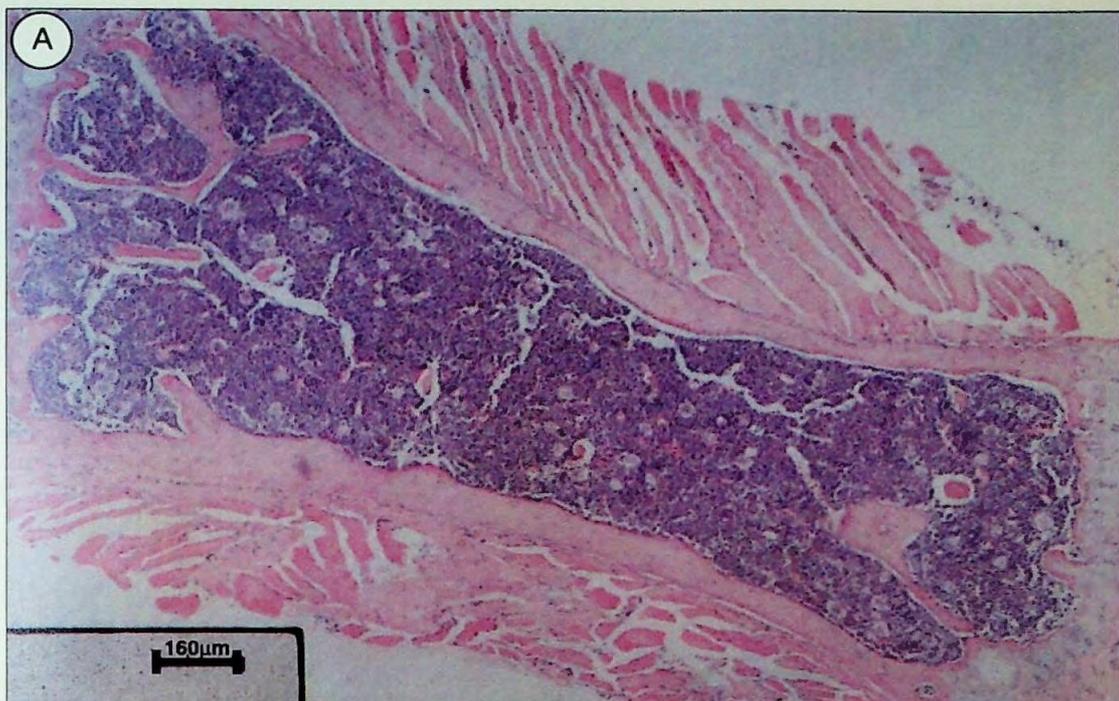


Figura 8- Avaliação histológica da medula óssea (Hematoxilina-Eosina). Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos Swiss adultos, machos. **(A)** Animal do grupo controle (87,37% da área medular ocupada por células) e **(B)** animal do grupo desnutrido com perda de peso de 26,9%, apresentando depleção celular (29,23% da área medular está preenchida pelas células) e dilatação da luz dos vasos sinusais.

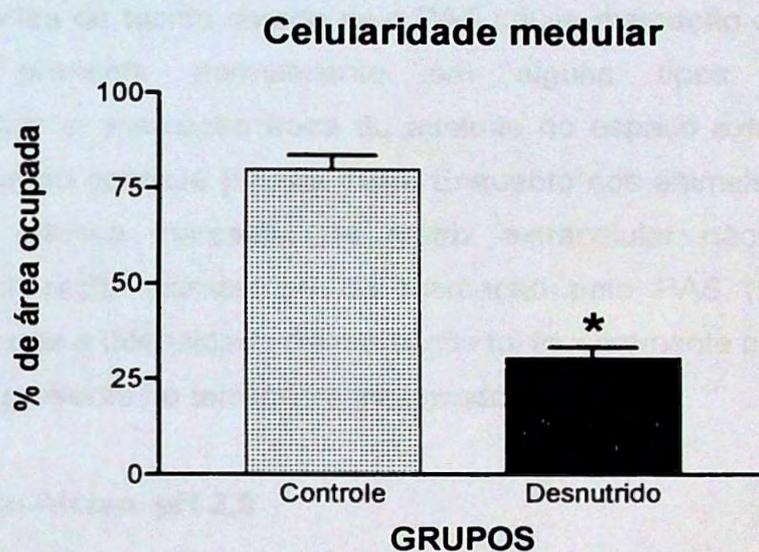


Figura 9- Avaliação histomorfométrica da medula óssea de camundongos Swiss adultos, machos. Os animais do grupo controle e desnutrido receberam, respectivamente, ração I (contendo 20% de proteína) e ração II (contendo 4% de proteína). Todos os animais tiveram livre acesso às respectivas rações e a água, sendo mantidos sob as mesmas condições ambientais e sob um ciclo de luz de 12 horas. A determinação da percentagem de área medular esternal ocupada por células foi realizada pela avaliação microscópica de 10 campos de cada corte histológico analisado. Grupo Controle ($n=30$), Grupo desnutrido ($n=40$). *A diferença observada entre os grupos foi significativa ($p < 0,05$, teste t-Student).

4.6 Distribuição da MEC da medula óssea de camundongos

4.6.1- Avaliação histoquímica

Reação do PAS

Em cortes de tecido corado pelo PAS houve marcação do glicogênio intracelular presente normalmente em alguns tipos de células hematopoéticas e, marcação fraca ou ausente no espaço extracelular nos animais do grupo controle (Figura 10A). Enquanto nos animais desnutridos houve uma intensa marcação da matriz extracelular não tendo sido observado alteração intracelular da marcação pelo PAS (Figura 10B). Observamos que a intensidade de marcação foi inversamente proporcional à celularidade presente no território considerado.

Azul de Alcian pH 2,5

Quando comparados com os animais do grupo controle (Figura 11A), os animais do grupo desnutrido apresentaram acentuada marcação do espaço extracelular pelo método de azul de alcian, pH2,5 (Figura 11B). Observamos, que a intensidade de marcação foi inversamente proporcional à celularidade presente no território considerado.

Tricrômico de Masson

Não observamos positividade no espaço medular utilizando-se o método de tricrômico de Masson tanto nos animais saudáveis quanto nos desnutridos (Figura 12A e B).

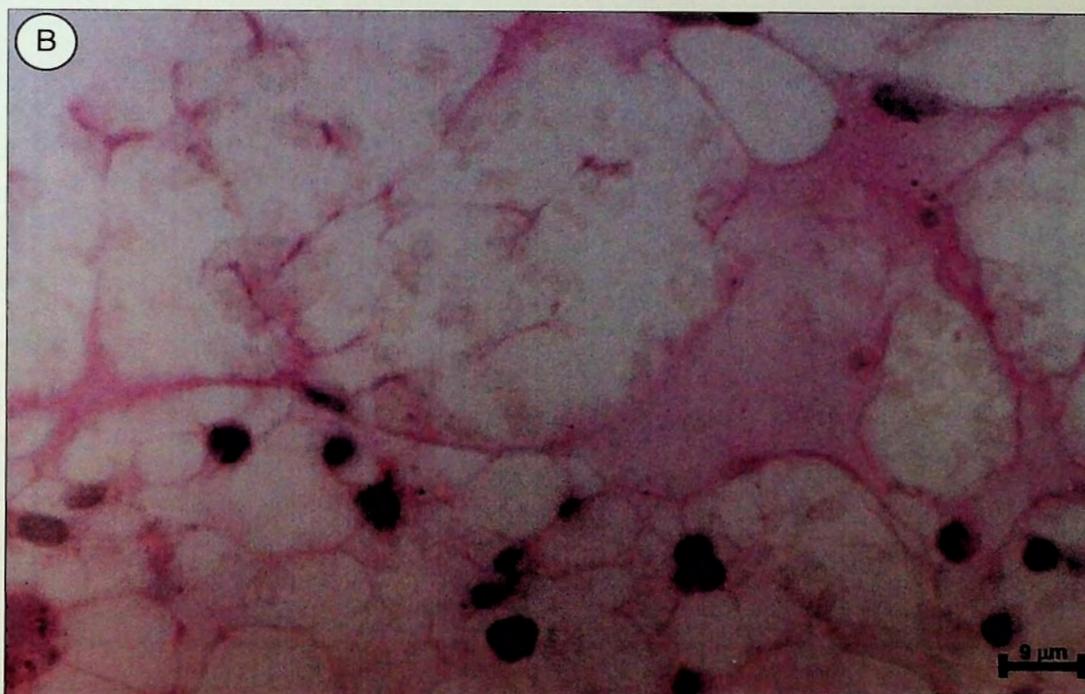
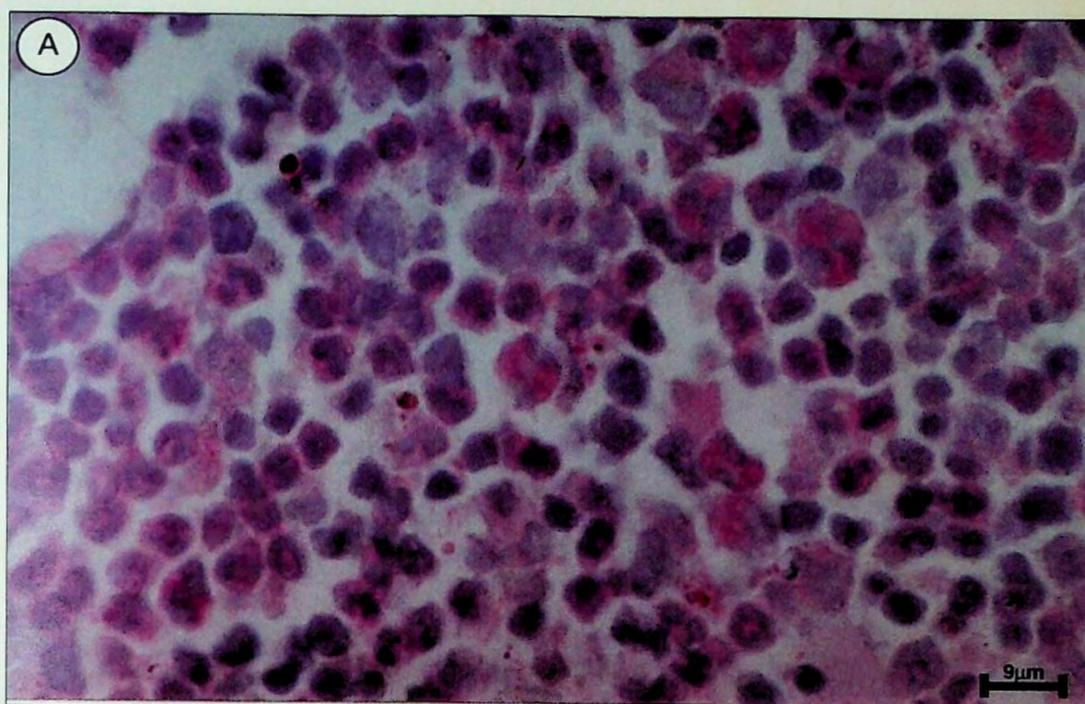


Figura 10- Avaliação histoquímica da medula óssea (Reação do PAS). Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos Swiss adultos, machos. **(A)** Animal do grupo controle: marcação do glicogênio intracelular e ausência de marcação no espaço intercelular, **(B)** animal do grupo desnutrido com perda de peso de 29,5%, com medula óssea atrófica evidenciando-se áreas intersticiais marcadas intensamente pela reação do PAS e aparente aumento na marcação pelo PAS em células reticulares.

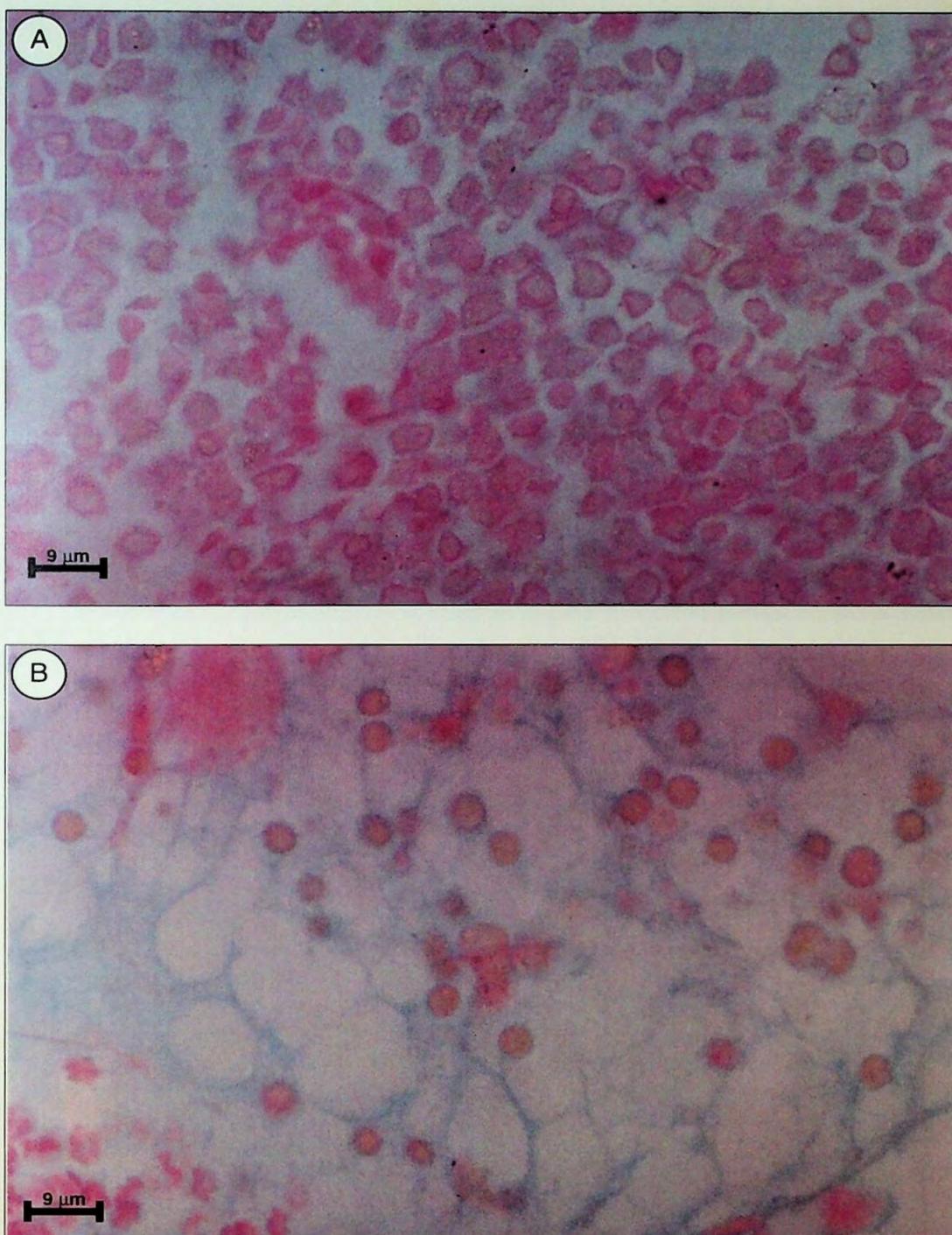


Figura 11- Avaliação histoquímica da medula óssea (Azul de Alcian pH 2,5). Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos Swiss adultos, machos. **(A)** Animal do grupo controle: ausência de áreas coradas em azul em torno dos elementos hematopoéticos, **(B)** animal do grupo desnutrido com perda de peso de 29,5%, apresentando medula óssea atrófica e matriz extracelular corada em azul evidenciando o aumento de ácido hialurônico na matriz extracelular. Aparentemente, há aumento de marcação, nestes animais, em regiões pericelulares.

