

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

Avaliação dos efeitos modulatórios e mecanismos do fragmento sintético de leptina LEP5 na regulação da hematopoiese de camundongos submetidos à desnutrição proteica

Carolina Carvalho Dias

São Paulo

2019

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

Avaliação dos efeitos modulatórios e mecanismos do fragmento sintético de leptina LEP5 na regulação da hematopoiese de camundongos submetidos à desnutrição proteica

Carolina Carvalho Dias

Versão Original

Tese para obtenção do título de  
DOUTOR.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo  
Ambrósio Fock

Co-Orientador: Prof. Dr. Edgar Julian  
Paredes Gamero

Colaborador: Prof. Dr. Antonio de  
Miranda

São Paulo

2019

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

**Ficha Catalográfica**

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

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:  
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Dias, Carolina Carvalho  
D541a Avaliação dos efeitos modulatórios e mecanismos do fragmento sintético de leptina LEP5 na regulação da hematopoese de camundongos submetidos à desnutrição protéica / Carolina Carvalho Dias. -- São Paulo, 2019.  
140p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental.  
Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio  
Co-orientador: Gamero, Egar Julian Paredes  
Colaborador: Miranda, Antonio

1. Desnutrição. 2. Células tronco hematopoiéticas. 3. Leptina I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador. III. Gamero, Egar Julian Paredes, co-orientador. IV. Miranda, Antonio, Colaborador.

**Carolina Carvalho Dias**

Avaliação dos efeitos modulatórios e mecanismos do fragmento sintético de leptina LEP5 na regulação da hematopoiese de camundongos submetidos à desnutrição proteica

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do grau de Doutor

---

*Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock*

---

*1° Examinador*

---

*2° Examinador*

---

*3° Examinador*

---

*4° Examinador*

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2019.

***“Dono de toda ciência, sabedoria e poder,  
oh dá-me de beber, da água da fonte da vida”***

**Preto no Branco**

## **Dedicatória**

***Para todas as pessoas que um dia,  
usufruirão desta pesquisa.***

## **Agradecimentos**

Ao *Senhor!* Foi uma jornada muito especial. Agradeço por tudo o que Você é na minha vida! A *minha família*, por investirem desde cedo em mim e em estudos. Também, minha *tia Leila Camargo* e *tia Marilene Arrais*, além das minhas *primas*. Obrigada por sempre me amarem, receberem e apoiarem.

Ao *Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock*. Existem poucas pessoas que levo para minha vida como exemplos de algumas coisas. Aprendi muito sobre como ser um bom líder e humano, ao mesmo tempo. Este tempo intenso sob seus cuidados e responsabilidade me deixou constrangida, pelo cuidado e dignidade distribuídos para todas suas alunas. Não existem palavras que podem expressar tudo o que foi vivenciado nestes últimos 4 anos. Foi muito significativo tudo o que vivi no meu doutorado. Obrigada por tudo, minha eterna gratidão. Você é um líder incrível!

Ao meu co-orientador *Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero*, obrigada por me ensinar a fazer ciência. Ao meu colaborador *Prof. Dr. Antonio de Miranda*, obrigada por ser 'a frente do seu tempo'. Você abriu meus olhos para novos horizontes e isto me inspira!

A *Dra. Jackeline Beltran* e *Dra. Amanda Nogueira*, especialmente, por caminharem comigo nestes últimos anos e em uma nova e brilhante jornada. A todas pessoas que passaram pelo laboratório de *Hematologia Clínica da FCF/USP*. Cada um me ajudou de maneira especial. Muito obrigada a todos pela companhia e carinho desde sempre. Em especial, ao nosso querido técnico *Edson Naoto Makiyama*, sempre disposto a ajudar e "caminhar mais uma milha". Certamente, não há palavras para agradecer por isto! A todas as pessoas do laboratório de *Medula Óssea e Células Tronco da UNIFESP*. Pela troca de informações, reagentes e pelo carinho na caminhada.

Aos *meus amigos da Hillsong SP*, pelo incentivo. Em especial, ao *Ronald, Fabiana, André e Débora*. A *Dra. Carmen Mastroso*, por me ensinar a viver cada dia!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de doutorado processo nº 2015/04438-6, no apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

# SUMÁRIO

<b>ABREVIACÕES</b>	xii
<b>RESUMO</b>	xiii
<b>ABSTRACT</b>	xiv
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
1.1 Um desafio para a humanidade, em pleno século 21	15
1.1.1 Pobreza	15
1.1.2 Fome	16
1.1.3 Refugiados: uma nova realidade	17
1.1.4 Brasil como um bom exemplo	17
1.2 Desnutrição: um novo conceito em um novo contexto	18
1.2.1 Desnutrição e suas terminologias	19
1.2.2 Quais efeitos da desnutrição proteica na hematopoiese?	20
1.3 Entendendo o processo hematopoiético	21
1.3.1 O Microambiente Medular	24
1.4 Leptina: descoberta e seus diferentes papéis	27
1.4.1 Leptina e a desnutrição proteica	30
1.4.2 Fragmentos sintéticos de leptina, uma nova perspectiva em casos de desnutrição	31
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO</b>	33
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	35
3.1 Reagentes	35
3.2 Soluções	36
3.2.1 Solução Salina Tampão Fosfato (PBS - Phosphate Buffer Saline)	36
3.2.2 Solução tampão para ligação de Anexina-V com a Fosfatidilserina	36
3.2.3 Solução Hipotônica e Solução Hipertônica	36
3.2.4 PBS + Albumina 1% + Azida 0,05%	36
3.2.5 Tampão EDTA 1M	36
3.2.6 Líquido de Turk	36
3.2.7 Etanol 70%	37
3.2.8 Solução BD FACS™ lysing (1X)	37
3.2.9 Solução de Glicina 1M	37
3.2.10 Solução de Triton X-100 (0,001%)	37
3.2.11 Solução de Saponina	37
3.2.12 Solução de Paraformaldeído 2%	37
3.2.13 Meio Dulbecco modificado por Iscove (IMDM)	37
3.3 Animais e indução da desnutrição	37
3.3.1 Composição das rações	39
3.4 Determinação dos parâmetros bioquímicos	39
3.5 Sequência do fragmento sintético peptídico de leptina LEP5	39
3.6 Hemograma	39
3.7 Diferencial de leucócitos	39
3.8 Coleta das células hematopoiéticas	40
3.8.1 Medula óssea	40
3.8.2 Sangue Periférico	40



3.8.3 Baço	40
3.8.4 Timo	41
3.9 Imunofenotipagem para quantificação das populações celulares	41
3.9.1 Marcadores utilizados para a Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo	42
3.10 Determinação da viabilidade celular nas células totais da medula óssea	42
3.11 Determinação da viabilidade celular nas células tronco hematopoéticas	43
3.12 Análise do ciclo celular nas células totais da medula óssea	43
3.13 Análise do ciclo celular nas células tronco hematopoéticas	44
3.14 Ensaio de formação de colônias de granulócitos e macrófagos	44
3.15 Anatomopatológico do osso esterno, rim, fígado e baço	44
3.16 Dosagem de citocinas na medula óssea	45
3.17 Dosagem de citocinas circulantes	45
3.18 Expressão da via de sinalização p-JAK2 nas células tronco hematopoéticas	46
3.19 Expressão de proteínas ativadas nas células tronco hematopoéticas	46
3.20 Quantificação da molécula do nicho hematopoético LEPR	47
3.21 Avaliação de espécies reativas de oxigênio por DCFH+	48
3.22 Isolamento das células primitivas c-Kit+ e avaliação do cálcio intracelular nas células primitivas	49
3.23 Estudo da degradação enzimática	49
3.24 Avaliação após tratamento com leptina sintética humana, nas células tronco hematopoéticas	50
3.25 Avaliação após tratamento com G-CSF	50
3.26 Quantificação dos reticulócitos	51
3.27 Análise Estatística	51
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>52</b>
4.1 Avaliação do estado nutricional e determinação do consumo de ração	52
4.2 Avaliação do perfil bioquímico, após tratamento com fragmento sintético LEP5	53
4.3 Avaliação do perfil hematológico, após tratamento com fragmento sintético LEP5	54
4.4 Avaliação do diferencial de leucócitos, após tratamento com fragmento sintético LEP5	55
4.5 Análise da produção de citocinas no soro do sangue periférico, após tratamento com fragmento sintético LEP5	56
4.6 Análise da modulação nas populações primitivas e progenitoras, após tratamento com o fragmento sintético de leptina LEP5	57
4.7 Análise da modulação nas populações progenitoras linfóides e mielóides, após tratamento com o fragmento sintético de leptina LEP5	58
4.8 Análise da modulação nas populações linfocíticas T, B, NK e mielóides maduras, após o tratamento com o fragmento sintético de leptina LEP5	59
4.9 Avaliação das CFU-GM, após estímulo com fragmento sintético LEP5	61
4.10 Análise do ciclo celular, após o tratamento com o fragmento sintético de leptina LEP5	62
4.11 Análise da viabilidade celular, após o tratamento com o fragmento sintético de leptina LEP5	63
4.12 Análise da produção de citocinas no lavado medular, após tratamento com fragmento sintético de leptina LEP5	64
4.13 Análise das células esplênicas nas populações linfocíticas T, B, NK e populações mielóides maduras, após o tratamento com fragmento sintéticos de leptina LEP5	65
4.14 Análise da modulação nas populações mielóides do sangue periférico, após o tratamento com fragmento sintético de leptina LEP5	66
4.15 Análise da modulação nas células tímicas, após o tratamento com fragmento sintético de leptina LEP5	67
4.16 Análise histológica da medula óssea, após tratamento com LEP5	68

4.17 Análise histológica de rim, após tratamento com o fragmento LEP5	70
4.18 Análise histológica do fígado, após tratamento com o fragmento LEP5	71
4.19 Análise histológica do baço, após tratamento com o fragmento LEP5	72
4.20 Avaliação da viabilidade celular nas CTHs, após tratamento com o fragmento LEP5	73
4.21 Avaliação do ciclo celular nas CTHs, após tratamento com o fragmento LEP5	74
4.22 Análise da expressão de p-JAK2, após estímulo com LEP5	75
4.23 Análise da expressão das proteínas sinalizadoras, a partir da via de sinalização p-JAK2	76
4.24 Avaliação da expressão de LEPR+ nas CTHs, após tratamento com LEP5	77
4.25 Avaliação da liberação de espécies reativas de oxigênio nas CTHs, após tratamento com o fragmento sintético de leptina LEP5	78
4.26 Análise dos níveis de Ca <sup>2+</sup> intracelular nas células c-Kit+, após estímulo com LEP5	79
4.27 Análise da modulação nas populações primitivas e progenitoras, após tratamento leptina sintética humana	80
4.28 Ensaio de degradação enzimática do fragmento sintético LEP5	81
4.29 Análise da modulação nas populações hematopoiéticas medulares, sob efeito do tratamento com o fragmento LEP5, em comparação com o G-CSF	82
4.30 Quantificação de reticulócitos, após tratamento com o fragmento sintético de leptina LEP5	83
<b>5. DISCUSSÃO</b>	84
<b>6. CONCLUSÕES GERAIS</b>	105
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS</b>	106
<b>8. ANEXOS</b>	124
8.1 Composição das rações	125
8.2 Estratégia de Análise	126
8.3 Protocolo do Comitê de Ética	129
8.4 Ficha do Aluno	130
8.5 Currículo Lattes	133

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Representação do perfil hematológico.	55
Tabela A. Composição das dietas.	125
Tabela B. Composição da Mistura Vitamínica.	125
Tabela C. Composição da Mistura Salínica.	125

## ABREVIATÖES

<b>Ac</b>	Acetilado
<b>APC</b>	Alofococianina
<b>BSA</b>	Albumina bovina
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de cálcio
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	Cálcio
<b>CFU-GM</b>	Unidades Formadoras de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
<b>c-Kit</b>	Marcador de População Primitiva Hematopoiética
<b>CTH</b>	Células troncos hematopoiéticas
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
<b>ERK1/2</b>	Quinase Regulada por Sinal Extracelular do tipo 1 e 2
<b>FITC</b>	Fluorocianina Isotiocianina
<b><sup>18</sup>F</b>	Flúor
<b><sup>68</sup>Ga</b>	Gálio
<b>GRB2</b>	Proteína 2 Ligada a Receptor de Fator de Crescimento
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IMDM</b>	Meio Dulbecco modificado por Iscove
<b>JAK2</b>	Janus Quinase do tipo 2
<b>KCl</b>	Cloreto de potássio
<b>kDa</b>	Kilodaltons
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato Monopotássico
<b>M</b>	Molar
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato Dissódico
<b>NH<sub>2</sub></b>	Amidado
<b>NK</b>	Célula Natura Killer
<b>PBS</b>	Solução Salina Tampão Fosfato
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PE-Cy7</b>	Ficoeritrina-Ciano 7
<b>RAF</b>	Proteína Cinase Serina/Treonina
<b>RAS</b>	Vírus do Sarcoma de Rato
<b>7AAD<sup>+</sup></b>	Corante de DNA
<b>SFB</b>	Soro Fetal Bovino
<b>SHP2</b>	Proteína Tirosina Fosfatase do tipo 2
<b>SOCS3</b>	Supressor de Sinalização de Citocina do tipo 3
<b>STAT3</b>	Proteína Transdutora de Sinal e Transcrição do tipo 3

## RESUMO

A desnutrição é um distúrbio nutricional caracterizado pela ingestão inadequada de alimentos ou nutrientes. Estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que a desnutrição proteica provoca alterações hematológicas como a anemia e leucopenia, bem como alterações quantitativas e estruturais no microambiente medular. Dentre as diversas moléculas que possuem ação na regulação metabólica e energética do organismo e também na hematopoiese, a leptina tem surgido como uma forte candidata. Desta forma, estudos relacionados com fragmentos sintéticos de leptina, têm sido de grande importância, pois são fáceis de serem produzidos e de baixo custo. Estudo anterior com o fragmento sintético de leptina modificado, demonstrou sua bioatividade ao modular a proliferação de células tronco hematopoiéticas. Sabendo que o sistema hematopoiético do modelo animal de desnutrição proteica é extensivamente comprometido, estudou-se os efeitos modulatórios deste fragmento LEP5 na hematopoiese. Os resultados demonstram que o fragmento sintético LEP5, em modelos animais de desnutrição protéica, é capaz de: (I) modular positivamente o sistema hematopoiético dos animais desnutridos (dado confirmado através da análise do ciclo celular, citotoxicidade medular e hemograma), além de apresentar capacidade clonogênica (aumentando a quantidade de *CFU-GM*); embora, não fora possível observar modulações nas células esplênicas. (II) O ensaio bioquímico não revelou alterações dos parâmetros avaliados, neste modelo animal, quando em comparação com grupo de animais desnutridos. (III) A quantificação das citocinas circulantes e no lavado medular, não apresentaram alterações. (IV) A proteína *p-JAK2* (principal via de sinalização da leptina) foi ativada. (V) A análise histopatológica medular, confirma os resultados encontrados a partir da modulação positiva observada pelo fragmento, no modelo de desnutrição proteica. No entanto, a análise histopatológica do rim, baço e fígado, denotam em quadro inflamatório agudo provocado pelo tratamento. (VI) O perfil hematológico, confirma os resultados obtidos através do hemograma e recuperação do quadro de anemia. A análise imunofenotípica do timo e do sangue periférico, revelam indução positiva pelo tratamento. Ademais, as análises do ciclo celular e a viabilidade celular nas células tronco hematopoiéticas, confirmam resultados da modulação positiva, observada na medula óssea. Houve também, aumento da expressão de *LEPR<sup>+</sup>*, nas CTHs de modelos desnutridos tratados como LEP5 e aumento do  $Ca^{2+}$  intracelular. (VII) O peptídeo não degrada rapidamente em soro bovino, após análise por espectrometria de massa e demonstra estabilidade do fragmento e por fim, o tratamento não leva ao estresse oxidativo. Portanto, a potencialidade terapêutica do fragmento LEP5, foi demonstrada.