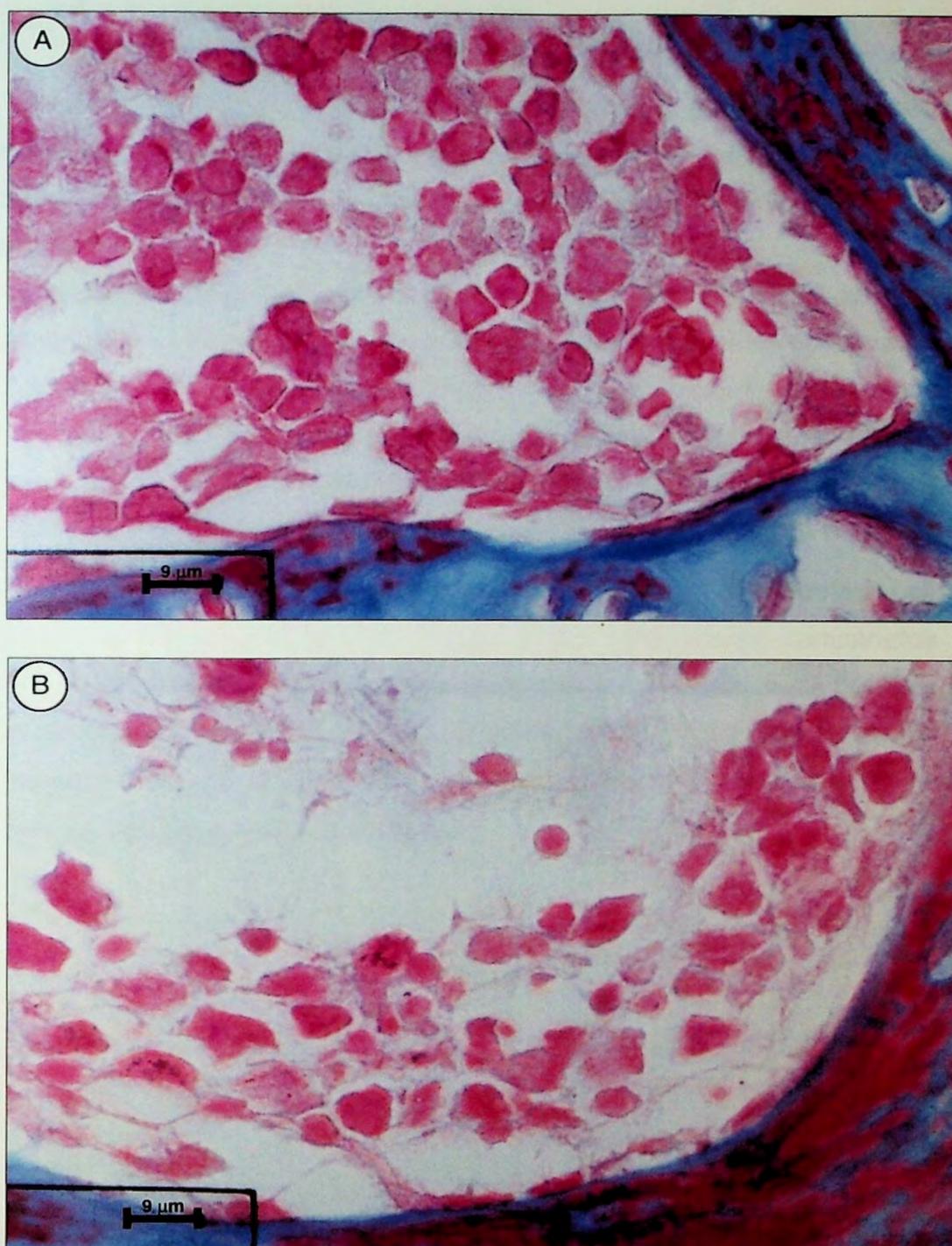


Figura 12- Avaliação histoquímica da medula óssea (Tricrômico de Masson).

Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos Swiss adultos, machos.

(A) Animal do grupo controle: ausência de regiões coradas em azul (colágeno) no espaço medular, contrastando com a intensa marcação na matriz óssea. **(B)** Animal do grupo desnutrido com perda de peso de 29,5%, medula óssea atrófica: não se evidencia regiões coradas em azul no espaço medular, entretanto, quando comparado ao animal controle, pode-se observar modificação na marcação da matriz óssea.

4.6.2 Avaliação imuno-histoquímica

Os anticorpos primários anti-fibronectina e anti-laminina não apresentaram reação cruzada com outras proteínas que geralmente compõem a MEC, mas reconhecem, respectivamente, FN e LN de camundongos.

Quando comparados com o grupo controle (Figura 13A), os animais do grupo desnutrido apresentaram aumento da marcação de fibronectina na MEC (Figura 13B, 14A e 14B). Quanto à distribuição tecidual, observamos que o aumento da marcação de fibronectina ocorreu, principalmente, nas regiões do endósteo (Figura 13B), perivascular (Figura 13A) e áreas intercelulares em torno dos elementos hematopoéticos (Figura 14A e B).

Houve aumento na deposição de laminina na MEC da medula óssea dos animais do grupo desnutrido (Figura 15B e 16A) quando comparados com o grupo controle (Figuras 15A), e observou-se o acúmulo desta proteína tanto na região próxima ao endósteo (Figura 16B) quanto na região central do espaço medular preenchendo de áreas intersticiais contornando os elementos hematopoéticos (Figura 15A).

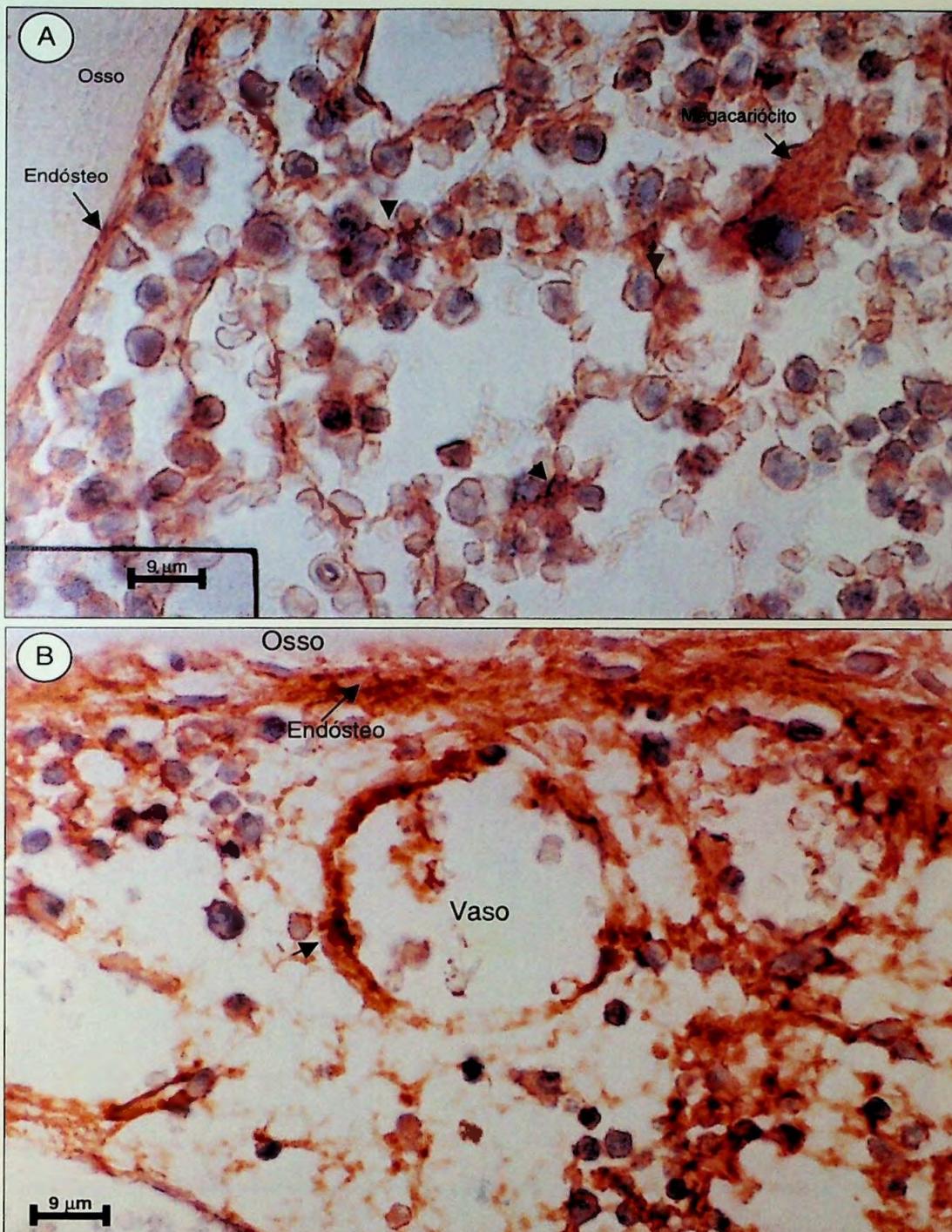


Figura 13- Avaliação imuno-histoquímica da medula óssea - Fibronectina.

Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos Swiss adultos, machos.

(A) Animal do grupo controle: observa-se a presença de fibronectina em torno dos elementos hematopoiéticos, (B) animal do grupo desnutrido com perda de peso de 29,5%: medula óssea hipocelular, apresentando aumento na marcação de fibronectina na matriz extracelular em região endosteal, perivascular e da região central do espaço medular (SETAS).

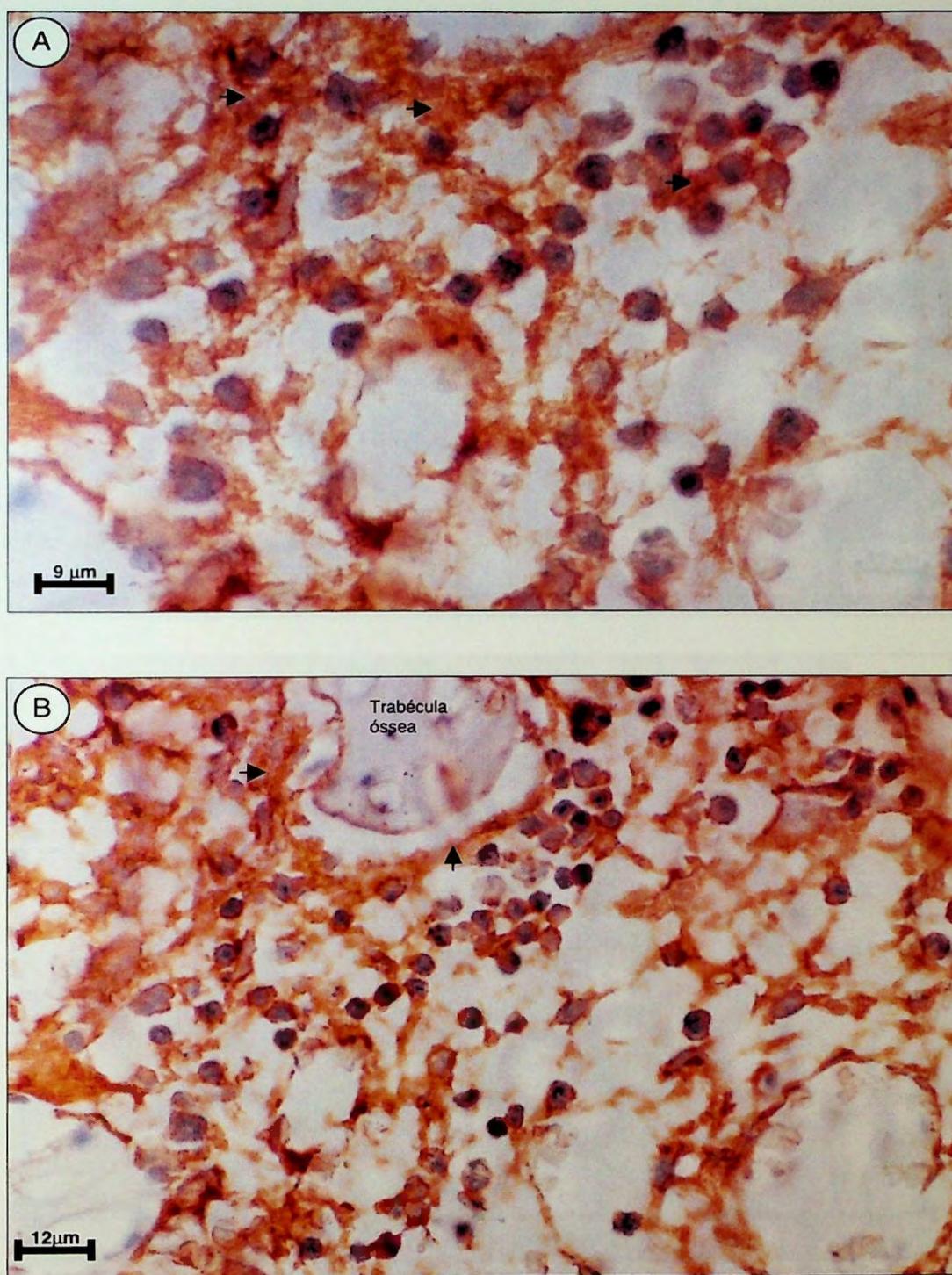


Figura 14- Avaliação imuno-histoquímica da medula óssea - Fibronectina. Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos Swiss adultos, machos. Animal do grupo desnutrido com perda de peso de 29,5%, apresentando atrofia medular e aumento na marcação de fibronectina na matriz extracelular, **(A)** em região central do espaço medular e **(B)** em região paratrabecular (setas).

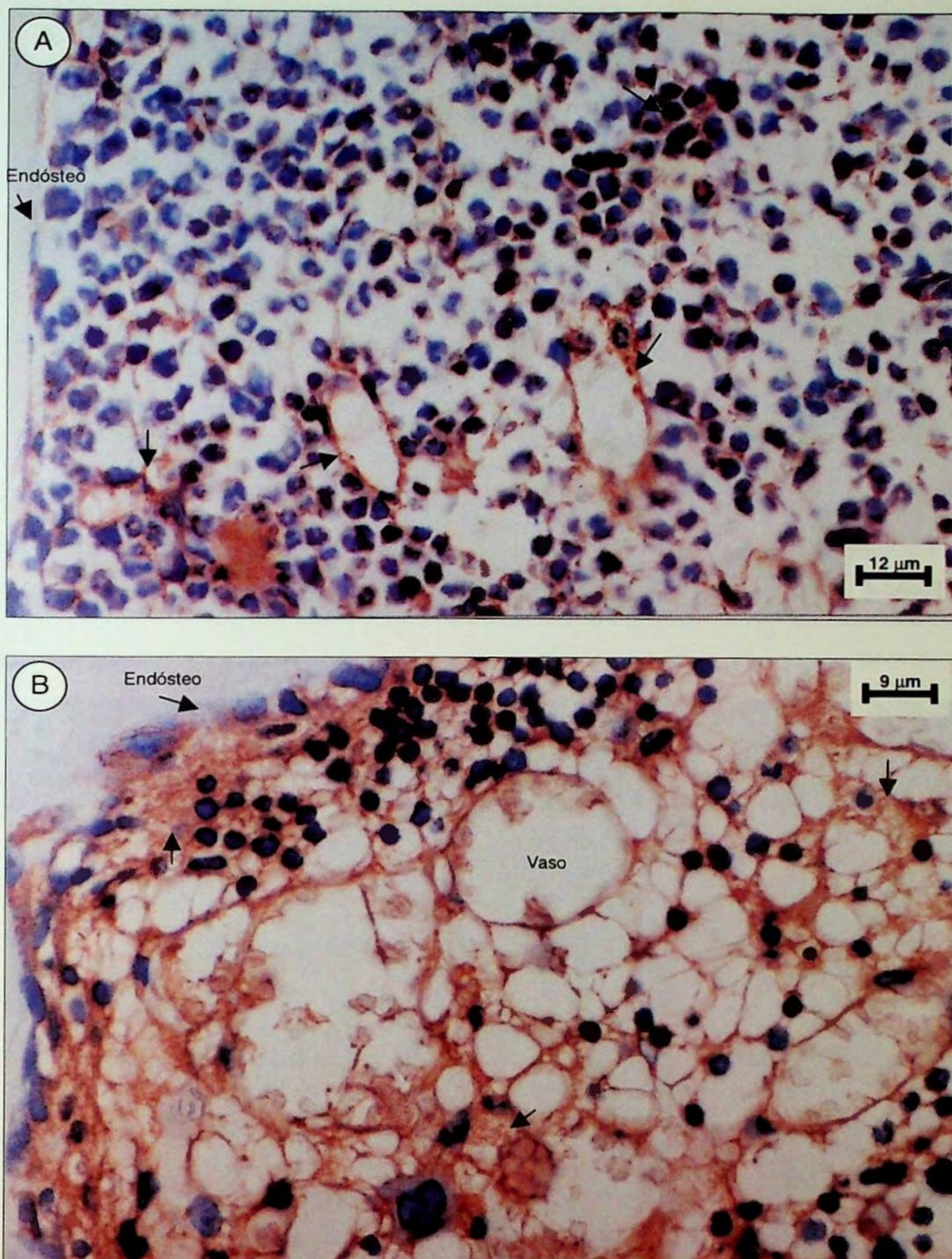


Figura 15- Avaliação imuno-histoquímica da medula óssea - Laminina. Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos Swiss adultos, machos. **(A)** Animal do grupo controle: medula óssea apresentando marcação em torno dos elementos hematopoéticos e em região perisinusoidal. A região endosteal e sub-endosteal apresentam discreta marcação (setas); **(B)** animal do grupo desnutrido com perda de peso de 29,5%: medula óssea atrófica apresentando aumento na marcação na matriz extracelular em região pericelular. Evidente aumento da marcação de laminina tanto na região endosteal como subendosteal (setas).