**Palavras-Chaves:** 1. Desnutrição. 2. Células tronco hematopoiéticas. 3. Leptina.

## ABSTRACT

Malnutrition is a nutritional disorder characterized by inadequate intake of food or nutrients. Previous studies in our group have demonstrated that protein malnutrition causes hematological changes such as anemia and leukopenia, as well as quantitative and structural changes in the medullary microenvironment. Among the several molecules that have action in the metabolic and energetic regulation of the organism and also in hematopoiesis, leptin has emerged as a strong candidate. Thus, studies related to synthetic fragments of leptin have been of great importance because they have a low cost and are easier to produce. A previous study with modified synthetic leptin fragment, demonstrated its bioactivity by modulating hematopoietic stem cell proliferation. Knowing that the hematopoietic system of the animal model of protein malnutrition is extensively compromised, we studied the modulatory effects of this fragment (LEP5) on hematopoiesis. The results demonstrate that the synthetic fragment LEP5, in protein malnutrition animal models, is able to: (I) Positively modulate the hematopoietic system of malnourished animals (confirmed by analysis cell cycle, medullar cytotoxicity and hemogram), clonogenic capacity (increasing the amount of *GM-CFU*); although, it was not possible to observe modulations in splenic cells. (II) The biochemical test revealed no alteration of the parameters evaluated in this animal model, when compared to the group of malnourished animals. (III) Quantification of the cytokines currents and medullary supernatant were not altered. (IV) The *p-JAK2* protein (main leptin signaling pathway) was activated. (V) Histopathological analysis confirms results found from the positive modulation observed by the fragment in the model of protein malnutrition. However, the kidney, spleen and liver histopathological analysis, denote an acute inflammatory condition by the treatment. (VI) The hematological profile confirms the results obtained by hemogram and anemia recovery. Immunophenotypic analysis of thymus and peripheral blood reveals positive induction by treatment. In addition, cell cycle analysis and cell viability in hematopoietic stem cells confirm positive modulation results observed in the bone marrow. There was also an increase in the expression of  $LEPR^+$ , in HSC, of the malnourished models treated, with LEP5 and increase intracellular  $Ca^{2+}$ . (VII) Finally, after mass spectrometric analysis, the peptide does not degrade rapidly in bovine serum which demonstrates stability of the fragment, as the treatment does not lead to oxidative stress. Thus, the therapeutic potential of the LEP5 fragment has been demonstrated.

**Keywords:** 1. Protein malnutrition. 2. Hematopoietic Stem Cells. 3. Leptin.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *Um desafio para a humanidade, em pleno século 21*

A humanidade sempre enfrentou inúmeros desafios ao longo dos séculos. Após a Segunda Guerra Mundial, por exemplo, a questão da saúde foi pauta de diversas discussões. Naquele tempo, entendia-se que o desenvolvimento de um país estava intimamente ligado ao crescimento econômico e também na propagação da vida. E isto só poderia ser realizado, à partir de melhorias na saúde. Neste contexto, nos anos 70 países que investiram na atividade industrial, observaram mudanças significativas e positivas no quadro da Saúde Pública (BOROWY, 2013).

A vivência oposta destes princípios, também prejudicou uma parcela da humanidade. Desafios não apenas econômicos, mas políticos também de terras férteis e escassez de profissionais (principalmente no continente africano), ceifaram e têm ceifado a vida milhares de indivíduos ao longo dos séculos (FIENO *et al.*, 2016).

O grande questionamento hoje é, por que em pleno século 21 ainda temos problemas como a desnutrição?

Porém, antes de compreender os prejuízos relacionados à desnutrição, faz-se necessário falar sobre questões globais que fazem parte deste contexto.

#### 1.1.1 *Pobreza*

O conceito de pobreza, incide no fato de um indivíduo estar cerceado dentro de uma sociedade. Ou seja, é quando a qualidade do bem-estar deste indivíduo é inferior ao padrão estabelecido pela sociedade em que habita, em decorrência de inúmeras privações (NAÇÕES UNIDAS DO BRASIL, 2017).

O 'Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas' em 2018 disponibilizou um relatório estatístico chamado 'Índice Global da Pobreza Multidimensional'. Este estudo aferiu os indicadores de privação, em 105 países do globo terrestre. Os dados mais alarmantes destacados foram do Sul da Ásia e da África Sub-saariana. No primeiro caso, constatou-se que 546 milhões de indivíduos, vivem em situação de extrema pobreza, e no segundo mais de 560 milhões de pessoas enquadram-se também neste situação (UNDP, 2018). No mundo, foram identificados mais de 1,3 bilhões de pessoas vivendo em uma situação de pobreza multidimensional (OPHI, 2018).

Este relatório destaca que não é apenas um tipo de privação econômica, mas sim, um tipo de privação multidimensional que interfere na saúde, no padrão de vida e

na educação (UNDP, 2018). Entretanto, de modo geral, este tipo de privação refere-se à falta de saneamento básico, água potável, aumento da mortalidade infantil, falta de eletricidade, problemas relacionados à habitação, entre outros. Outro dado lamentável foi que uma em cada seis pessoas - entre idosos com 70 anos, ou crianças - apresentam quadro de subnutrição, conceito que será explorado mais adiante (UNDP, 2018).

Não obstante, ainda que estes dados sejam alarmantes e desafiadores, o 'Índice Global da Pobreza Multidimensional', prevê ações de redução da pobreza até 2030, por meio de ações mais diretas principalmente de Organizações, Agências de Apoio e disseminação desenvolvimento científico (UNDP, 2018), que promovam melhorias na saúde.

### *1.1.2 Fome*

O conceito de fome trata-se de um estímulo ou efeito comportamental, cognitivo e individual. Já este conceito pela 'Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura', tange no fato de um indivíduo não ter acesso ao alimento que comporte a necessidade mínima de energia por um período de um ano (FAO, 2017).

O 'Índice Global da Fome' em 2018 disponibilizou um estudo identificando o nível da fome e da subnutrição. Foram identificados 12,3% de pessoas no globo que sofrem de subnutrição, em um contexto de desnutrição infantil e de mortalidade infantil. Em 16 países, apuraram que não houve melhoras destes índices, ao longo dos últimos anos (GHI, 2018).

O 'Observatório de Saúde Global' da Organização das Nações Unidas em 2017, destacou que 151 milhões de crianças abaixo dos 5 anos são raquíticas (WHO, 2017). Lamentavelmente, as crianças são extremamente vulneráveis e as que mais sofrem neste contexto.

Considerando indivíduos de todas as idades, acredita-se que o número de subnutridos esteja em torno de 821 milhões de pessoas. Ou seja, uma em cada nove pessoas no mundo (FAO, 2018).

Os gastos com o tratamento relacionados à desnutrição, em contextos de insegurança alimentar, normalmente estão divididos em: apoio logístico, infraestrutura, alimentos específicos, gestão hospitalar e gastos ambulatoriais (ISANAKA, 2016). O tratamento ou a prevenção seriam dos quadros infecciosos, da hipotermia, correção do desequilíbrio hídrico, estímulos sensoriais e recuperação dos



micronutrientes (vitaminas e sais minerais), por meio dos alimentos terapêuticos (BENJAMIN & LAPPIN, 2018). Os 'Alimentos Terapêuticos Prontos para o Uso', são usados para o 'Fundo das Nações Unidas para a Infância' (UNICEF, 2019). Uma mistura cremosa, com leite desnatado, manteiga de amendoim, além de sais minerais e vitaminas. Este produto possibilita o aumento da expectativa de milhares de crianças (WHO, 2019).