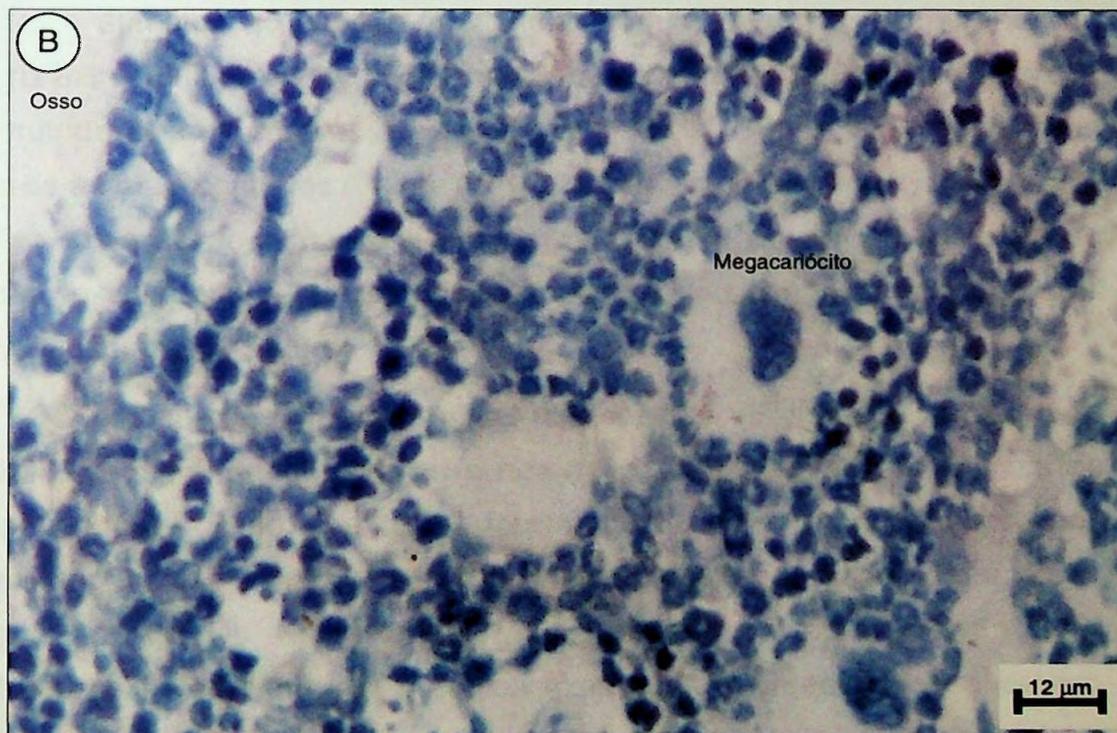
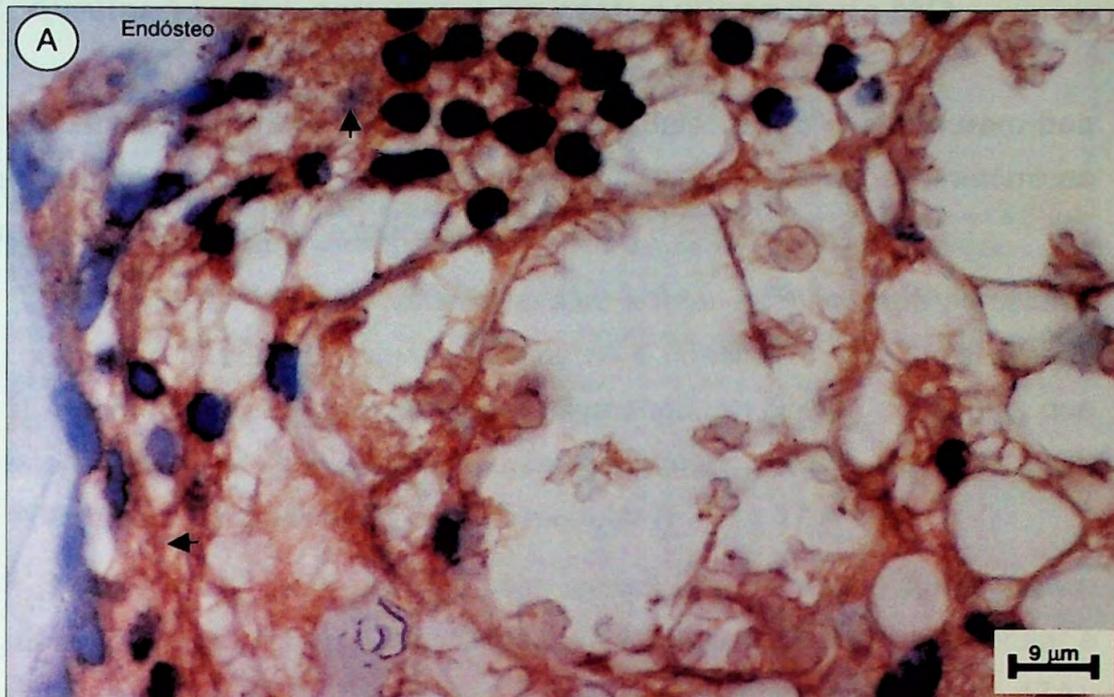


Figura 16- Avaliação imuno-histoquímica da medula óssea - Laminina. Fotomicrografia de corte histológico de esterno de camundongos Swiss adultos, machos. (A) Animal do grupo desnutrido com perda de peso de 29,5% e aumento na deposição de laminina na matriz extracelular em região central do espaço medular. (B) Controle negativo da marcação imuno-histoquímica, obtido pela omissão do anticorpo na etapa de incubação com anticorpo primário.

4.7. Avaliação ultra-estrutural de proteoglicanos da MO

A maior parte das preparações de medula óssea evidenciaram boa preservação do osso e do tecido mielóide, mantendo as relações anatômicas entre o estroma medular e o endóstio.

Utilizando a MET foi possível avaliar a inter-relação entre as células que compõem a medula óssea. O endóstio é constituído por uma camada única e contínua de células alongadas, formando um cordão de células que revestem toda a cavidade medular, algumas vezes estratificadas, delimitando a matriz óssea do espaço medular (Figura 17 A e B).

Nos animais do grupo controle as células do tecido hemopoético estão muito próximas umas das outras de forma que o espaço intercelular é restrito e a quantidade de matriz extracelular é pequena (Figura 17A). Porém, nos animais desnutridos observa-se além da rarefação celular, evidente aumento no espaço intercelular com a presença, exuberante, de matriz extracelular (Figura 17B). A relação célula-célula em animais do grupo desnutrido é profundamente modificada (Figura 18B) quando comparada com os animais controles (Figura 18A). Na fotomicrografia 18B visualiza-se a matriz extracelular como uma substância granular amorfa. A ausência de fibras de colágeno foi observada tanto na MO de camundongos dos dois grupos estudados (Figuras 17 e 18).

O estudo citoquímico da matriz extracelular utilizando o vermelho de rutênio, permitiu identificar a presença de proteoglicanos. Nos animais do grupo controle os proteoglicanos foram visualizados como grânulos finos elétron-opacos e homoganeamente distribuídos no espaço intercelular (Figura 19A). Os animais do grupo desnutrido apresentaram uma distribuição heterogênea de grânulos mais densos preenchendo o espaço intercelular ou formando blocos eletron-opacos justapostos à parede celular (Figura 19B).

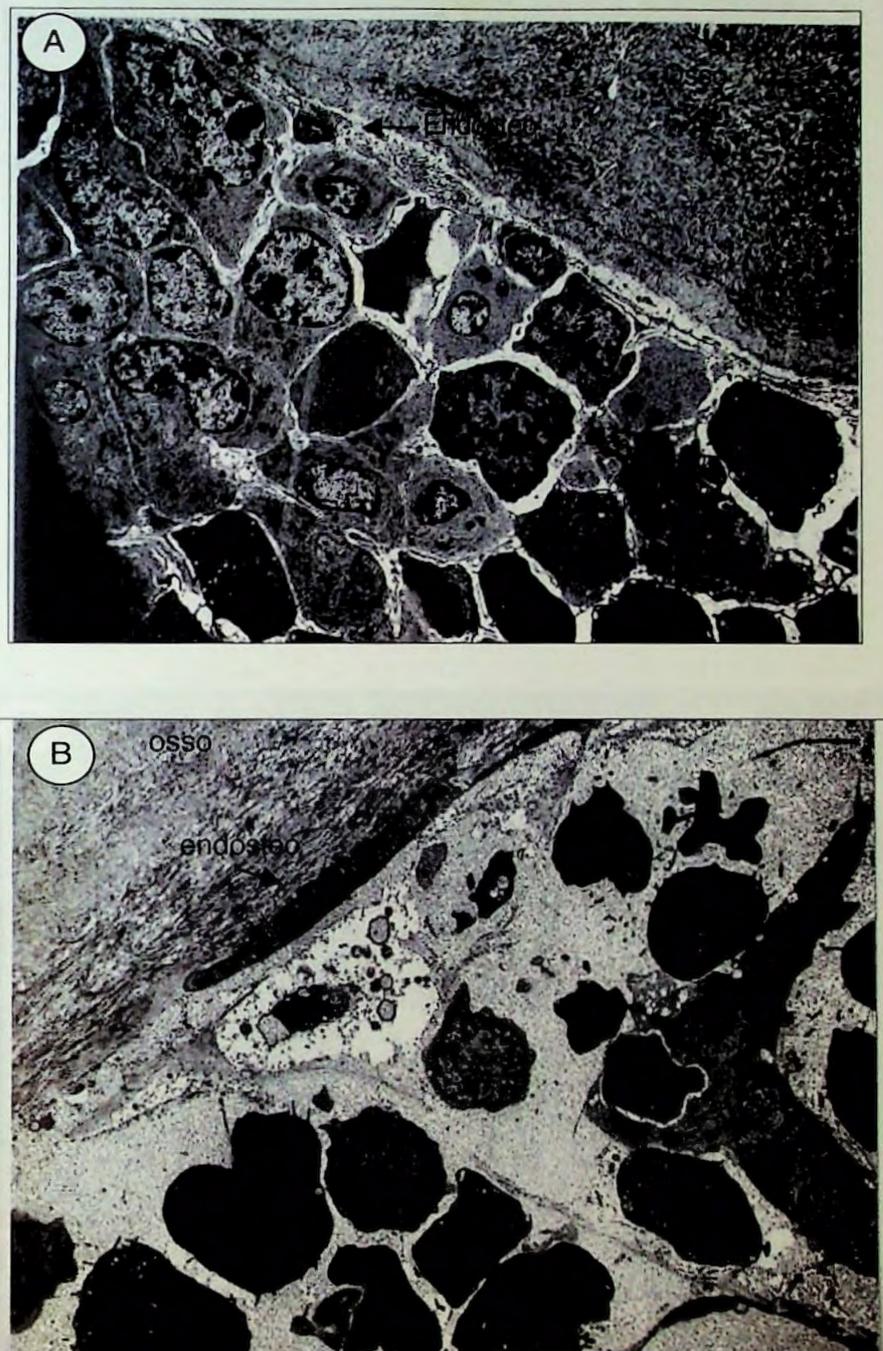


Figura 17- Avaliação ultra-estrutural da medula óssea de camundongos. Micrografia eletrônica da medula óssea esternal de camundongos Swiss Webster adultos, machos. **(A)** Região próxima ao endóstio de animal controle (x2000) e **(B)** de um animal desnutrido, na qual pode-se observar a rarefação celular e a perda da arquitetura do tecido hematopoético (x2000).

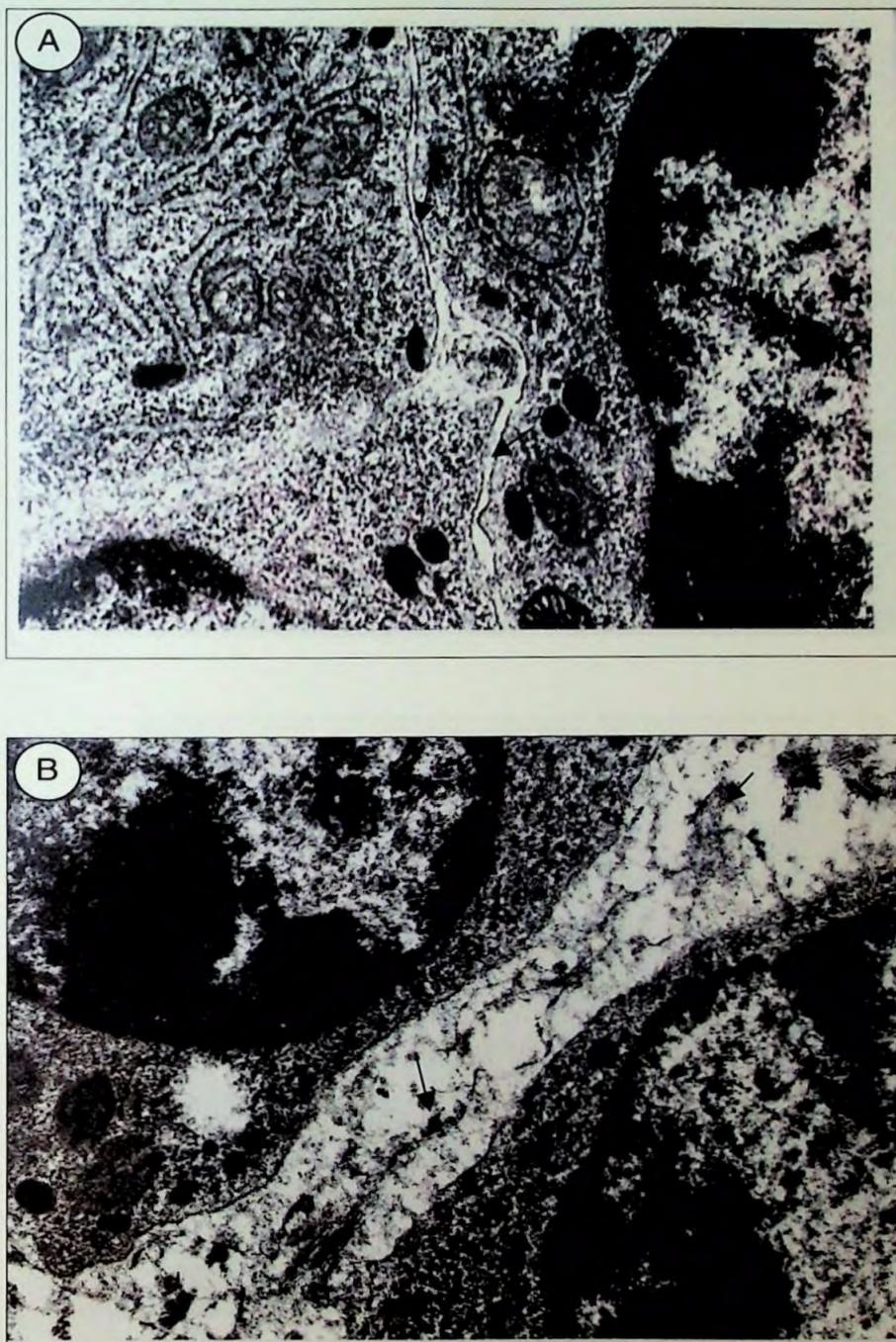


Figura 18- Avaliação ultra-estrutural da medula óssea de camundongos. Fotomicrografia da medula óssea esternal de camundongos Swiss, adultos, machos. Relação célula-célula entre dois granulócitos: **(A)** em animal do grupo controle, evidenciando duas prováveis regiões juncionais (SETA) (x15.000); e **(B)** no animal desnutrido observando-se o aumento do espaçamento intercelular preenchido por matriz extracelular e modificação da relação celular e célula-matriz estromal (x15.000).