### *1.1.3 Refugiados: uma nova realidade*

Além da pobreza e da fome existe uma nova realidade e sem precedentes, que é a questão dos refugiados. A 'Agência da ONU para Refugiados', estima que em 2018 foram gastos US\$ 8.2 bilhões neste contexto. Os deslocamentos têm acontecido de forma constante. Países como a Síria, Somália, e Sudão são os mais atingidos. E nesse cenário, as taxa de desnutrição têm aumentado (UNHCR, 2018). De acordo com 'Objetivos de Desenvolvimento Sustentável', para 2030 será muito difícil diminuir os índices de desnutrição. Faz-se necessário políticas que também evitem desperdício de alimento. Outro ponto levantado pelo estudo, é que os conflitos não causam apenas problemas em relação à busca de alimento, mas também a água potável, segurança alimentar, serviços de saúde, entre outros. Por isto, diversos grupos estão em processo migratório (GHI, 2018).

Pior do que esta situação, é que a Agência considera que a morte de milhares de indivíduos nos últimos anos, poderiam ser evitadas. As migrações, doenças crônicas, HIV, baixas quantidades de alimento (e quando há, são deficientes de sais minerais e vitaminas), promovem um colapso: aumento nas altas taxas de desnutrição aguda, susceptibilidade às doenças e morte (UNHCR, 2018).

### *1.1.4 Brasil como um bom exemplo*

O Brasil, porém é um país citado como um bom exemplo. Houve compromisso ao longo das últimas 4 décadas, considerando o panorama geral, a expansão em serviços de saúde para mães e crianças, além de investimento em políticas de saúde que positivamente conduziram a entrada de meninas às escolas, diminuiu a taxa de natalidade entre adolescentes (educação sobre métodos contraceptivos), incentivou o consumo de alimentos mais ricos em nutrientes e também o aumento da renda familiar (WEBB, 2018).

Mais recentemente, o 'Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento', que analisa estatisticamente quantas pessoas no mundo vivem em situação de

pobreza - destacou em sua última atualização de 2018, que o Brasil está em constante crescimento, tanto em seu IDH (Índice de Desenvolvimento Humano), quanto em relação à expectativa de vida que aumentou nos últimos anos. Brasileiros ganharam em média 10,4 anos, como também aumentaram sua renda em até 28,6% (o estudo considera o período entre 1990 até 2017). Apesar dos dados promissores, o estudo também destacou que deve-se melhorar o índice de desigualdade que ainda é maior do que no Paraguai, por exemplo (UNDP, 2018).

### *1.2 Desnutrição: um novo conceito em um novo contexto*

A desnutrição manifesta-se, nestes diferentes contextos de privação. Porém nos últimos anos, seu significado ganhou abrangência. Objetivamente, a desnutrição pode ser explicada como um desequilíbrio, excesso, ou deficiência de nutrientes e/ou de energia. Ou seja, o conceito de desnutrição, também está relacionado à má nutrição associada também, aos casos de obesidade (WFP, 2017).

Assim, o 'Relatório Global de Nutrição' em 2018, destaca que são gastos mais de 3 trilhões de dólares por ano com a desnutrição. Esta pesquisa identificou que o problema é a nutrição inadequada e também os problemas com a insegurança alimentar. A obesidade contribuiu para a morte de 4 milhões de indivíduos em todo o mundo (GNR, 2018). 1,9 bilhões de adultos estão acima do peso (WHO, 2018). As crianças novamente são as que mais sofrem. Dados de 2017 da 'Observatório de Saúde Global', apontou que 38 milhões de crianças abaixo dos 5 anos estão acima do peso (WHO, 2017).

Deste modo, é muito importante destacar que existem três tipos de condições relacionadas à desnutrição: (I) Deficiência ou excesso de micronutrientes (que seriam sais minerais e vitaminas). (II) Perda de peso (relacionado ao baixo peso para a idade e/ou altura). (III) Sobrepeso (associado à obesidade e que induz indubitavelmente a diversos tipos de doenças cardíacas, câncer, diabetes, entre outras (WHO, 2018).

Diferentemente do contexto relacionado à desnutrição provocado pela insegurança alimentar, quando refere-se à indivíduos obesos, a problemática relaciona-se com questões, como: urbanização, crescimento econômico e globalização (WHO, 2018). Interessante que o desenvolvimento econômico de um país, conforme pontuado após a Segunda Guerra Mundial, não necessariamente está relacionado com a melhora na expectativa de sua população em algumas regiões (BOROWY, 2013). Este tipo de "seguridade" seja social, cultural e político, conduziu a humanidade, há uma nova epidemia. A 'Organização das Nações Unidas' tem

expectativa de interromper este problema até 2030 (WHO, 2018) mediante intervenções, como ajustes em programas de políticas de saúde que promovam ações diretas e emergenciais relacionadas às doenças cardíacas e diabetes tipo 2, principalmente (WHO, 2016).

Embora a obesidade seja um tema muito interessante e parcialmente explorado - para também contextualização do conceito da desnutrição, o foco principal do estudo em questão é a desnutrição relacionada à insegurança alimentar. Assim, segue o texto neste racional.

### *1.2.1 Desnutrição e suas terminologias*

Existem considerações quanto às terminologias envolvendo a desnutrição. Conforme exposto anteriormente, a desnutrição refere-se a uma situação em que há déficit de nutrientes, ou seja, prejuízo do estado nutricional provocando desordens à saúde e relaciona-se também com a obesidade (SHETTY, 2003; UNICEF, 2006; FAO, 2018).

No contexto de insegurança alimentar, os sinais clínicos de desnutrição podem ser classificados em três tipos comumente encontrados em crianças: (I) Grave: se induzir ao Marasmos e/ou *Kwashiorkor*. (II) Crônico: caracteriza-se principalmente pela baixa altura. (III) Leve: se apresentar baixo peso para a altura do indivíduo (FAO, 2018).

Marasmo (desnutrição aguda: deficiência de proteínas e de carboidratos), refere-se a um quadro de desnutrição protéico-energética que ocorre por causa do insuficiente consumo de proteínas e calorias (UNICEF, 2018), porém sem o edema. Isto acontece-se, pois o indivíduo encontra-se em uma situação em que não há reserva de gordura corpórea e por conseguinte há redução da altura, peso e circunferência dos braços (BENJAMIN & LAPPIN, 2018). Isto se dá, pois as funções vitais começam a enfraquecer-se (UNICEF, 2018),

*Kwashiorkor* (desnutrição severa: deficiência de proteína e ingestão de carboidratos), designa-se ao edema nas extremidades bilaterais comumente observado em crianças e bebês, até 5 anos de idade. Com o objetivo de entender o surgimento do edema, verificou-se que nestas crianças os níveis de albumina que encontraram-se extremamente reduzidos. O surgimento de edema se dá principalmente, porque a pressão oncótica e hidrostática controladas também pela albumina, perdem o equilíbrio fazendo com que os fluídos fiquem armazenados na vasculatura abdominal (BENJAMIN & LAPPIN, 2018). É um sintoma secundário, pois

outras doenças podem estar relacionadas primariamente, como quadros infecciosos, HIV, diarreia e a desidratação. Ocorre também, principalmente por causa do consumo de mandioca e milho (BENJAMIN & LAPPIN, 2018).

Os principais problemas envolvendo a desnutrição proteica em primeiro lugar, seria a anemia (em decorrência da falta de ferro). Estima-se que 264 milhões de mulheres em idade reprodutiva são anêmicas em decorrência da desnutrição. Outros problemas são: deficiência de vitamina A (predestina o indivíduo ao maior risco de desenvolver quadros infecciosos), deficiência de iodo (prejudica no desenvolvimento cerebral), deficiência de vitamina B (geralmente provoca fraqueza muscular, desordens digestiva e confusão mental). É comum a manifestação de parasitas (que agrava o quadro, levando à diarreia e conseqüentemente a não retenção de nutrientes) (FAO, 2018).