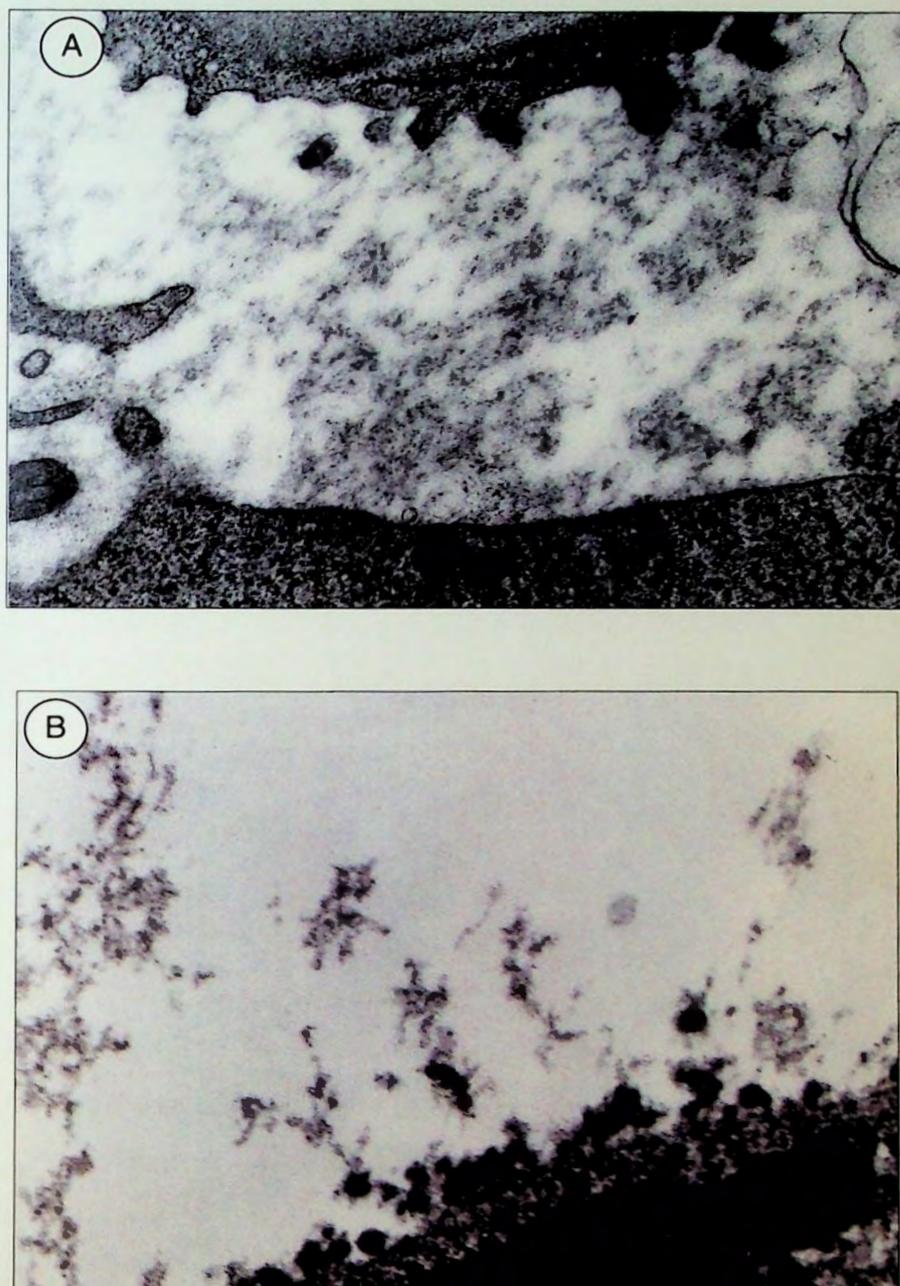


Figura 19- Avaliação citoquímica ultra-estrutural de proteoglicanos da matriz extracelular da medula óssea. Micrografia eletrônica da medula óssea esternal de camundongos Swiss, adultos machos. (A) *Animal do grupo CONTROLE* evidenciando a distribuição heterogênea de proteoglicanos no espaço intercelular (x20.000) e (B) No animal do grupo desnutrido, os PG são evidenciados como grânulos eletron-opacos justapostos ou muito próximos à membrana celular (x30.000). Os esternos foram fixados em solução de glutaraldeído e formaldeído contendo vermelho de rutênio.

5 DISCUSSÃO

A desnutrição é um problema de saúde pública tanto nos países em desenvolvimento, devido a sua alta endemicidade, quanto em países industrializados, devido a sua alta prevalência em idosos (VISVANATHAN, et al., 2003) e pacientes hospitalizados (CERECEDA, et al., 2003).

A desnutrição é a principal causa mundial de imunodeficiência (CHANDRA, 1997). A caracterização das alterações observadas no tecido hemopoético em decorrência desta síndrome é importante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na redução da imunocompetência. Com base em achados prévios de alterações quantitativas na composição de proteínas da matriz extracelular da medula óssea (VITURI et al., 2000), órgão primário da produção de células efectoras da resposta imune específica e inespecífica, e devido à importância da organização da matriz extracelular na regulação da hemopoese, este trabalho teve como meta a caracterização da composição e distribuição topográfica de fibronectina, laminina, colágeno e de proteoglicanos presentes na matriz extracelular da medula óssea em modelo de desnutrição protéica.

Estudos realizados tanto em humanos quanto em animais não têm permitido uma avaliação global sobre a hemopoese e sobre a mobilização e função de leucócitos, visto que, geralmente as informações sobre cada um destes aspectos são obtidas de trabalhos utilizando animais de espécie, sexo e idade diversas, dietas qualitativa e quantitativamente diferentes e, sob os mais variados estímulos inflamatórios e infecciosos. Assim, Garcia (1992), em sua tese de doutorado, desenvolveu o modelo murino de desnutrição protéica empregado neste trabalho e que tem permitido a compreensão do efeito da desnutrição no processo da hemopoese e de aspectos da resposta inflamatória (BORELLI et al., 1995 e 1998; BORELLI; NARDINELLI, 2001; BORSATO, 1999; SOUZA et al., 2001; VITURI et al., 2000; XAVIER, 1999). Neste modelo utiliza-se camundongos machos com 2 a 3 meses de idade (adultos). O sexo foi escolhido para evitar a flutuação hormonal do ciclo estral e, portanto sua influência na cinética de células sangüíneas (GRIFFITH, 1942) e a idade adulta devido a estabilização do

sistema hematopoético (BANNERMAN, 1983). As formulações das rações utilizadas no processo de desnutrição foram elaboradas considerando os teores de vitaminas, ácidos graxos e sais minerais necessários para fornecer uma dieta adequada, restringindo-se apenas a quantidade de proteína da ração hipoprotéica. Neste modelo a desnutrição é inicialmente causada pela deficiência de proteínas, contudo, tendo em vista a resposta anorética do animal, o processo evolui para desnutrição protéico-energética. Os animais são mantidos, inicialmente, em gaioleiro metabólico, em ambiente com temperatura controlada e ciclo de luz (claro/escuro) de 12 horas e recebem ração comercial e água *ad libitum*. Esta etapa de adaptação é realizada para eliminar a situação de stress que pode ocorrer quando os animais são colocados em gaioleiros individuais.

Os animais que receberam a ração hipoprotéica apresentaram redução no consumo diário de ração. Este comportamento tem sido observado nos trabalhos realizados neste laboratório (BORELLI et al., 1995; BORSATO, 1999, VITURI et al., 2000; XAVIER, 1999). A associação entre anorexia e deficiência de aminoácidos essenciais foi relatada no início do século passado por Willcok e Hopkins (apud GIETZEN; MAGRUM, 2001). Segundo Gitzen (1993) os animais possuem mecanismos de seleção que permitem a obtenção de dieta balanceada. Na ausência de dieta adequada em aminoácidos essenciais, os animais desenvolvem resposta anorética na tentativa de minimizar as conseqüências decorrentes do consumo de dieta desbalanceada. 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. Existem evidências de que, em vertebrados, o sistema para detecção de aminoácidos essenciais esteja localizado no sistema nervoso central, mais especificamente no córtex piriforme anterior. É provável que seres humanos também possuam estes mecanismos (GIETZEN; MAGRUM, 2001). A redução na ingestão de alimento pode derivar também de transtornos hipotalâmicos, determinados por lesões locais e distúrbios psicogênicos, semelhantemente à anorexia nervosa (WATERLOW, 1996).

Com a redução do consumo de ração e, conseqüentemente, de proteínas, os animais do grupo desnutrido apresentaram significativa perda de peso corporal. 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). Na DPE, paralelamente à redução do peso corporal, há redução na concentração de proteínas plasmáticas e viscerais (AUGUSTO et al., 1995) e desta forma a albumina plasmática tem sido amplamente utilizada como parâmetro de avaliação do estado nutricional. Em algumas situações a albumina pode não ser o melhor parâmetro para a avaliação nutricional, pois sua vida média é de cerca de 18 dias; contudo, neste modelo, a concentração plasmática de albumina mostrou-se adequada, pois os animais perdem, em média, 25% do peso corporal em, aproximadamente 15 dias.

A ração considerada como basal foi adequada nutricionalmente, uma vez que a curva de peso corporal, as concentrações plasmáticas de proteína e albumina, bem como os parâmetros hematológicos do sangue e da medula óssea encontraram-se dentro dos valores esperados para camundongos Swiss adultos, conforme valores de referência (BANNERMAN, 1983; MOORE, 2000; SANDERSON; PHILLIPS, 1981). Por outro lado, a ração hipoprotéica, ora utilizada, induziu desnutrição, caracterizada pela perda de peso, e redução da albumina, ocasionando um quadro de anemia e leucopenia de origem central visto as alterações qualitativas e quantitativas encontradas na medula óssea.

A anemia, em vários graus de gravidade, é um quadro comum na DPE. Assim como a desnutrição, a etiologia da anemia é multifatorial e o mecanismo etiopatogênico pode variar conforme o tipo e grau de desnutrição, presença ou não de infecção ou da associação com outras doenças. A anemia decorrente da desnutrição pode ser atribuída a fatores como a própria deficiência protéica, ou a associação desta com deficiência de ferro, folato e vitaminas (BARON, 1997). Outros mecanismos etiopatogênicos propostos para a anemia foram hemodiluição, hemólise, hipotrofia eritróide e redução da concentração sérica de eritropoetina

(ASCHKENASY, 1957, ANAGNOSTOU, et al., 1977; CATCHATOURIAN, et al., 1980; FRIED, et al., 1978; MACDOUGALL, et al., 1982).

O tecido hemopoético, assim como todos aqueles que exibem alta taxa de renovação e proliferação celular apresenta elevada exigência de nutrientes. As necessidades de material protéico para a hemopoese poderiam, a nosso ver, justificar, por si só, a ocorrência de anemia e leucopenia freqüentemente observada em seres humanos desnutridos.

Em humanos a deficiência de ferro tem sido considerada como a principal causa nutricional de anemia (FINCH, 1975). Porém, a anemia observada na DPE nem sempre é causada pela carência de ferro, vários autores têm encontrado valores normais para ferro sérico com aumento da saturação de transferrina (RAMDATH; GOLDEN, 1989), concentração de ferritina sérica normal e a medula óssea apresentando depósitos de ferro normais ou elevados. A análise histológica de fígado obtido, *post-mortem*, de indivíduos com *Marasmus*, apresentou valores elevados de ferro (McLAREM et al., 1968; WATERLOOW, 1996). Segundo Vilter (1975), crianças com DPE típica apresentam anemia normocrômica, normocítica, com hemoglobina entre 8 - 10g/dL e eritropoese medular normal ou, medula discretamente hipoplásica, com infiltração gordurosa.

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

A anemia, em desnutrição experimental, apresenta diminuição da incorporação de ferro e do número de reticulócitos (FRIED et al., 1976), bloqueio do processo maturativo de eritroblastos e redução de eritropoietina (ASCHKENASY, 1957; SEIFTER et al., 1971).

Neste trabalho a maioria dos camundongos desenvolveram uma anemia com importante reticulocitopenia e cuja característica morfológica mais evidente foi a redução do volume celular. Porém, o conteúdo de hemoglobina intracorporal foi preservado, nos parecendo que, a deficiência protéica poderia alterar qualitativamente e, ou quantitativamente a estrutura da membrana celular, ou ainda, promover modificações metabólicas nos eritrócitos. O aumento da resistência osmótica de eritrócitos de camundongos desnutridos foi observado em experimentos realizados neste laboratório, entretanto esta alteração não está relacionada às proteínas da membrana citoplasmática, uma vez que, análises preliminares não detectaram alterações significativas na composição protéica da membrana eritrocitária (dados não publicados).

As análises realizadas em nosso laboratório evidenciam que a anemia encontrada em camundongos adultos, submetidos à desnutrição protéica, não é ferropriva uma vez que nesses animais a concentração plasmática de ferro, bem como os valores de saturação da transferrina e a ferritina na medula óssea, fígado e baço encontram-se elevados. A análise da eritropoese medular, nos animais desnutridos revela redução de células eritróides primitivas (dados não publicados) e, da mesma forma que Aschkenasy (1957), temos encontrado alteração na maturação dos eritroblastos. Tendo em vista que foi excluída a natureza hemolítica dessa anemia, e que esses animais não respondem a administração de eritropoetina (dados não publicados), sugerimos que a anemia seja ocasionada pela alteração na capacidade de proliferação e maturação da célula progenitora. A nosso ver esta situação decorre de alterações no microambiente indutor da hemopoese.

O efeito da deficiência protéica na produção e mobilização de leucócitos está amplamente documentado, porém, os resultados não são concordantes. Leucopenia e leucocitose são situações descritas na literatura em processos de desnutrição, especialmente em seres humanos (ASCHKENASY, 1957; CATCHATOURIAN et al., 1980; GROSS; NEWBERNE, 1980; ROSEN et al., 1974). As divergências relatadas podem

ser decorrentes da presença de quadros multicarenciais e da associação a outros processos patológicos, freqüentemente observados em condições de desnutrição (ASCHKENASY, 1957; WATERLOW, 1990).

Embora a resposta leucocitária seja variável as evidências indicam que em situações de desnutrição não associada a outras doenças, a leucopenia é a regra (ASCHKENASY, 1977; FRIED et al. 1978). Dietas hipoprotéicas ou com composição inadequada de aminoácidos, têm efeito neutropênico (ASCHKENASY, 1966a) e eosinopênico (ASCHKENASY, 1966b). Estas alterações estão diretamente relacionadas ao comprometimento da resposta imunológica, tanto específica quanto inespecífica favorecendo a instalação de processos infecciosos.

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. Entretanto, os dados sobre a mobilização celular também são divergentes (CHANDRA, 1975). Endotoxinas alteram a mobilização celular não só deslocando os granulócitos "marginais", mas também, modificando o influxo no compartimento de maturação (ATHENS, et al., 1961; KAMPSCHMIDT, UPCHURCH, 1977).

Goyal et al. (1981) encontraram, em pacientes marasmáticos, redução da adesão de polimorfonucleares à coluna de nylon. Harris et al. (1985), observaram diminuição da quimiotaxia e da adesão de neutrófilos obtidos de ratos recém-nascidos cujas mães eram desnutridas. Camundongos adultos submetidos a DPE apresentaram redução da celularidade na cavidade peritoneal após administração intraperitoneal de glicogênio (BORELLI et al., 1995; GARCIA; BARBIERI, 1986) e de BCG e LPS, bem como redução, *in vivo*, da migração de leucócitos. De la Fuente et al. (1992) observaram, *in vitro*, aumento da adesão dos macrófagos peritoniais obtidos de camundongos desnutridos; porém, Borelli; Nardinelli (2001) encontraram redução da adesão bem como da expressão de fibronectina em macrófagos.

A desnutrição severa produz diversos efeitos celulares e alguns resultados experimentais indicam perda ou redução na proliferação celular em vários órgãos (ORTIZ; BETANCOURT, 1984; BETANCOURT et al., 1989), sugerindo que a desnutrição pode prolongar o tempo de proliferação das células na medula óssea (ORTIZ; BETANCOURT, 1984).