### *1.2.2 Quais efeitos da desnutrição proteica na hematopoiese?*

Os órgãos hematopoiéticos são gravemente afetados na desnutrição proteica. Quando há falta de algum tipo de nutriente, isto impacta diretamente na vida do indivíduo (IBRAHIM *et al.*, 2017).

De modo que, quando há desnutrição proteica é possível observar sistematicamente: quadro de hipoplasia medular, alteração provocadas do estroma celular, diminuição da produção das células tronco hematopoiéticas e células progenitoras, modificações na estrutura da matriz celular e anemia, principalmente (IBRAHIM *et al.*, 2017). A citar as células tronco hematopoiéticas importantes para a manutenção da hematopoiese, apresentam baixa proliferação (XAVIER *et al.*, 2007). Isto se dá em decorrência da deficiência de aminoácidos - importantes para a engenharia da ciclagem celular - incita a parada do ciclo celular na fase G0/G1, impedindo a multiplicação celular (NAKAJIMA, 2014). Igualmente nestes modelos, constatou-se a perda do marcador de proliferação celular, conhecido como PCNA (Antígeno Nuclear de Proliferação Celular) (XAVIER *et al.*, 2007). Também, com relação à série eritrocítica, a ferropenia afeta a diferenciação e proliferação dos eritrócitos (ÖZKALE & SIPAHI, 2014). As linhagens mielóides (VINOLO *et al.*, 2008) e linfóides igualmente são afetadas, pois há falha na indução da maturação, proliferação, diferenciação celular (VINOLO *et al.*, 2008; FOCK *et al.*, 2010).

No sangue periférico modelos induzidos à desnutrição proteica apresentam quadro de anemia e leucopenia, sendo que há diminuição principalmente de linfócitos, neutrófilos e de monócitos (CUNHA *et al.*, 2013; MELLO *et al.*, 2014).

Já no baço também, é possível encontrar alterações. Há quadro de hipocelularidade esplênica (advindos tanto de células mononucleadas, como de esplenócitos). Além disso, há acúmulo das células progenitoras hematopoiéticas nas fases G0/G1 (MELLO *et al.*, 2014), induzindo à redução da proliferação. A polpa branca é um importante compartimento esplênico, onde há produção e amadurecimento de leucócitos. Morfologicamente em casos de desnutrição proteica, há modificação estrutural e aumento da polpa branca (MANHART *et al.*, 2000).

O timo apresenta um papel importante, tanto no metabolismo corpóreo, quando no sistema imunológico. Em casos de desnutrição proteica constatou-se a hipocelularidade, decorrente da diminuição de timócitos e atrofia do órgão (SAVINO *et al.*, 2007). Juntos estes efeitos comprometem gravemente a vida de um indivíduo e por esta razão, pesquisadores relacionaram a morte de crianças desnutridas com grave quadro de infecção, ao atrofiamento do tecido (SAVINO *et al.*, 2007).

Salienta-se que não apenas o sistema hematopoiético é prejudicado, como também o sistema imunológico. Verifica-se dano à imunidade adquirida e inata, indução da imunossupressão, e também, produção deficiente de citocinas (SILVA *et al.*, 2013; MACKAY-LAWRENCE & PETRI, 2012).

### *1.3 Entendendo o processo hematopoiético*

Como visto anteriormente, a desnutrição causa prejuízos gravíssimos ao indivíduo. Mesmo com uma compreensão geral sobre seus efeitos deletérios no sistema hematopoiético, é fato que existem muitos processos envolvidos e que serão descritos a seguir.

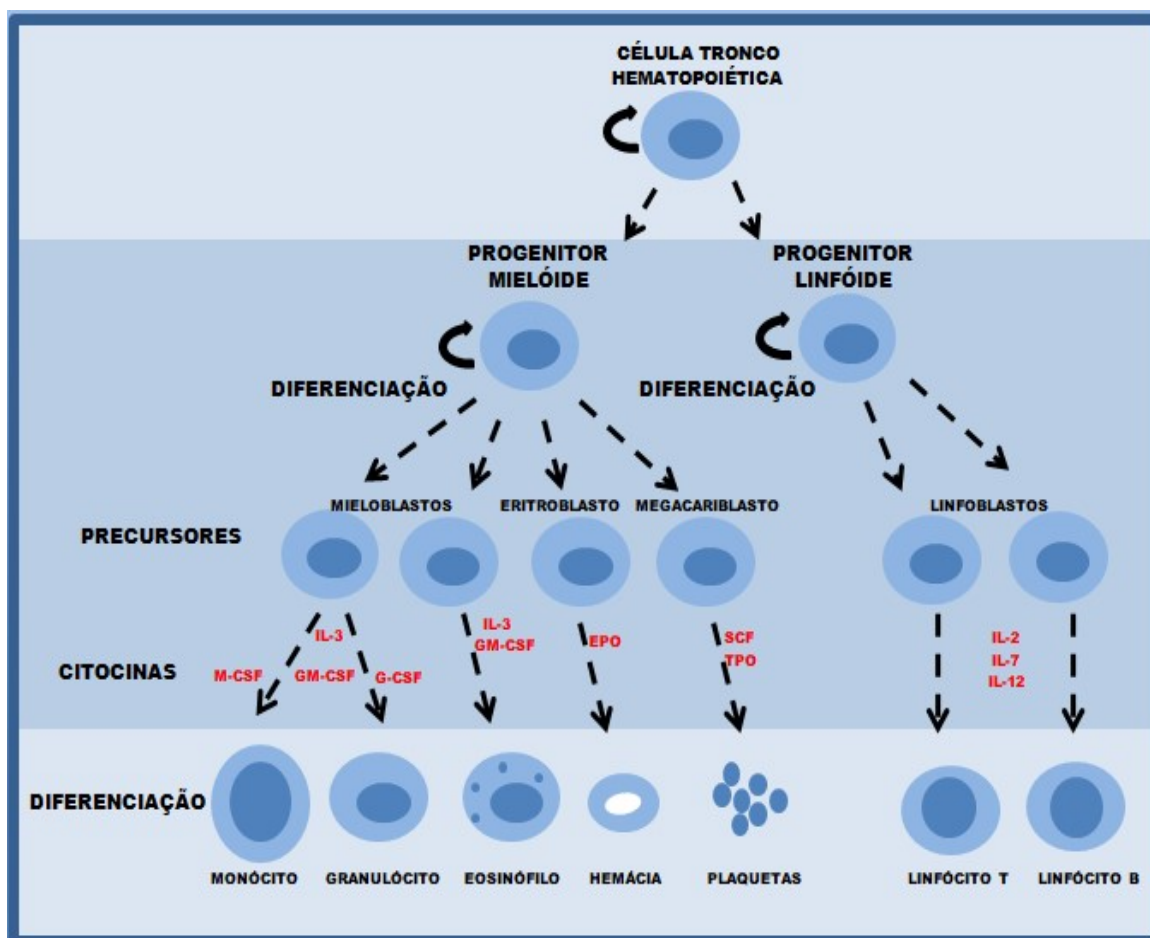
A hematopoiese é conhecida como um processo de formação das células do sangue. É um sistema dinâmico e altamente regulado, capaz de produzir, diferenciar e maturar células sanguíneas (JAGANNATHAN-BOGDAN & ZON, 2013). O sistema hematopoiético ocorre na medula óssea, o qual pode ser entendido como um tecido altamente complexo que não produz apenas células hematopoiéticas, como também outros tipos celulares, como: células mesenquimais, endoteliais, adipócitos e osteoblastos (CHEN *et al.*, 2016).

No início da vida, a hematopoiese desenvolve-se em um ambiente extramedular com origem no saco vitelino, e também em tecidos como baço e fígado. Após o primeiro trimestre gestacional, com o alongamento dos ossos e presença das cavidades medulares, o processo hematopoiético ocorre na medula óssea, porém por causa do estresse no desenvolvimento fetal, também é possível a participação do

fígado. Na fase adulta, a medula óssea é a principal fonte do processo hematopoiético (ORKIN & ZON, 2008). Por dia, um adulto produz em média  $1 \times 10^{11}$  plaquetas,  $1 \times 10^{11}$  leucócitos e  $4 \times 10^{11}$  eritrócitos (KAUSHANSKY & ZHAN, 2018).