A medula óssea é constituída por células do tecido hemopoético, células estromais e células acessórias em associação com as macromoléculas da MEC, formando uma estrutura altamente organizada e ricamente vascularizada. Os sinusóides estão separados das células hemopoéticas por uma única camada de células endoteliais e uma rede de células reticulares atua como suporte para a formação dos cordões hemopoéticos. A MO é um reservatório de células tronco hemopoéticas, e sua organização estrutural fornece um microambiente adequado para proliferação e diferenciação de células precursoras e também para a liberação de células sangüíneas diferenciadas para a circulação (COTRAN, KUMAR, COLLINS, 1999; HUTCHISON e DAVEY, 1996).

Em humanos, logo após o nascimento, 90% dos ossos do corpo apresentam medula óssea ativa. Em indivíduos adultos, saudáveis, somente ossos chatos, como crânio, vértebras, pélvis, caixa torácica, clavícula e as partes proximais dos ossos longos mantêm a atividade hemopoética. Os demais ossos têm o espaço medular preenchido por células adiposas constituindo a chamada MO amarela (HUTCHISON; DAVEY, 1996). A celularidade da MO geralmente é expressa como taxa de volume de células hematopoéticas em relação ao volume total do espaço medular (HUTCHISON; DAVEY, 1990).

Segundo Bannerman (1983), a celularidade normal da MO de camundongos adultos ocupa 90 a 96% do espaço medular dos ossos e que, diferentemente dos humanos, mantêm atividade hemopoética, mas estes valores podem variar com a linhagem do camundongo, idade e local da punção (HUTCHISON; DAVEY, 1990). Assim os valores referenciais podem variar entre 25 e 75% (WEISS, 1986).

Considerando que a medula óssea esternal é um tecido hemopoeticamente ativo em condições fisiológicas e que os animais controle apresentaram elevada celularidade, 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 celulares, especialmente das linhagens mielóides.

Hipocelularidade da medula óssea (BORELLI et al., 1995), com evidências histológicas de alteração da matriz extracelular, tem sido observada freqüentemente em desnutrição protéica experimental (XAVIER, 1999). Camundongos desnutridos apresentaram hipotrofia crescente do tecido mielóide em função do grau de desnutrição, destacando-se depleção dos setores eritróides, grânulo-monocíticos e, nos graus mais intensos de desnutrição, depleção também do setor megacariocítico e bloqueio maturativo (XAVIER, 1999). Quanto ao estroma medular, observou-se dilatação sinusoidal progressiva, ocupando grande parte do território medular. A população de células "adipócitos-like" manteve-se, aparentemente, inalterada no desenvolvimento da desnutrição e eventualmente foram observados focos de reação endosteal. Esta hipotrofia foi parcialmente revertida nos animais desnutridos que voltaram a receber ração basal. Contudo, a restituição da celularidade ocorreu de maneira anômala, perdendo-se a relação topográfica entre as diferentes linhagens e, adicionalmente, as células hemopoéticas apresentaram características morfológicas aberrantes, caracterizando um quadro histopatológico de displasia; esses animais apresentaram pancitopenia no sangue periférico (XAVIER, 1999).

O fato de que órgãos que apresentam alta taxa de renovação celular apresentam modificações estruturais em situações de desnutrição protéica provavelmente, devidas ao comprometimento da proliferação celular (FRIED et al., 1978) justificam, pelo menos em parte, a hipocelularidade da medula óssea observada neste estudo. Os mecanismos envolvidos na hipotrofia

encontrada em desnutrição ainda não são completamente compreendidos. Entretanto, alterações hormonais descritas podem desempenhar um papel importante. Por exemplo, níveis aumentados de hormônio do crescimento (GH) foram encontrados em crianças com DPE, com normalização após terapia nutricional e que apresentaram correlação inversa com o nível sérico de albumina (BECKER, 1983). Este aumento de GH pode ser decorrente de mecanismos homeostáticos destinados a otimizar a utilização da pequena quantidade e, ou baixa qualidade de aminoácidos disponíveis para a síntese de proteínas. Contrariamente ao esperado, foram relatados, em condições de DPE, baixos níveis de fator insulina-like (IGF), uma família de citocinas induzida pelo GH (BECKER, 1983). Os mecanismos propostos para justificar estas alterações foram deficiência de síntese protéica no fígado ou secreção de uma molécula de GH anormal e biologicamente inativa, ou ainda a alteração de receptores de GH. Assim como o GH, os níveis de IGF retornaram ao normal após renutrição (BECKER, 1983).

Após administração de GH em animais, saudáveis, jovens, as células da MO apresentaram aumento na síntese de DNA (NAGY; BERCZI, 1989) sendo observado aumento no número de progenitores hemopoéticos, sugerindo que as células da MO sejam um alvo importante para a ação do GH (WELNIAK et al, 2000; WOODY et al, 1999). French (2002) demonstrou que após injeção de GH recombinante houve reversão da hipocelularidade da MO de ratos idosos como consequência do aumento do número de células eritróides e granulocíticas sem, no entanto, afetar suas proporções relativas.

Existem evidências de que o IGF-I atua diretamente em células progenitoras estimulando a hemopoese (FRENCH, 2002). Esta hipótese baseia-se (i) no bloqueio da eritropoese e granulopoese *in vitro* causado pelo anticorpo específico para receptor de IGF-I (MERCHAV, 1998); (ii) na demonstração da expressão de receptores para IGF-I em células precursoras das linhagens B, T e mielóide (BURGESS et al, 1999); (iii) na ausência de receptores para GH em células progenitoras mielóides, mas expressão abundante de receptores para IGF-I nestas células; (iv) na

replicação e diferenciação de células progenitoras mielóides em granulócitos e macrófagos após estímulo *in vitro* com IGF; e (v) na inibição da morte celular pelo IGF-I. Uma vez que níveis reduzidos de IGF foram encontrados em situações de DPE (BECKER, 1983) este pode ser um dos mecanismos envolvidos na hipotrofia medular observada nesta síndrome. Entretanto, há que se considerar a influência de outras alterações hormonais, como a deficiência de hormônios tireoideanos (BECKER, 1983) e sua influência na organização da matriz extracelular (FARWELL; DUBORD-TOMASETTI, 1999).

No presente trabalho, as alterações medulares encontradas, coincidiram com os trabalhos anteriores do grupo, exceto pelo aumento da população de células "adipócitos-like" e de AH, e são semelhantes, ao nosso ver, à degeneração gelatinosa da medula óssea observada em humanos (SEAMAN et al., 1978; SEN et al., 2003; TAVASSOLI et al., 1976). Esta alteração caracteriza-se pela redução de células hemopoéticas, presença de adipócitos e aumento na deposição de substância hialina no espaço extracelular, conferindo-lhe o nome.

A degeneração gelatinosa da medula óssea, descrita inicialmente em pacientes com deficiência nutricional (SEAMAN, et al, 1978; TAVASSOLI, et al, 1976), está mais freqüentemente associada a pacientes com perda de peso e caquexia (BÖHM, 2000), podendo ser encontrada em doenças neoplásicas (BÖHM, 2000; SEN, et al., 2003), alcoolismo, SIDA, doença cardíaca crônica (BÖHM, 2000), infecções crônicas, anemia aplástica (SEN, et al., 2003) entre outras. São poucos os trabalhos relacionando desnutrição e alterações da matriz extracelular. Lyra et al. (1993) avaliaram os efeitos da desnutrição sobre o timo de crianças desnutridas e observaram aumento na densidade da MEC, o que foi considerado responsável pela depleção dos tímócitos. A maioria dos trabalhos publicados sobre degeneração gelatinosa correlaciona a associação entre as doenças e a presença da alteração.

Neste trabalho, utilizamos métodos de coloração histoquímica para caracterizar a natureza da substância hialina presente nas áreas de hipocelularidade da medula óssea de camundongos desnutridos. Estes

métodos permitem a identificação de grupamentos químicos específicos e têm sido considerados adequados para a caracterização histoquímica da degeneração gelatinosa da medula óssea (BÖHM, 2000; SEN, et al., 2003). A reação do PAS foi utilizada visando a identificação de cadeias polissacarídicas neutras, presentes principalmente em glicoproteínas, a coloração de azul de alcian pH 2,5 para identificar a presença de mucopolissacarídeos carboxilados e pouco sulfatados, principalmente ácido hialurônico. Adicionalmente, realizamos a coloração de tricrômico de Masson para a identificação de moléculas de colágeno.

Células do estroma derivado da medula óssea de seres humanos cultivadas *in vitro* sintetizam colágeno I e III (ZUCKERMAN; WICHA, 1983). A presença destes tipos de colágeno foi detectada na matriz extracelular da medula óssea de humanos e de ratos saudáveis (BENTLEY, 1984), mas, em camundongos, o colágeno foi detectado em quantidade relativamente pequena (NILSSON et al., 1998). Neste trabalho, observamos, assim como Nilsson et al (1998), a presença de colágeno apenas na região do endóstio tanto nos animais nutridos quanto nos desnutridos, porém nestes em menor quantidade. A ausência de colágeno na matriz extracelular da medula de camundongos foi confirmada na microscopia eletrônica de transmissão. A diferença na expressão de colágeno na medula de camundongos em relação aos humanos e ratos pode ser atribuída a diferenças relativas à espécie.

Em condições fisiológicas, glicoproteínas e proteoglicanos não são detectados, histoquimicamente, na matriz extracelular da medula óssea (BÖHM, 2002). O ácido hialurônico foi identificado como sendo o principal componente da matriz extracelular nas condições patológicas que cursam com degeneração gelatinosa medular (CORNBLEET et al., 1977; SEAMAN, et al., 1978). Entretanto, existem evidências de que outras substâncias podem fazer parte desta matriz (BÖHM, 2000). Análises quantitativas da MEC da medula óssea de camundongos desnutridos revelaram alterações na proporção de proteínas da MEC, especialmente fibronectina, laminina e trombospondina (VITURI et al., 2000).

Neste trabalho, identificamos, histoquimicamente, a presença de ácido hialurônico como uma das substâncias presente na matriz extracelular da medula hipoplásica. Vários autores consideram que a deposição de AH possa exercer um efeito negativo na eritropoese e assim poderia contribuir para o desenvolvimento da anemia (BÖHM, 2000; SEN et al., 2003). Na avaliação ultra-estrutural observamos a presença de grânulos de PG sulfatados distribuídos heterogeneamente no espaço intercelular ou formando grânulos densos associados à membrana celular, ou muito próximos a ela. Os proteoglicanos associados à membrana celular podem interagir com outros componentes da matriz celular, como a fibronectina, para formar um sistema de regulação da proliferação celular ou para permitir o "homing" de células hemopoéticas (MINGUELL, TAVASSOLI, 1989).

A distribuição de fibronectina e laminina na medula óssea de camundongos saudáveis foi descrita por NILSSON et al. (1998), entretanto não encontramos relatos na literatura sobre as alterações na distribuição destas proteínas em situações de desnutrição. Em nosso trabalho, confirmando os achados de Vituri et al. (2000), observamos, paralelamente ao aumento de AH, aumento na deposição de laminina e fibronectina na medula óssea, *in situ*, de camundongos desnutridos, merecendo destaque a localização das mesmas na região endosteal e subendosteal.

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 hemopoéticas (KLEIN, 1995; MAYANI, 1972), exercendo, dessa forma, papel no controle da hemopoese, e que modificações no microambiente indutivo podem modificar a hemopoese, as alterações encontradas neste estudo podem, ao nosso ver, estar contribuindo para a hipotrofia medular observada nos animais desnutridos e que podem ser decorrentes de mecanismos adaptativos. Estas hipóteses baseiam-se nas diversas atividades biológicas atribuídas às moléculas de fibronectina e laminina, bem como de ácido hialurônico e proteoglicanos, no desenvolvimento da hemopoese.

O início da hemopoese requer eventos moleculares adesivos que permitem que a CTH seja retida na medula óssea, seja pelas interações célula-célula ou célula-MEC (TAVASSOLI; MINGUELL, 1991). Foi demonstrado que a implantação da CTH é dependente de migração intramedular seguida de retenção seletiva em nichos endosteais específicos (NILSSON, 2001). A adesão seletiva de células primitivas ao estroma depende da interação de uma proteína (não descrita pelos autores) expressa na membrana citoplasmática destas células, com sítios específicos de glicoconjugados da membrana de células estromais (TAVASSOLI; MINGUELL, 1991). Porém, outros mecanismos moleculares são necessários para estabilizar a adesão da CTH ao estroma medular. Estes mecanismos envolvem a interação da CTH com a MEC (TAVASSOLI; MINGUELL, 1991).

Acredita-se que a fibronectina desempenhe um papel central tanto na adesão, quanto na migração das células hemopoéticas, particularmente de células precursoras da linhagem eritróide (CLARK et al., 1992; GORDON, 1988; PLATEL; LODISH, 1987; TAVASSOLI; MINGUELL, 1991). A fibronectina é reconhecida por dois receptores, tipo integrina, e que são expressos pelas CTH: VLA-4 e VLA-5. Existem evidências de que estes receptores podem modular, de forma independente, a adesão e a migração de células primitivas e de células progenitoras comprometidas e em fase de divisão, à fibronectina. O VLA-5 está provavelmente envolvido na adesão, mas não na migração, enquanto o VLA-4 está envolvido na migração e não na adesão estática de células primitivas em divisão (GIET et al., 2002). Estes dados sugerem que as células que estão em fase de divisão apresentam maior adesão estática à fibronectina e redução na capacidade de migração através de interações com a FN (GIET et al., 2002). Algumas citocinas, como "stem cell factor", IL-3 e trombopoietina, podem modular a expressão de receptores VLA-4 e VLA-5 (GIET et al., 2002), o que significa que estas citocinas podem regular a interação da CTH à FN, influenciando tanto a adesão quanto a migração de células em divisão.

Os proteoglicanos também podem estar envolvidos no mecanismo de adesão celular de células primitivas. Gordon e seus colaboradores (*apud*

SICZKOWSKI et al., 1992) observaram que células progenitoras da medula óssea obtidas de seres humanos, células formadoras de colônias de blastos (CFC- BI) e pré-unidade formadora de colônias de granulócitos e monócitos (pré UFC-GM), aderem à camada de células estromais derivadas da medula óssea cultivadas *in vitro*, e que UFC-GEMM, UFC-GM, BFU-E não apresentam esta propriedade. Estes pesquisadores demonstraram que a interação das células progenitoras primitivas ao estroma depende da presença de HS-PG na matriz extracelular secretada pelas células estromais e sugeriram a expressão de um receptor para HS como mediador desta interação.

As informações sobre as propriedades adesivas das isoformas de laminina presentes na microambiente medular são escassas, mas existem evidências de que pelos menos uma isoforma de LN pode estar envolvida na adesão de células primitivas. Dentre as isoformas de laminina detectadas na medula óssea de camundongos saudáveis, LN2 ($\alpha 2\beta 1\gamma 1$), LN8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$) e LN10 ($\alpha 5\beta 1\gamma 1$), esta última apresentou propriedade adesiva para células hemopoéticas multipotentes mielóides (FDCP-mix) (GU et al. 1999). Esta função foi atribuída à cadeia $\alpha 5$ desta molécula. As interações da LN com as células hemopoéticas podem ser mediadas via receptores do tipo integrinas. Uma das subunidades destes receptores, a cadeia $\alpha 6$, foi identificada tanto em células hemopoéticas quanto em uma sub-população de células estromais da medula óssea sugerindo a possibilidade de interação entre estas células e a LN (GU et al., 1999).

Após a fixação seletiva da CTH, a hemopoese pode ser modulada via produção de componentes da MEC controlada pelos FCH e outras citocinas (TAVASSOLI; MINGUELL, 1991). Desta forma, a produção de uma ou várias populações de células pode ser estimulada ou inibida com o objetivo de manter a homeostasia do organismo. Nesta etapa do processo de hemopoese, moléculas de sinalização atuam direta ou indiretamente sobre a CTH controlando a proliferação e a diferenciação.

O ácido hialurônico está presente desde a fase embrionária do desenvolvimento orgânico e juntamente com seus receptores, RHAMM e

CD44, desempenham papel importante na organogênese. Uma das funções atribuídas ao AH é a criação de um espaço adequado para a migração celular (SHERMAN et al., 1994). O AH foi considerado como agente inibidor da eritropoese (BHÖM, 2000; SEN, 2003), provavelmente devido à associação entre o aumento da sua deposição e a hipotrofia medular observada na degeneração gelatinosa da medula óssea, mas o mecanismo inibidor não foi comprovado. Entretanto, *in vitro*, o AH apresenta efeito indutor da hemopoese, podendo estimular tanto a linfopoese quanto a mielopoese. Este efeito pode ser explicado pela indução da síntese e liberação de IL-1 e particularmente de IL-6, pois, estas citocinas apresentam ação estimulante sobre as células progenitoras primitivas da medula óssea regulando uma etapa anterior ao comprometimento da CTH (KHALDOYANIDI et al., 1999).

A expressão de HS-PG é induzida durante a diferenciação eritróide e não foi observada durante a diferenciação granulocítica, indicando que o HS apresenta função na diferenciação eritróide, provavelmente por atuar como co-receptor para eritropoetina (DRZENIEK et al., 1999).

Por outro lado, células hemopoéticas murinas primitivas cultivadas *in vitro*, estão ancoradas à camada estromal via interação mediada por CS-PG associado à membrana e também pode promover a interação da célula hemopoética aos componentes da MEC (FN e colágeno I e III) e desta forma constituir um sistema de regulação da proliferação celular (MINGUELL; TAVASSOLI, 1989). Estudos realizados por Yamaguchi mostraram que a proliferação de células de ovário de Hamster chinês (CHO) foi inibida simultaneamente à expressão de decorin recombinante, via inibição da atividade de TGF- β , evidenciando desta forma, a atividade biológica do complexo TGF- β /Decorin (*apud* KRESSE; SCHÖNHER, 2001). Decorin é um membro da família dos PGs pequenos, caracterizada pela presença de cadeias de CS/DS (IOZZO, 1998). Desta forma podemos supor que a expressão de CS-PG associado à membrana das células primitivas da medula óssea possa desempenhar um papel na inibição da proliferação celular via interação com TGF- β .

Os resultados deste trabalho podem ser relevantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia da hipotrofia observada nas doenças que cursam com degeneração gelatinosa da medula óssea. A desnutrição induziu modificações na matriz extracelular da medula óssea, especialmente no endóstio, local de fixação das células tronco e por isso considerado como microambiente indutor da hemopoese. Assim, as modificações histológicas causadas pelo aumento de fibronectina e de laminina e a distribuição de proteoglicanos nessa região, podem, a nosso ver, modificar os processos de interação celular e, portanto, de sinalização, alterando a capacidade de auto-renovação, de proliferação e de diferenciação da célula tronco hemopoética e conduzindo à atrofia medular.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho observamos que, camundongos submetidos à desnutrição protéica, apresentaram as seguintes alterações na medula ossea:

- importante desorganização arquitetural do tecido hemopoético, com modificação nas relações celulares;
- aumento significativo do espaço intercelular, o qual foi preenchido por matriz extracelular;
- presença de fibronectina na região central do espaço medular e marcação mais evidente na região endosteal e perivascular;
- aumento de laminina tanto na região central quanto na região do endóstio;
- ausência de colágeno na matriz extracelular da medula óssea de camundongos, tanto do grupo controle quanto desnutrido, foi comprovada por microscopia eletrônica de transmissão.
- presença de ácido hialurônico nas regiões com redução significativa da celularidade, aparentemente com marcação mais acentuada nas regiões pericelulares;
- presença de grânulos de proteoglicanos sulfatados associados à membrana celular e no espaço intercelular com padrão de distribuição distinto nos animais controles.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, AK et al. **Celular and molecular immunology**. 3ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1997. p. 16-33.
- ABOUD, CN e LICHTMAN, MA. Structure of the marrow. In: BEUTLER E. et al. (eds). **Hematology**. 5 ed. New York: McGraw, 1995.
- ALBERTS, B. et al. Cell junctions, cell adhesion and the extracellular matrix. In: _____ **Molecular biology of the cell**. 3ª ed. New York: Garland, 1994. p. 949-1009.
- ALVES, DC. Desnutrição. In AUGUSTO, ALP et al. **Terapia nutricional**. São Paulo: Editora Atheneu, 1995. p. 220-229.
- ANAGOSTOU, A et al., Effect of protein deprivation on erythropoiesis. *Blood*, v. 50, n. 6, p. 1093-1097, 1977.
- ARAI, K et al. Citokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Ann Rev Biochem*, v. 59, p. 783-836, 1990.
- ASCHENASY, A. On the pathogenesis of anemias and leukopenias induced by dietary protein deficiency. *Am J Clin Nutr*, v.5, n. 1, p.14-25, 1957.
- ASCHENASY, A. Effects of oral desferrioxamine on intestinal absorption of mineral Fe99 and the tissue distribution of this isotope in rats. Erythropoietin-desferrioxamine interaction. *Terapie*, v. 21, n. 4, p. 913-928, 1966a.
- ASCHENASY, A. Influence of dietary protein deficiency on intestinal absorption and on the tissue distribution of absorbed Fe 59 in male rats. Effects of erythropoietin injections. *Rev. Fr. Etud Clin Biol*, v. 11, n. 10, p. 1010-1022, 1966b.
- ATHENS, JW et al. Leukokinetic studies III. The distribution of granulocytes in the blood of normal subjects. *J Clin Invest*, v. 40, p. 159-64, 1961.
- AUGUSTO, ALP. Avaliação nutricional. In: AUGUSTO, ALP. et al. **Terapia nutricional**. São Paulo: Editora Atheneu, 1995. p. 28-37.
- BANNERMAN, RM. Hematology. In: FOSTER, LH et al. (eds) **The mouse in biomedical research**. Normative biology, immunology, and husbandry, v.3. New York: Academic Press, 1983. p.293-303.
- BARON, RB. Desnutrição protéico-calórica. In BENNETT, JC; PLUM, F. **Cecil tratado de medicina interna**. v.1, 20ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 1997. p. 1273-1277.

- BECKER, DJ. The endocrine responses to protein calorie malnutrition. **Ann Rev Nutr**, v.3, p. 187-212, 1983.
- BEISEL, WR. Impact of infection on nutritional status: definition of the problem and objectives of workshop. **Am J Clin Nutr**, v. 20, p. 1206-1210, 1977.
- BELGHITI, J et al. Impaired in vitro bactericidal power of polymorphonuclear leucocytes in patients with protein calorie malnutrition. **Surg Gynecol Obstet**, v. 156, p. 489-492, 1983.
- BELL, R et al. Influence of dietary protein restriction on immune competence II - effect on lymphoid tissue. **Clin Exp Immun**, v. 26, p. 314-326, 1976.
- BENTLEY, SA. Collagen synthesis by bone marrow stromal cells: a quantitative study. **Br J Haematol**, v. 50, n. 3, p. 491-497, 1982.
- BENTLEY, SA et al. Connective tissue elements in rat bone marrow: Immunofluorescent visualization of the hematopoietic microenvironment. **J Histochem Cytochem**, v.32, n. 1, p. 114-116, 1984.
- BESSIS, MC; BRENTON-GORIUS, J. Iron metabolism in the bone marrow as seen by electron microscopy: a critical review. **Blood**, v. 19, n. 6, p. 635-636, 1962.
- BETANCOURT, M et al. Effect of renutrition on cellular proliferation and SCE in bone marrow cells from malnourished rats. **Nutr Rep Int**, v. 40, n. 5, p. 959-964, 1989.
- BHASKARAM, P; SIVAKUMAY, B. Interleukin-1 in malnutrition. **Arch Dis Child**, v. 61, p. 182-185, 1986.
- BHÖM, J. Gelatinous transformation of the bone marrow. The spectrum of underlying diseases. **Am J Sur Pathol**, v. 24, n. 1, p. 56-65, 2000.
- BORELLI, P et al. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. **Nutr Res**, v. 15, n. 10, p. 1477-1485, 1995.
- BORELLI, P et al. Protein malnutrition: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. **Ann Nutr Metab** v. 42, p. 367-373, 1998.
- BORELLI, P; NARDINELLI, L. Protein-calorie malnutrition: decrease in the peritoneal macrophage's respiratory burst. **Bras J Pharm Sci**, v. 37, n. 1, p.51-60, 2001.

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

BRADLEY, SF et al. Monokine production by malnourished nursing home patients. **Gerontology**, v. 36, p. 165-70, 1990.

BROWN, EJ. Adhesive interactions in the immune system. **Trends in Cell Biol**, v. 7, p. 289-295, 1997.

BRUIJN, JA et al. The extracellular matrix in pathology. **J Lab Clin Med**, v. 111, n. 2, p. 140-149, 1988.

BURGUESS, The immune-endocrine loop during aging: role of growth hormone and insulin-like growth factor-I. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, p. 56-68, 1999.

CATCHATOURIAN, R et al., Effect of short term protein deprivation on hemopoietic functions of healthy volunteers. **Blood**, v. 55, n. 4, p. 625-658, 1980.

CERECEDA, FC et al. Detection of malnutrition on admission to hospital. **Nutr Hosp**, v.18, n. 2, p. 95-100, 2003.

CHANDRA, RK. Food antibodies in malnutrition. **Arch Dis Child**, v. 50, n. 7, p. 532-534, 1975.

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

CHANDRA, S; CHANDRA, RK. Nutrition, immune response, and outcome. **Prog In Food Nutr Sci**, v. 10, p. 1-65, 1986.

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

CHANDRA, S; CHANDRA, RK. Nutrition, immunity: lessons from the past and new insights into future. **Am J Clin Nutr**, v. 53, p. 1087-1101, 1991.

CHANDRA, RK. Nutrition and the immune system: an introduction. **Am J Clin Nutr**, v. 66, n. 2, p. 460S-463S, 1997.

CLARK, BR et al. Cell adhesion in the stromal regulation of haemopoiesis. **Baill Clin Haematol**, v. 5, p. 619-652, 1992.

CONGET, P; MINGUELL, J. IL-3 increases surface proteoglycans synthesis in haemopoietic progenitors and their adhesiveness to the heparin-binding domain of fibronectina. **Br J Haematol**, v. 89, p. 1-7, 1995.

CORNEBLEET, PJ et al. A histochemical study of bone marrow hypoplasia in anorexia nervosa. **Virchows Arch A Pathol Anat Histol**, v. 374, n. 3, p. 239-47, 1977.

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

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

DE LA FUENTE, M; MUNOZ, ML. Impairment of phagocytic process in macrophages from Young and old mice by protein malnutrition. **Ann Nutr Metab**, v. 36, n. 1, p. 41-47, 1992.

DEO, MG et al. Nutrition and cellular growth and differentiation. In: _____ **Growth and development of the brain**. Raven Press, 1975. p. 1-16.

DEXTER, TM et al., Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells *in vitro*, **J Cell Physiol**, v. 91, n. 3, p. 335-344, 1977.

DOUGLAS, SD; SCHOPFER, K. Phagocyte function in protein-calorie malnutrition. **Clin. Exp. Immunol.** v. 17, p. 121-128, 1974.

DRABIK, MD et al. Effect of protein depletion and short-term parenteral refeeding on the host response to interleukin 1 administration. **J Lab Clin Med**, v. 119, n. 4, p. 509-516, 1987.

DRZENIAK, Z et al. Heparan sulfate proteoglycan expression is induced during early erythroid differentiation of multipotent hemapoietic stem cells. **Blood**, v. 93, n. 9, p. 2884-2897, 1999.

DZIERZAK, E et al. Qualitative and quantitative aspects of haematopoietic cell development in the mammalian embryo. **Immunol Today**, v. 19, n. 5, p. 228-236, 1998.

EKBLOM, P. Receptors for laminins during epithelial morphogenesis. **Curr Opin Cell Biol**, v. 8, p. 700-706, 1996.

ENGVALL, E; WEWER, UM. Domains of laminin. **J Cell Biochem**, v. 61, p. 493-501, 1996.

FARWELL, AP; DUBORD-TOMASETTI, SA. Thyroid hormone regulates the extracellular organization of laminina on astrocytes. **Endocrinology**, v. 140, n. 11, p. 5014-5021, 1999.

FERNÁNDEZ, M; MINGUELL, JJ. The role of collagen in hematopoiesis. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, n. 9, p. 1201-1207, 1996.

FINCH, CA. Erythropoiesis in protein-calorie malnutrition. In: OLSON, RE. (ED) Protein-calorie malnutrition. New York: Academic Press. 1975. p. 247-256.

FONDU, P et al. Protein-energy malnutrition and anemia in Kivi. **Am J Clin Nutr**, v. 31, p. 46-56, 1978.

FRASSONI, F et al. The relative spatial distribution of erythroid progenitor cells (BFUe and CFUe) in the normal mouse femur. **Cell Tissue Kinet**, v. 15, n. 4, p. 447-455, 1982.

FRENCH, RA et al., Age-associated loss of bone marrow hemopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. **Endocrinology**, v. 143, p. 690-699, 1992.

FRIED, W et al. Effect of protein deprivation on hematopoietic stem cells and on peripheral blood counts. **J Lab Clin Med**, v. 92, n. 2, p. 303-310, 1978.

GALLAGHER, JT. The extended family of proteoglycans: social residents of the pericellular zone. **Curr Opin Cell Biol**, London, v. 1, p. 1201-1218, 1989.

GARCIA, PB. **Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição protéica: análise da mobilização celular e da hematopoiese**. 1992. (Tese de doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GARCIA, PB; BARBIERI, D. Influência da desnutrição protéica sobre a função fagocitária de neutrófilos de ratos. **Arch Latinoam Nutr**, v. 36, p. 662-667, 1986.

GERBERHIWOT, T et al. Erythromegakaryocytic cells synthesize laminina-8 ($\alpha 4\beta 1\gamma 1$). **Exp Cell Res**, v. 254, p. 189-195, 2000.

GIET, O et al. Increased binding and defective migration across fibronectina of cycling hemopoietic progenitor celsss. **Blood**, v. 99, n. 6, p. 2023-2031, 2002

GIETZEN, DW. Neural mechanisms in the responses to amino acid deficiency. **J Nutr**, v. 123, p 610-625, 1993.

GIETZEN, DW; MAGRUM, LJ. Molecular mechanisms in the brain involved in the anorexia of branched chain amino acid deficiency. **J Nutr**, supl. p. 851-855, 2001

GONG, JK Endosteal marrow: a rich source of haemopoietic stem cells. **Science**, v. 199, p. 1443-1445, 1978.

GORDON, MY et al. Compartmentalization of a haemopoietic grow factor (GM-CSF) by glycosaminoglycans in the bone marrow microenvironment. **Nature**, v. 326, n. 26, p. 403-405, 1987.

GORDON, MY. Extracellular matrix of the marrow microenvironment. **Br J Haematol**, v. 70, p. 1-4, 1988.

GORNALL, AG et al. Determination of serum proteins by means of the biuret reations. **J Biol Chem Bethesda**, v. 177, p. 751-766, 1949.

GOYAL, HK. et al., A study of granulocyte adherence in protein calorie malnutrition. **Indian Pediatr**, v. 18, n. 5, p. 287-292, 1981.

GROSS, LR; NEWBERNE, MP. Role of nutrition in immunologic function. **Physiol Rev**, v. 60, p. 188-302, 1980.

GU, Y et al. Characterization of bone marrow laminins and identification of α 5-containing laminins as adhesive protein for multipotent hematopoietic FDCP-mix cells. **Blood**, v. 93, n. 8, p. 2533-2542, 1999.

GUPTA, P et al. Structurally specific heparan sulfates support primitive human hematopoiesis by formation of a multimolecular stem cell niche. **Blood**, v. 92, n. 12, p. 4641-4651, 1996.

HAMILTON, R; CAMPBELL, FR. Immunochemical localization of extracellular materials in bone marrow of rats. **Anat. Rec.** v.231, n. 2, p. 218-224, 1991.

HARALSON, MA; HASSEL, JR. The extracellular matrix – an overview. In:_____ **Extracellular matrix a practical aproach**. Oxford, IRL Press, 1995, p. 1-30.

HARISS, MC et al., Effect of fibronectina on adherence of neutrophil from newborn infants. **J Clin Microbiol**, v. 21, n. 2, p. 243-246, 1985.

HSU, SM et al. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC aand labeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, v. 29, n. 4, p. 577-80, 1981.

HUTCHISON, RE; DAVEY, FR. Hematopoiesis. In: HENRY, JB. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 19ªed. Philadelphia: WB Sanders Company, 1990, p. 594-616.