O processo hematopoiético ocorre de forma hierárquica (**Figura. 1**). As células tronco hematopoiéticas (CTHs) dão origem à todas células do sangue. Por isto são dinâmicas passando por diferentes etapas como: quiescência, auto-renovação, expansão, diferenciação e morte (EAVES, 2015). Hierarquicamente posterior às CTHs, encontram-se as células progenitoras (PROG). Elas também passam por etapas como: a auto-renovação (capacidade de regeneração), proliferação (capacidade de formar clones, ou também chamado de clonogenicidade) e diferenciação (capacidade de formar linhagens) (RIEGER & SCHROEDER, 2012; DOULATOV & DICK, 2012). Após esta etapa de diferenciação das células precursoras, as linhagens sanguíneas são diferenciadas e ao todo são produzidas mais de 10 tipos celulares (EAVES, 2015). De forma fascinante, estes diferentes tipos celulares podem ser quantificados e qualificados por Citometria de Fluxo. A perda, ou adição de novos antígenos de superfície nas células hematopoiéticas (que acontecem em suas diferentes etapas de maturação celular), podem ser caracterizadas (RIEGER & SCHROEDER, 2012).

Esmiuçando ainda mais a questão da hierarquia que ocorre na hematopoiese, quando as CTHs diferenciam-se são produzidas as células progenitoras multipotentes, que apresentam capacidade de proliferação limitada. À partir destas então, são produzidas as linhagens progenitoras linfocíticas, progenitoras mielocíticas e eritrocíticas (GRINENKO *et al.*, 2018). No caso das células progenitoras mielóides, estas dividem-se em: progenitoras de granulócitos e macrófagos (GMPs), progenitoras mielóides comuns (CMPs) e progenitoras de megacariócitos/eritrócitos. Após o processo de maturação, estas células progenitoras formam: eritrócitos, monócitos, plaquetas, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e granulócitos (GRINENKO *et al.*, 2018). Já os progenitores linfóides comuns diferenciam-se em todos os tipos de linfócitos. Após o processo de maturação, estas células progenitoras formam: linfócitos T, B e NK (MARTI *et al.*, 2017).



**Figura 1. A hierarquia na hematopoiese.** Na medula óssea, as células tronco hematopoiéticas exibem capacidade de induzir à proliferação e diferenciação celular. Este processo ocorre por meio de fatores intrínsecos e extrínsecos, que estão envolvidos no amadurecimento celular e algumas citocinas são imprescindíveis neste contexto (GARCIA NAVARRO, 2005).

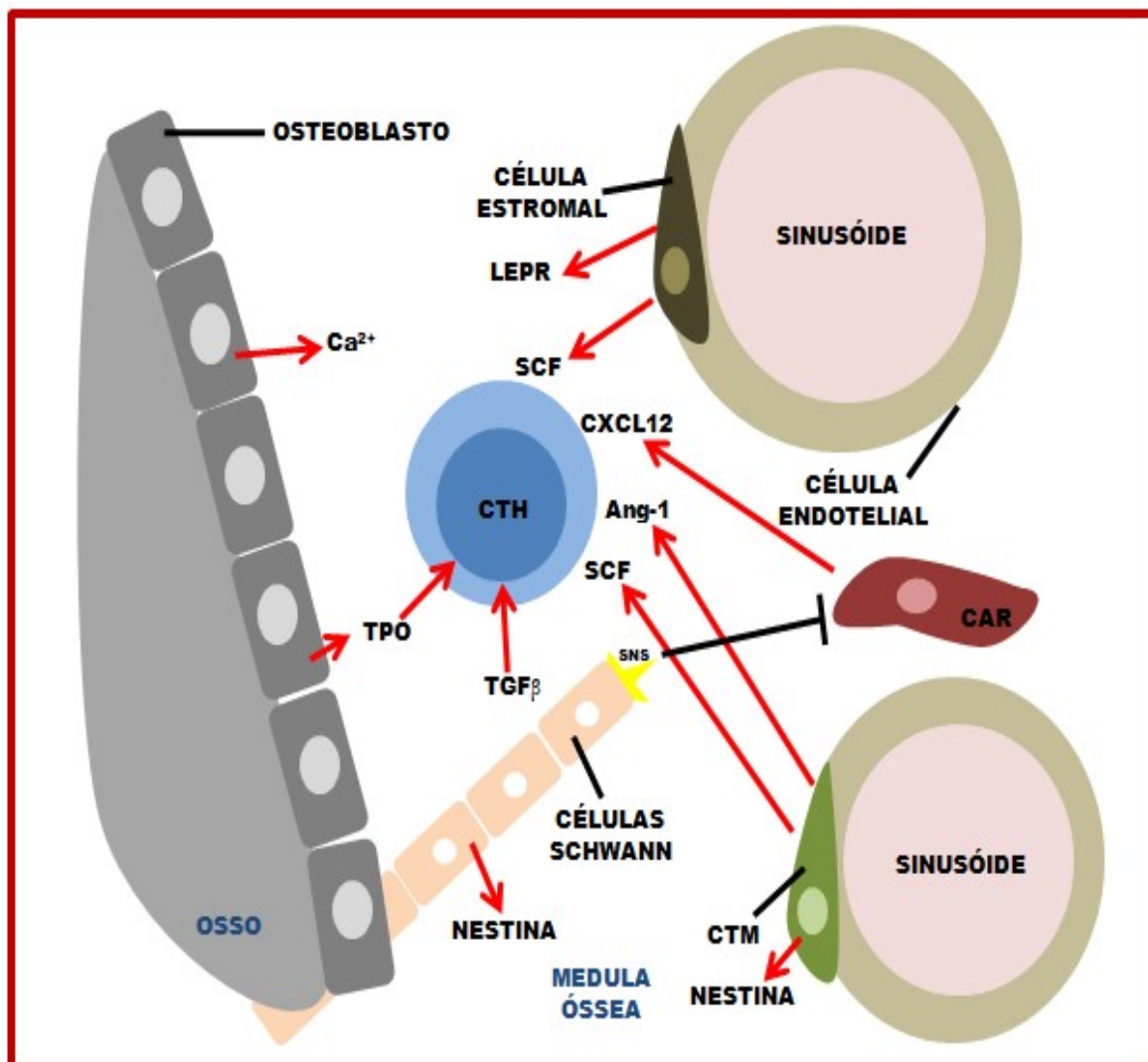
Ainda, há participação outros tecidos hematopoiéticos com diferentes funções. O sangue periférico, por exemplo, pode ser entendido como um tecido circulante formado por diferentes tipos celulares, em uma concentração fluidica. Entre as principais funções, podem-se destacar: a coagulação (principalmente difundida por plaquetas), o transporte de gases (promovido pelas hemácias) e o defesa no indivíduo (estabelecida por meio dos leucócitos, ou também, chamados de glóbulos brancos) (MEZEY, 2016). Já o baço possui nódulos linfóides onde é possível encontrar de forma proeminente os linfócitos B. Uma parte das plaquetas também podem ser encontradas e armazenadas em sua extensão tecidual (ISEKI *et al.*, 2008). O timo por sua vez entre outras funcionalidades é onde os subtipos de linfócitos T ( $CD4^+$  e  $CD8^+$ ), são ativados para desempenhar a função de defesa (ZLOTOFF & BHANDoola, 2011)

### 1.3.1 O Microambiente Medular

Todo este sistema hematopoiético, dinâmico e altamente regulado, depende de uma constante manutenção e homeostasia, principalmente das CTHs. Assim, muitos eventos intrínsecos e extrínsecos ocorrem no microambiente hematopoiético, como a participação do ciclo celular, fatores de crescimento, vias de sinalização, produção de espécies reativas de oxigênio, além do  $\text{Ca}^{2+}$ , por exemplo (BARBOSA *et al.*, 2011; NOGUEIRA-PEDRO *et al.*, 2014; BARBOSA *et al.*, 2012; LANDER *et al.*, 2012; NAKAJIMA, 2010). Por serem importantes para trabalho, os mesmos serão comentados a seguir.