IOZZO, R. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. **Annu Rev Biochem**, v. 67, p. 609-652, 1998.

KAMPSCHMIDT, RF; UPCHURCH, HF. Possible involvement of leukocytic endogenous mediator in granulopoiesis. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 155, n. 1, p. 89-93, 1977.

KANE, AB; KUMAR, V. Environmental and nutritional pathology. In: COTRAN,RS et al. (eds) **Robbins, pathologic basis of disease**, 6ª ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999. p. 403-457.

KARLSON, P et al. Alimentação. In: _____ **Patobioquímica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, 1982. p. 115-127.

KATCHBURIAN, E; HOLT, SJ. Studies on the development of ameloblasts: Fine structure. **J Cell Sci**, v. 11, p. 415-447, 1972.

KEATING, A; GORDON, MY. Hierarchical organization of hematopoietic microenvironments: role of proteoglycans. **Leukemia**, v. 2, p. 766-769, 1988.

KEENAN, RA et al. An altered response by peripheral leukocytes to synthesize or release leukocyte endogenous mediator in critically ill, protein-malnourished patients. **J Lab Clin Med**, v. 100, n. 6, p- 844-857, 1982.

KHALDOYANIDI, S et al. Hyaluronate-enhanced hematopoiesis: two different receptors trigger the release of interleukin-1 β and interleukin-6 from bone marrow macrophages. **Blood**, v. 94, n. 3, p. 940-949, 1999.

KLASING, KC. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. **J Nutr**, v. 118, p. 1437-1445, 1988.

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

KOCH, M. et al. Characterization and expression of the laminin γ 3 chain: a novel non-basement membrane-associated, laminin chain. **J Cell Biol**, v. 145, p. 605-617, 1999.

KOLSET, SO; GALLAGHER, JT. Proteoglycans in haemopoietic cells. **Biochem Biophys Acta**, v. 1032, p. 191-211, 1990.

KRESSE, H; SCHÖNHERR, E. Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control. **J Cell Physiol**, v. 189, p. 266-274, 2001.

- LAPUSHIN, RW; TRENTIN, J. Identification of stromal elements in erythroid and neutrophil granuloid spleen colonies: light and electron microscopy study. **Exp Haematol**, v. 5, p. 505-522, 1977.
- LAWLER, J; HAYNES, RO. Structural organization of the thrombospondin molecule. **Semin Thromb Hemost**, v. 13, p. 245-254, 1987.
- LEE, GR; HERBERT, V. Nutritional factors in the production and function of erythrocytes. In: LEE, GR et al. **Wintrobe's clinical hematology**, v. 1, 10^a ed, Williams & Wilkins, 1999. p. 228-266.
- LEITMAN, SF; READ, EJ. Hematopoietic progenitor cells. **Semin Hematol**, v. 33, n. 4, p. 341-358, 1996.
- LONG, MW et al. Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules. **J Clin Invest**, v. 90, p. 251-255, 1992.
- LONG, MW; DIXIT, VM. Thrombospondin functions as a cytoadhesion molecule for human hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 75, n. 12, p. 2311-2318, 1990.
- LORD, BI et al. The relative spatial distribution of CFU-s and CFU-c in the normal mouse femur. **Blood**, v. 46, p. 65-72, 1975.
- LYRA, JSPO et al. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. **J Pathol**, v. 171, p. 231-236, 1993.
- MACDOUGALL, LG et al., Mechanisms of anemia in protein-energy malnutrition in Johannesburg. **Am J Clin Nutr**, v. 35, p. 229-235, 1982.
- MACKAY, CR; IMHOF, BA. Cell adhesion in the immune system. **Immunol Today**, v. 14, p. 99-112, 1993.
- MARTINS, GL et al. Padrões hematológicos em grupos de população da zona da mata de Pernambuco. **Rev Bras Pesq Med Biol**, v. 4, n. 4, 1971.
- MAYANI, H et al. Biology of the hemopoietic microenvironment. **Eur J Haematol**, v. 49, p. 225-233, 1992.
- McLAREM, DS et al. The liver during recovery from protein-calorie malnutrition. **J Trop Med Hygiene**, v. 71, p. 174-281, 1968.
- MERCHAV, S. The hemopoietic effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I. **J. Pediatr Endocrinol Metab**, v. 11, p. 677-685, 1998.
- METCALF, D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. **Blood**, v. 67, n. 2, p. 257-267, 1986.

MINER, JH et al. The laminin α chains: expression, developmental transitions and chromosomal locations of α 1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel α 3 isoform. **J Cell Biol**, v. 137, p. 685, 1997.

MOHANDAS, N; PRENANT, M. Three-dimensional model of bone marrow. **Blood**, v. 50, p. 633-643, 1978.

MOORE, MD. Hematology of the mouse (*mus musculus*). In: FELDMAN, B et al. **Schalmis veterinary hematology**. 5ª ed. Lippincott, Williams, Wilkins, p. 1219-1224, 2000.

MORRIS, M; DAVEY, FR. Basic examination of blood. In: HENRY, JB. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 19ª ed. Philadelphia: WB Sanders Company Philadelphia, 1996. Cap. 24, p. 549-593.

MUÑOZ, E et al. Effect of protein deficiency on the lysosomal enzyme activities of the spleen and thymus of weanling rats. **J Nutr**, v. 111, p. 2133-2141, 1981.

NAGY, E; BERECZI, I. Pituitary dependence of bone marrow function. **Br J Haematol**, v. 71, p. 457-462, 1989.

NARDI, NB; ALFONSO, ZC. The hematopoietic stroma. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 5, p. 601-609, 1999.

NATHAN, C; SPORN, M. Cytokines in context. **J Cell Biol**, v. 113, p. 981-986, 1991.

NAUSEEF, WM et al. Role of myeloperoxidase in the respiratory burst of human neutrophils. **Blood**, v. 61, p. 483-492, 1983.

NILSSON, SK et al. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow in situ. **J Histochem Cytochem**, v. 46, n. 3, p. 371-377, 1998.

NILSSON, SK et al. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. **Blood**, v. 97, n. 8, p. 2293-2299, 2001.

OGURI, K et al. Isolation, characterization, and localization of glycosaminoglycans in rabbit bone marrow. **Blood**, v. 70, n. 2, p. 501-510, 1987.

ORTIZ, R et al. Effect of renutrition on the proliferation kinetics of PHA stimulated lymphocytes from malnourished children. **Mutat Res**, v. 334, n. 2, p. 235-241, 1995.

- ORTIZ, R; BETANCOURT, M. Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. **J Nutr**, v. 114, p. 472-476, 1984.
- PATEL, VP; LODISH, HF. A fibronectin matrix is required for differentiation of murine erythroleukaemia cells into erythrocytes. **J Cell Biol**, v. 105, p. 3105-3118, 1987 .
- PETERS, WP et al. Corticosteroid administration and localized leukocyte mobilization in man. **N Eng J Med**,v. 282, p. 342-345, 1972.
- PETERS, WP et al. Fetal expression of hemonectin: an extracellular matrix hematopoietic cytoadhesion molecule. **Blood**, v. 75, p. 375, 1990.
- POTTS, JR; CAMPBELL, ID. Fibronectin structure and assembly. **Curr Opinion Cell Biol**, v. 6, p. 648-655, 1994.
- POTTS, JR; CAMPBELL, ID. Structure and function of fibronectin modules. **Matrix Biol**, v. 15, p. 313-320, 1996.
- RAMDATH, DD et al. Non-hematological aspects of iron nutrition. **Nutr Res Rev**, v. 2, p. 29-50, 1989.
- REDMOND, HP et al. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. **Arch Surg**, v. 126, p. 192-196, 1991.
- REEVES, PG et al. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute. **Am Inst Nutr**, v. 123, p. 1939-1951, 1993.
- REICHLIN, S. Mechanisms of disease: neuroendocrine-immune interactions. **N Eng J Med**, v. 329, n. 17, p. 1246-1253, 1993.
- RODKEY, F.L. Direct spectrophotometric determination of albumin in human serum. **Clin Chem**, v. 1, p. 478, Baltimore, 1965.
- ROSEHDAAL, M; KERNÁCS, T. Regulatory pathways in blood forming tissue with particular reference to gap junctional communication. **Pathol Oncol Res**, v. 6, n. 4, p. 243-249, 2000.
- ROSEN, E et al. Evolution of kwashiorkor and marasmus. **Lancet**, v. 24, n. 2(7878), p. 458, 1974.
- ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancreáticos e estudo de diversos fatores. **Mem Inst Butantan**, v. 20, p. 315-328, São Paulo, 1947.
- SANDERSON, JH; PHILLIPS, CE. Mice. In: _____ **An Atlas of Laboratory animal haematology**. Oxford: Clarendon Press, 1981. Cap. 4, p. 88-93.

- SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells**, v. 4, p. 7-25, 1978.
- SCHOPFER, K; DOUGLAS, SD. Neutrophil function in children with kwashiorkor. **J Lab Clin Med**, v. 88, p. 450-461, 1976.
- SCRIMSCAW, NS. Nutrition and infection. **Prog Food Nutr Sci**, v. 1, p. 393-420, 1975.
- SEAMAN, JP et al. Gelatinous transformation of the bone marrow. **Human Pathol**, v. 9, n.6, p. 685-692, 1978.
- SEIFTER, E. et al. Nutritional responses to feeding L-phenilacetic, shikimic and D-quinic acids in weaning rats. **J Nutr**, v. 101, n. 6, p. 747-754, 1971.
- SEN, A et al. Clinical profile in gelatinous bone marrow transformation. **J Assoc Physicians India**, v. 49, p. 585-588, 2003.
- SHERMAN, L et al. Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. **Curr opinion Cell Biol**, v. 6, p. 726-733, 1994.
- SICZIKOWSKI, M. Binding of primitive hemopoietic progenitor cells to marrow stromal cells involves heparan sulfate. **Blood**, v. 80, n. 4, p. 912-919, 1992.
- SILER, U et al. Characterization and functional analysis of laminin isoforms in human bone marrow. **Blood**, v. 96, n. 13, p. 4194-4202, 2000.
- SINGHAL, V et al. Erythropoiesis in protein deficiency: a ferrokinetic study in male albino rats. **Indian J Exp Biol**, v. 19, n. 6, p. 577-579, 1981.
- SMITH, R; JAMES, WPT. Nutrição: introdução. In: WEATHERALL, DJ et al. **Oxford. Tratado de medicina interna**. v. 1, 2ª ed. Editora Roca, 1992. p. 8.3-8.6.
- SMITH, R; WILLIAMSON, Nutrição: base bioquímica. In: WEATHERALL, DJ et al. **Oxford. Tratado de medicina interna**. v.2, 2ª ed. Editora Roca, 1992. p. 8.7-8.16.
- SOUZA, IP et al. Desnutrição protéica: efeito sobre o espriamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoneais. **Bras J Pharm Sci**, v. 37, n. 2, p.143-151, 2001.
- SPONCER, E et al. Regulation of haemopoiesis in long term bone marrow cultures. IV glycosaminoglycans syntesis and the stimulation of haemopoiesis by xylosides. **J Cell Biol**, v. 96, p. 510-515, 1983.

- STREULI, C. Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. **Curr Opin Cell Biol**, v.11, p. 634-640, 1999.
- SUDA, AK et al. Kinetics of mobilization of neutrophils and their marrow pool in protein-calorie deficiency. **Blood**, v. 48, p. 864-875, 1976.
- TAICHMAN, RS et al. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in in vitro bone marrow cultures. **Blood**, v. 87, p. 518-524, 1996.
- TAVASSOLI, M et al. Gelatinous transformation of bone marrow in prolonged self-induced starvation. **Scandinavian J Haematol**, v. 16, p. 311-319, 1976.
- TAVASSOLI, M; MINGUELL, JJ. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. **P.S.E.B.M.**, v. 196, p. 367-373, 1991.
- TOMKINS, AM. Protein-energy malnutrition and risk of infection. **Proc Nutr Soc**, v. 45, p. 289-304, 1986.
- VICTORIA, JW; HERNANDEZ, VQ. Efecto del estado nutricional de los pacientes sometidos a cirugía eletiva. **Rev. Gastroenterol**, v. 55, p. 207-210, 1990.
- VISVANATHAN, R et al. The nutritional status of 250 older Australian recipients of domiciliary care services and its association with outcomes at 12 months. **J Am Geriatr Soc**, v.51, n. 7, p. 1007-1011, 2003.
- VITURI, CL et al. Alterations in protein of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n.8, p. 889-895, 2000.
- WATERLOW, JC. Malnutrición proteico-energética Washington: Organización Panamericana de la Salud (Publicação científica n° 555), 1996. 501p.
- WEISS, L. The structure of bone marrow functional interrelationships of vascular and hematopoietic compartments in experimental hemolytic anemia: an electron microscopic study. **J Morph**, v. 117, p. 467-538, 1965.
- WEISS, L. **Cells and tissues of the immune system: structure, functions, interactions**. Prentice-Hall Inc. New Jersey, 252 p., 1972.
- WELNIAK, LA et al. Effects of growth hormone and prolactin on hemopoiesis. **Leuk Lymphoma**, v. 38, p. 435-445, 2000.
- WESTEN, H; BAINTON, DF. Association of alkaline-phosphate-positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors. **J Exp Med**, v. 150, p. 919-937, 1979.

WILKINS, BS; JONES, DB. Immunochemical characterization of intact stromal layers in long term cultures of human bone marrow. **Br J Haematol**, v. 90, n. 4, p. 757-766, 1995.

WOOD, MA et al. Use of neuroendocrine hormones to promote reconstitution after bone marrow transplantation. **Neuroimmunomodulation**, v. 6, p. 69-80, 1999.

XAVIER, J.G. **Repercussões estruturais da desnutrição protéica e renutrição em tecidos linfo-hematopoiéticos de camundongos**. 1999. (Tese de doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade de São Paulo, São Paulo, 254p.

YOSHIKAWA, H et al. Costimulation of fibronectin receptor promotes Fc γ R-mediated rescue of IL-3-dependent bone marrow-derived cells from apoptosis. **J Immunol**, v. 156, n. 5, p.1832-1840, 1996.

YURCHENCO, PD; O'REAR, J. Basal lamina assembly. **Curr Opin Cell Biol**, v.6, p. 674-681, 1994.

ZUCKERMAN, KS; WICHA, MS. Extracellular matrix production by the adherent cells of long term murine bone marrow cultures. **Blood**, v. 61, n. 3, p. 540-547, 1983.

ANEXO - PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

1.1 Avaliação hematológica do sangue periférico

1.1.1 ERITROGRAMA

1.1.1.1 Contagem de Hemácias

Método: contagem direta em hemocítômetro

Procedimento: Diluir o sangue com diluente de Gower na proporção 1/200, em tubo de ensaio 12 x 75 mm pipetar 2,0 mL de diluente de Gower e 10 μ L sangue total homogeneizado. Homogeneizar e encher a câmara de Neubauer com um capilar. Deixar em repouso durante 5 minutos em câmara úmida e fazer a contagem das hemácias em 5 dos 25 quadrados do quadrado central da câmara de Neubauer usando a objetiva de 40x.

Cálculo: $\text{hemácias/mm}^3 = \text{n}^\circ \text{ hemácias contadas nos } 5 \mu \times 10.000$

1.1.1.2 Determinação do Hematócrito

Método: microcentrifugação

Procedimento: Encher o tubo capilar com sangue previamente homogeneizado até 2/3 do tubo e fechar a extremidade que não contenha sangue com chama. Centrifugar durante 5 minutos. Para a leitura, colocar o tubo sobre a tabela apropriada. Fazer o menisco inferior coincidir com a linha zero e o menisco superior com a linha 100%. Determinar a linha de separação entre a coluna de hemácias sedimentadas e o plasma, desprezando a fina camada de leucócitos e plaquetas que se forma nesta região. O resultado é expresso em %

1.1.1.3 Dosagem de Hemoglobina

Método: Cianometahemoglobina

Procedimento: Em um tubo de ensaio 15 x 100 mm pipetar

Reagente	Branco	Padrão	Teste
Reagente de Drabkin	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
Padrão	—	10 μ L	—
Amostra homogeneizada	—	—	10 μ L

Homogeneizar e deixar em repouso durante 5 minutos.

Ler a D.O no espectrofotômetro em 540 nm, zerando com o tubo branco.