Primeiro, faz-se necessário entender que existem microambientes na cavidade medular que suportam e regulam o processo hematopoiético (BOULAIS & FRENETTE, 2015) (**Figura. 2**). Um destes microambientes é chamado de nicho endosteal (próximo ao osso), que tem a capacidade de promover a manutenção das CTHs. Os osteoblastos presentes neste nicho são os responsáveis por produzirem este arcabouço ósseo, chamado de matriz óssea (TSUJITA, 2016). Quando estes produzem a osteopontina limitam a expansão das CTHs, além de outros fatores como trombopoetina e angiopoietina-1 que estão relacionados com a quiescência das CTHs (ARAI *et al.*, 2004; STIER *et al.*, 2005). Outro nicho próximo ao endosteal, é o perivascular. Acredita-se que esta aproximação entre ambos, reflita em eventos concomitantes no microambiente hematopoiético. As CTHs também podem ser encontradas ao redor das artérias. Moléculas chaves como *CXCL12*, *LEPR*<sup>+</sup> e SCF (fator estimulador de células tronco), ajudam na manutenção das CTHs (NOMBELA-ARRIETA *et al.*, 2013; KUNISAKI *et al.*, 2013; DING *et al.*, 2013). Assim, nestes ambientes, são tomadas decisões que influenciam na auto-renovação, proliferação e diferenciação celular. As células endoteliais sinusóides (que constituem o revestimento dos vasos sanguíneos da medula), auxiliam na auto-renovação das CTHs, quando a via de sinalização *NOTCH* é ativada (BUTLER *et al.*, 2010). *In vitro*, foi observado que principalmente a deleção de *CXCL12* em osteoblastos associado a outros fatores, induz à menor produção de células progenitoras linfóides (DING *et al.*, 2013). O SNS (Sistema Nervoso Simpático) participa nas decisões, pois em casos de lesão medular este auxilia no recrutamento de CTHs (LANDER *et al.*, 2012).





**Figura 2. Fatores relacionados ao nicho medular.** Muitos fatores intrínsecos e extrínsecos presente no nicho medular, conduzem aos diferentes processos relacionados a hematopoiese, como: quiescência, auto-renovação, expansão, diferenciação, amadurecimento e morte. O  $\text{LEPR}^+$  (receptor de leptina), por exemplo, presente neste microambiente e associado à diferentes fatores, juntos exercem importantes papéis na regulação hematopoiética, relacionado às células tronco hematopoiéticas. Legenda:  $\text{TGF}\beta$  (Fator de Crescimento de Transformação Beta), TPO (Trombopoietina), CAR (Célula Reticular), CXCL12 (Ligante de Quimiocina 12), Ang-1 (Angiopoetina 1), SCF (Fator estimulador de célula tronco), SNS (Sistema Nervoso Simpático) e CTM (Célula Tronco Mesenquimal) (LANDER *et al.*, 2012).

Relacionado ao microambiente também há participação do ciclo celular, que é fundamental para controlar a função das CTHs. Inicialmente, as CTHs encontram-se essencialmente na fase G0 no nicho medular, de forma que após algum estímulo ou estresse por questões homeostáticas do corpo, são desencadeados os processos de proliferação e diferenciação das CTHs (PIETRAS *et al.*, 2011). Do contrário, a baixa taxa de proliferação, ou estado de quiescência prevê auto-renovação, ou apenas manutenção das CTHs. Já altas taxas de proliferação, são importantes para a

produção de progenitores e diferenciação terminal em outros tecidos hematopoiéticos (LAURENTI *et al.*, 2015).

As citocinas também desempenham um papel importante, pois ajudam a coordenar o funcionamento não apenas das CTHs, como também de outras células hematopoiéticas (ZHANG & LODISH, 2008). A IL-3 tem como atividade primária, auxiliar na diferenciação terminal de eritrócitos. GM-CSF, induz à proliferação de progenitores mielóides, com diferencial terminal em macrófagos e granulócitos. IL-6 regula proliferação de linfócitos do tipo B; IL-11 estimula a proliferação da progene de megacariócitos; EPO, tem como atividade principal, a formação de glóbulos vermelhos. IL-1, IL-2, IL-4 e IL-7, estão envolvidas com o desenvolvimento de linfócitos do tipo T. Além disto, outras citocinas podem apresentar ação de crescimento, ou inibição dos diferentes tipos celulares (METCALF, 2008).

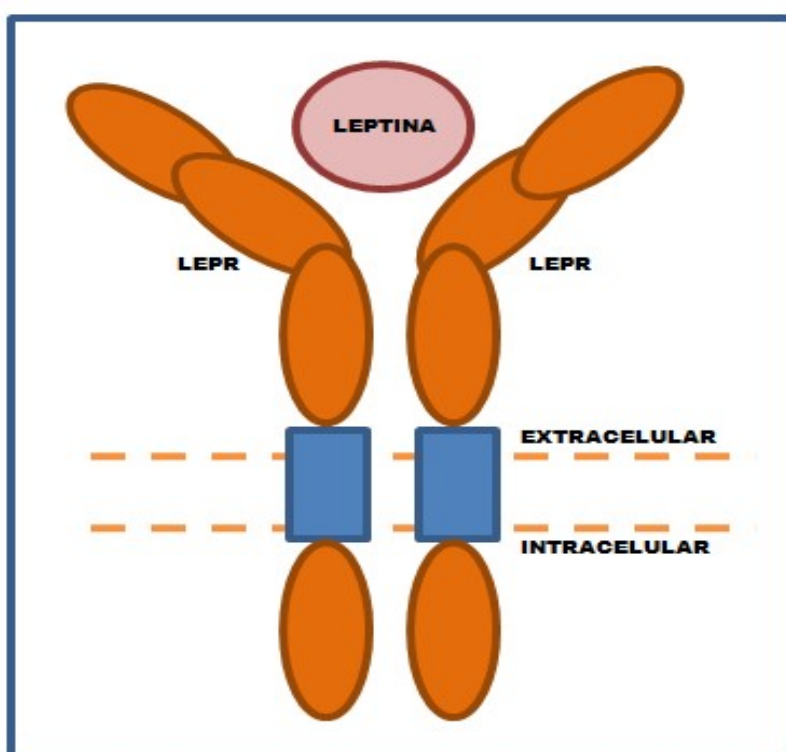
Além de *NOTCH*, outras vias de sinalização podem estar relacionadas com diferentes processo relacionados nas CTHs, como: quiescência, proliferação, diferenciação e até a morte (NOGUEIRA-PEDRO *et al.*, 2014). A citar, *PKC*, está relacionada à proliferação e/ou sobrevivência das CTHs (EDLING *et al.*, 2007). Já *p38*, com a quiescência das células primitivas hematopoiéticas (TESIO *et al.*, 2015). *ERK1/2* em muitos momentos cruciais, como adesão, migração, diferenciação, sobrevivência (CHAN *et al.*, 2013). E finalmente, *AKT* que desempenha um importante papel na sobrevivência e morte celular (MOGI *et al.*, 2004).

Outro aspecto importante é a capacidade de regeneração das CTHs. Alguns mecanismos celulares, são ativados para que não ocorra dano celular e isto está relacionado com as espécies reativas e oxigênio (ROS). Excesso de ROS podem danificar o DNA, como também pode ativar cascatas de sinalização que impacta na diferenciação das CTHs (JUNTILLA *et al.*, 2010). Por outro lado, a homeostasia na produção de ROS influencia na proliferação das CTHs, como também na diferenciação terminal em células mielocíticas (NOGUEIRA-PEDRO *et al.*, 2014).