Cálculos : Hb (g/dl) = Fator de calibração x D.O. teste

Reagentes

Reagente de Drabkin

KH ₂ PO ₄	140 mg
K ₃ (CN) ₆	200 mg
KCN.....	50 mg
Sterox.....	0,5 mL
H ₂ O dest.....qsp.....	1.000 mL

1.1.1.4 Cálculo dos índices hematimétrico

Volume corpuscular médio: VCM (fL)= (Ht/ nº hemácias) x 10

Hemoglobina corpuscular média: HCM (pg)= (Hb/ nº hemácias) x 10

Concentração de hemoglobina corpuscular média: CHCM (%)= Hb/Ht x 100

1.1.1.5 Contagem de Reticulócitos

Método: Coloração supravital com azul de cresil brilhante

Procedimento: Em um tubo de ensaio 12 x 75 mm colocar 50 μ L de sangue colhido com EDTA e acrescentar 25 μ L de Azul de Cresil Brilhante a 1% em solução citrato salino. Homogeneizar e colocar em banho-maria 37°C por 20 minutos. Homogeneizar novamente, fazer esfregaço e deixar secar ao ar.

Contar 5 campos com aproximadamente 200 hemácias, dividir resultado por 10 e expressar o resultado em porcentagem.

Reagentes

Azul de Cresil Brilhante a 1% em citrato salino

Citrato trissódico.....	0,4 g
Azul de cresil brilhante.....	1,0 g
Solução fisiológica (0,85%).....	qsp..... 100 mL

1.1.2 LEUCOGRAMA

1.1.2.1 Contagem de Leucócitos

Método: Contagem direta em hemocítômetro

Procedimento: Em um tubo de ensaio 12 x 75 mm pipetar 380 µL de Líquido de Turk e 20 µL sangue total homogeneizado.

Homogeneizar bem e deixar em repouso por 2 a 3 minutos. Homogeneizar novamente e carregar a câmara de Neubauer. Deixar a câmara em repouso por 3 minutos e contar o número de leucócitos nos 4 quadrados laterais com objetiva de 10x.

Cálculo: $\text{Leucócitos totais / mm}^3 = \text{leuco contados nos 4 } \square \text{ laterais} \times 50$

Reagentes:

Líquido de Turk

Ác. acético glacial.....	20 mL
Azul de cresil brilhante.....	1 mL
H ₂ O dest.....	qsp..... 1.000 mL

1.1.2.2 Coloração de May-Grunwald-Giemsa (MGG) modificado (ROSENFELD, 1947)

Procedimento: Cobrir a lâmina com cerca de 2 mL de corante de Rosenfeld e deixar durante 3 minutos. Adicionar cerca de 2 mL de água destilada previamente fervida e com pH 7,0. Assoprar com pipeta para homogeneizar a solução e deixar corar por 10 minutos. Lavar a lâmina em água corrente,

limpar a parte inferior da lâmina com algodão ou gaze e deixar secar ao ar.
Examinar com objetiva de imersão.

Reagente:

Corante de Rosenfeld

May-Grunwald, eosina azul de metileno.(Merck - Ref.101352).....0,53g
Giemsa, azur-eosina-azul de metileno.(Merck - Ref.109203).....0,97g
Metanol.(Merck - Ref.106009).....1000mL

1.1.3 Solução anticoagulante de EDTA a 10%

EDTA.Na₂ dihidratado...(Merck - Ref.21562).....10g
Água destila...qsp.....100mL

1.2 Processamento histológico

1.2.1 Soluções fixadoras

Formalina tamponada 10%

Na₂HPO₄ (anidro).....3,25g
NaH₂PO₄ (monohidratado).....2,0 g
Água destilada.....450 mL
Formaldeído solução a 37-40%.....50 mL

Paraformaldeído 4% tamponado

- Aquecer ± 50 mL de água MilliQ até 60-70°C
- Adicionar 8 g de paraformaldeído sob agitação (esta solução fica turva mesmo após a agitação)
- Adicionar 3 a 5 gotas de NaOH 1N para clarear a solução
- Completar o volume para 100 mL em balão volumétrico
- Adicionar 100 mL de tampão PBS 0,2M
- Ajustar o pH para 7,3-7,4 antes de completar o volume final

Methacarn

Anexos

Metanol.....	60mL
Clorofórmio.....	30mL
Ácido acético glacial.....	10mL

Bouin

Ácido pícrico 1,2%.....	75mL
Formaldeído 37-40%.....	25mL
Ácido acético glacial.....	5mL

1.2.2 Soluções descalcificadoras

Solução aquosa de Ácido nítrico a 5%

Solução aquosa de Ácido fórmico 4%

Solução aquosa de EDTA 10% pH 7,2

EDTA.Na ₂ dihidrtado.....	100 g
Água destilada....qsp.....	1000mL
Antes de completar o volume final, ajustar o pH em 7,2 com NaOH 1N	

1.2.3 Desparafinização e hidratação de cortes histológicos

Colocar as lâminas nos berços e dar banhos de:

Xilol I por 15 minutos → Xilol II por 10 minutos → Xilol / álcool 50% por 5 minutos → Álcool absoluto por 5 minutos → Álcool 95% por 5 minutos → Álcool 70% por 5 minutos → Tampão PBS 0,02M pH 7,2 por 5 minutos.

1.3 Protocolo para imuno-histoquímica de fibronectina e laminina

- **Desparafinização e hidratação dos cortes histológicos**

- **Bloqueio da peroxidase endógena**

Cobrir os cortes com H₂O₂ 3% (comercial) e colocar no escuro por 30 min.

- **Incubação com Anticorpo primário**

Para marcação de fibronectina, cobrir cada corte com 40-50 µl de anticorpo anti-fibronectina (Dako A0245) diluído 1:400 e incubar em câmara úmida a 4°C "overnight" e lavar com PBS por 5 min - 2 vezes.

Para marcação de laminina, cobrir cada corte com 40-50 µl de anticorpo anti-laminina (Dako Z0097) diluído 1:25 e incubar em câmara úmida a 4°C "overnight" .

Lavar com PBS por 5 min - 2 vezes

- **Incubação com anticorpo secundário**

(Kit StreptABComplex/ HRP duet mouse/rabbit - Dako K-0492)

a) Cobrir cada corte com 40 ul de Reagente C (anticorpo secundário biotinilado) diluído 1:100 em PBS pH 7,2 e incubar meia hora à temperatura ambiente em câmara úmida.

b) Lavar com PBS por 5 min - 2 vezes

c) Cobrir cada corte com 40 ul de Reagente AB diluído 1:100 em PBS pH 7,2 (preparar pelo menos 15 minutos antes do uso) e incubar por meia hora à temperatura ambiente em câmara úmida

d) Lavar com PBS por 5 min - 2 vezes

- **Revelação com DAB 0,05%**

Preparar no momento do uso:

DAB (Sigma D-5637).....	2,5 mg
Tampão PBS 0,02M.(pH7,2).....	5,0 mL
H ₂ O ₂ PA (30%).....	7,5 uL

Cobrir os cortes com a solução acima, incubar por 5 min e lavar 2x em PBS.

- **Contracoloração**

Mergulhar as lâminas em hematoxilina de Harrys por 30 a 60 segundos e lavar em água corrente para retirar o excesso de corante.

- **Desidratação e Montagem**

Álcool 70% / 5 min → Álcool 90% / 5 min → Álcool absoluto / 5 min
Colocar uma gota de Entelan® sobre a lâmina e cobrir com lamínula.

1.3.3 Reagentes

Tampão PBS 0,2 M pH 7.2 (10x concentrado)

NaH ₂ PO ₄ monohidratado.....	3,9 g
Na ₂ HPO ₄ .dodecahidratado.....	26,5 g
NaCl.....	81,7 g
Água destilada.....qsp.....	1000 mL

Ajustar o pH em 7,2 antes de completar o volume final.

Tampão PBS 0,02M pH 7.2 (Solução de uso)

PBS 0,2M.....	100 mL
Água destilada.....	900 mL

Conferir o pH e ajustar em 7.2 , se necessário.

Solução diluente para anticorpo primário

Azida sódica 5%

Azida sódica.....	0,25g
Água destilada.....	5,0 mL

Albumina bovina fração V 5%

Albumina.....	0,25 g
Água destilada.....	5,0 mL

Solução Diluente

Tampão PBS 0,02M.....	12 mL
Azida sódica 5%.....	0,5 mL
Albumina bovina 5%.....	0,25mL

1.4 Coloração citoquímica para Peroxidase

Método de GRAHAM modificado

Procedimento

Colocar 1,0 mL da solução I sobre a lâmina a ser corada e deixar por 3 minutos. Adicionar 1,0 mL de solução II e deixar mais 5 minutos. Lavar a lâmina delicadamente com água corrente, secar ao ar e contracorar pelo corante panótico.

Interpretação

Os grânulos de peroxidase apresentam uma coloração que varia do amarelo esverdeado ao marrom escuro.

Reagentes

Solução I

Benzidina purificada.....0,3g
Álcool etílico.....99mL
Adicionar 1,0.mL de solução saturada de nitroprussiato de sódio

Solução II

H₂O₂ 10 volumes (comercial a 3%).....0,1mL
Água destilada.....10,0mL

Solução saturada de Nitroprussiato de sódio

Nitroprussiato de sódio.....3,6g
Água destilada.....qsp.....100mL
Conservar esta solução em frasco escuro a 4°C

1.5 Análise histomorfométrica medular em sistema computadorizado de análise de imagens

Seqüência para ligar os equipamentos do sistema de análise de imagens da FCF/USP:

Impressora → microscópio → câmara de video → computador.

Programa Image- Pro Plus versão 3.0 (Media Cybernetics)

Abriu o programa e iniciou a captura de imagens através da câmara digital utilizando as ferramentas abaixo a partir da barra de menus ou de janelas:

- Start preview: a imagem aparece na tela
- Snap: congela a imagem focalizada
- Stop preview: fecha a janela da imagem, permanece a imagem congelada
- Equilize: balanço de cores e brilho, usar quando necessário,
- Measure → Calibration → Spatial → selecionar a calibração conforme a objetiva em uso
- Measure → Count/Size → Manual → Select colors → Segmentation → histogram based: definir as classes de cores para a marcação utilizando a ferramenta pincel → Preview all → Input/output → histogram based → Foreground → All ranges → Make mask → Measure → histogram : anotar os resultados ou exportar para o excel.

Obs:

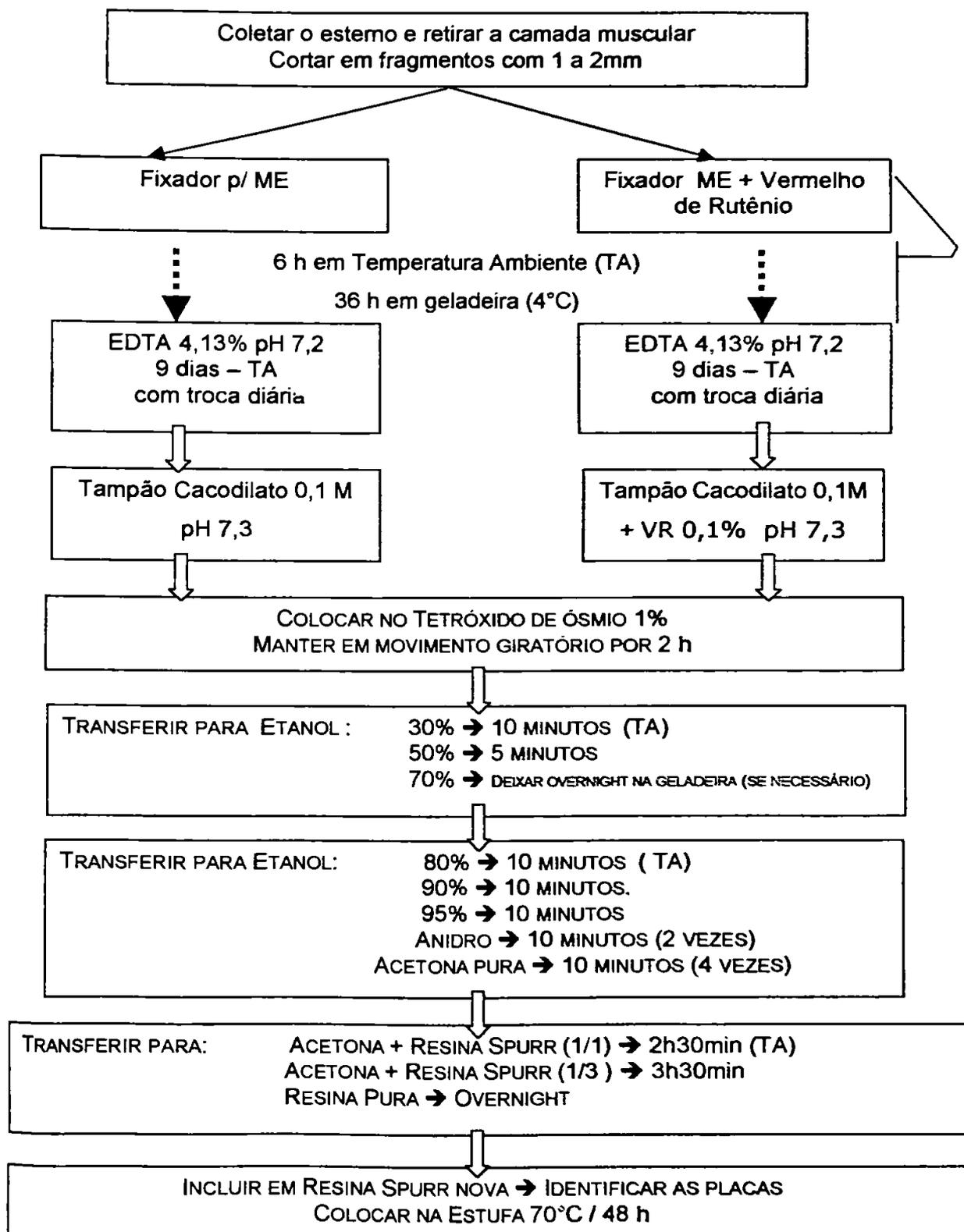
Color segmentation: separa a cor ou cores desejadas

Make mask: torna a separação de cores permanente

Foreground: remove toda a área, exceto aquelas que estão marcadas usando o grupo de seleção de cores.

1.6 PROTOCOLO PARA IDENTIFICAÇÃO DE PROTEOGLICANOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Procedimento:



Reagentes

Tampão Cacodilato de Sódio 0,1 M / pH 7,4

Ácido cacodílico.....2,14 g
Água Milli Q.....qsp.....100 mL

Obs.: O pH desta solução varia de 8 a 9. Ajustar o pH em 7,4 com HCl 0,2 N
Estável por 2 a 3 dias.

Formaldeído 20%

Paraformaldeído.....2,0 g
Água Milli Q.....10 mL
Aquecer até ± 60 ou 70°C e acrescentar ± 12 gotas de NaOH
Preparar no dia do uso.

Glutaraldeído 25%, Grau I – para microscopia eletrônica

Pronto para uso Sigma G-5882.

Fixador para Microscopia Eletrônica

Formaldeído 20%.....1,5 mL
Glutaraldeído 25%.....1,0 mL
Tampão cacodilato 0,1M.....10 mL

Preparar no dia do uso e Ajustar o pH em 7,4.

Fixador para Microscopia Eletrônica + Vermelho de Rutênio 0,2%

Formaldeído 20%.....1,0 mL
Glutaraldeído 25%.....1,5 mL
Tampão cacodilato 0,1M.....10 mL
Vermelho de rutênio.....0,025 g

Preparar no dia do uso e Ajustar o pH em 7,4.

Tampão Cacodilato 0,1 M + Vermelho de Rutênio 0,1% - pH 7,3

Vermelho de Rutênio.....0,1 g
Tampão cacodilato 0,1 M.....qsp.....100 mL

Ajustar o pH para 7,3

EDTA 4,13% pH 7,2

EDTA.Na ₂ dihidrtado.....	41,3g
NaOH.....	43,6g
Água destilada.....qsp.....	1000mL

Antes de completar o volume final, ajustar o pH em 7,2

Tetróxido de Ósmio 1%

Tetróxido de ósmio.....	0,1 g
Tampão cacodilato 0,1 M.....	10 mL

Resina Spurr

ERL (VCD).....	10 g
DER.....	4,5 g
NSA.....	26 g
S-1 ou DMAE.....	0,4 g