Por fim, o cálcio é um importante mensageiro intracelular participando também de algumas vias de sinalização. Alguns processos na hematopoiese mediado pelo  $\text{Ca}^{2+}$  promove a maturação e diferenciação das CTHs, além de induzir a proliferação mielóide (PAREDES-GAMERO *et al.*, 2012).

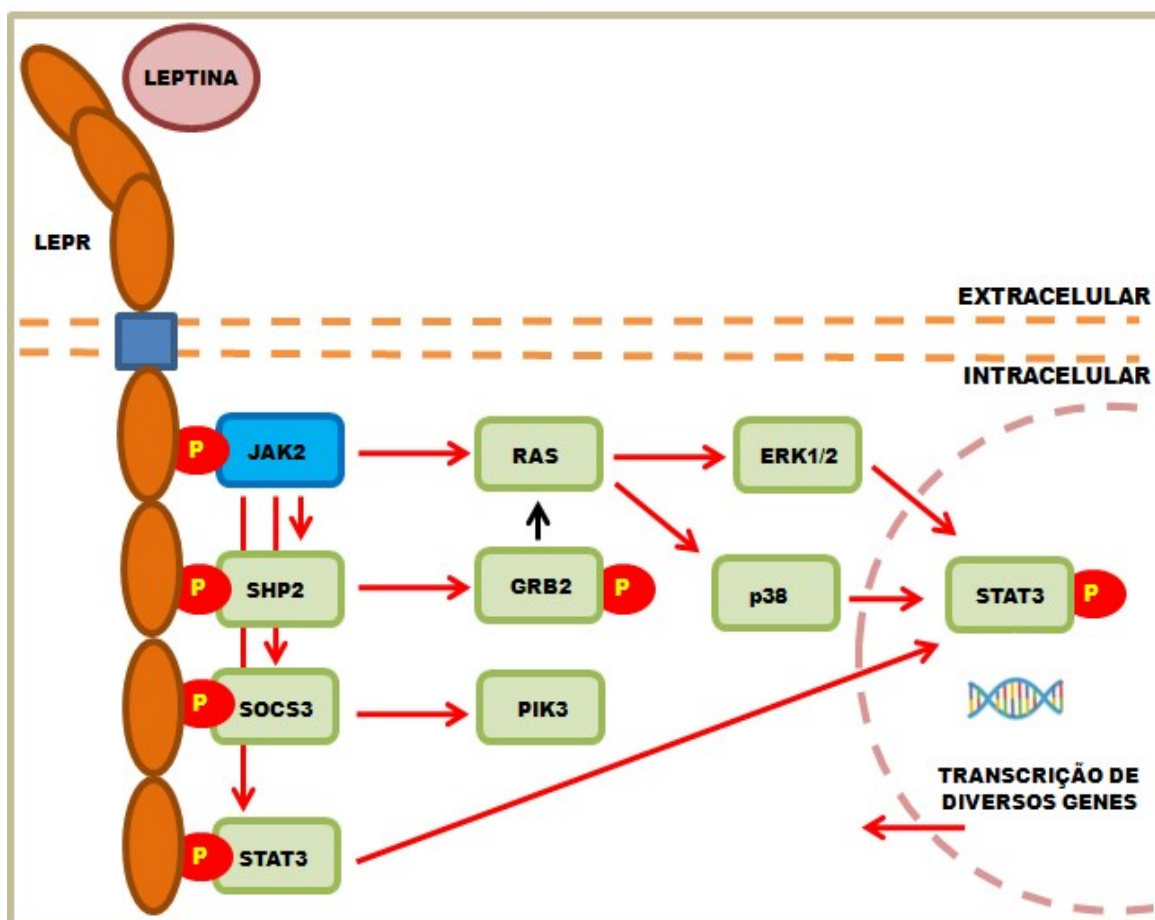
### 1.4 Leptina: descoberta e seus diferentes papéis

A leptina também participa do sistema hematopoiético e sua descoberta se deu maneira surpreendente. Em meados da década de 50 um cientista em uma de suas observações propôs uma teoria, que havia um metabólito circulante capaz de induzir à saciedade (KENNEDY, 1953). Porém, somente em meados da década de 70, outro grupo de pesquisadores realizaram um ensaio em parabiose ligando os sistemas circulatórios de diferentes modelos murinos: um camundongo normal e um camundongo obeso. Assim, constatou-se que o camundongo obeso perdia peso (COLEMAN, 1973). Na década de 90, a partir dos estudos genéticos em modelos murinos normais e obesos, clonaram o gene OB (conhecido como leptina). Observaram que em modelos obesos havia uma mutação do gene OB: CGA (sequência genética do modelo murino normal) para TGA (sequência genética do modelo murino obeso) (ZHANG *et al.*, 1994). Por causa desta mutação, a leptina em obesos tinha sua produção inacabada, impedindo a ligação em seu receptor Ob-Rb (também conhecido como LEPR) (**Figura 3**). Por esta razão, a saciedade não era induzida (TARTAGLIA *et al.*, 1995).



**Figura 3. Receptor de Leptina (LEPR).** O receptor longo de leptina, é formado por 1162 aminoácidos. Para que ocorra a transdução de sinal do ambiente extracelular para o ambiente intracelular, é necessário que a leptina se ligue em seu receptor, pois o mesmo não apresenta atividade quinase intrínseca (GORSKA *et al.*, 2010).

Muitos eventos estão envolvidos com a cascata química que conduz à saciedade. De maneira geral, a leptina produzida pelos adipócitos passa pela barreira hematoencefálica (transporte ativo) e tem sua ação nas regiões laterais e mediais do hipotálamo (centro da saciedade), ligando-se em seu receptor LEPR (**Figura 4**). Após esta ligação, a via de sinalização da JAK2 - principal via de ativação da leptina, é autofosforilada no citoplasma, transduzindo sinal por meio de seus resíduos internos para outras vias, como por exemplo: *STAT3*, *STAT5*, *ERK1/2*, entre outras (LA CAVA & MATARESE, 2004).



**Figura 4. JAK2: principal via de sinalização da leptina.** Assim que ocorre a ligação da leptina em seu receptor (LEPR), a JAK2 é ativada por meio da autofosforilação da tirosina, fosforilando também o domínio citoplasmático do receptor. Em seguida, a cascata de sinalização, se dá, pois há fosforilação dos resíduos internos do receptor, reconhecida pela STAT3 e/ou outras proteínas sinalizadoras. Após o processo de dimerização da STAT3, esta transloca-se para o núcleo e induz à expressão de vários genes; como também, pode estimular outras proteínas sinalizadoras (LA CAVA & MATARESE, 2004).

A leptina apresenta função pleiotrópica (**Figura 5**), ou seja, que desempenha diversas funções no organismo de um indivíduo (WHITE *et al.*, 2013). Além de regular o apetite pode apresentar diferentes funções seja no desenvolvimento ósseo, sistema vascular, sistema reprodutor, sistema neuronal, sistema imunológico e o

hematopoiético, importante para este estudo (ALLISON & MYERS, 2014; FRÜHBECK, 2001; PARK & AHIMA, 2015).

De maneira curiosa, estudos demonstraram que a leptina apresentou capacidade de induzir a proliferação e a diferenciação nas células medulares, em modelos animais (CLAYCOMB *et al.*, 2007; MONTOYE *et al.*, 2006). Juntas estas pesquisas revelaram que esta capacidade se deu, pois sua estrutura é semelhante às citocinas como LIF, IL-6, IL-11, IL-12 e G-CSF (ZHANG *et al.*, 1997). Além disto, seu receptor (LEPR), também apresenta homologia com o receptor da IL-6. Por estas razões e por atuar no sistema hematopoiético e imunológico, ela é caracterizada como uma citocina do tipo I (ZHANG *et al.*, 1997). Sua constituição se dá pela junção de 167 aminoácidos, sendo que os 21 primeiros, funcionam apenas como peptídeo sinal, ou seja, para o reconhecimento e encaixe em seu receptor LEPR (MASUZAKI *et al.*, 1995). Quanto à sua conformação, apresenta quatro  $\alpha$ -hélices antiparalelas (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

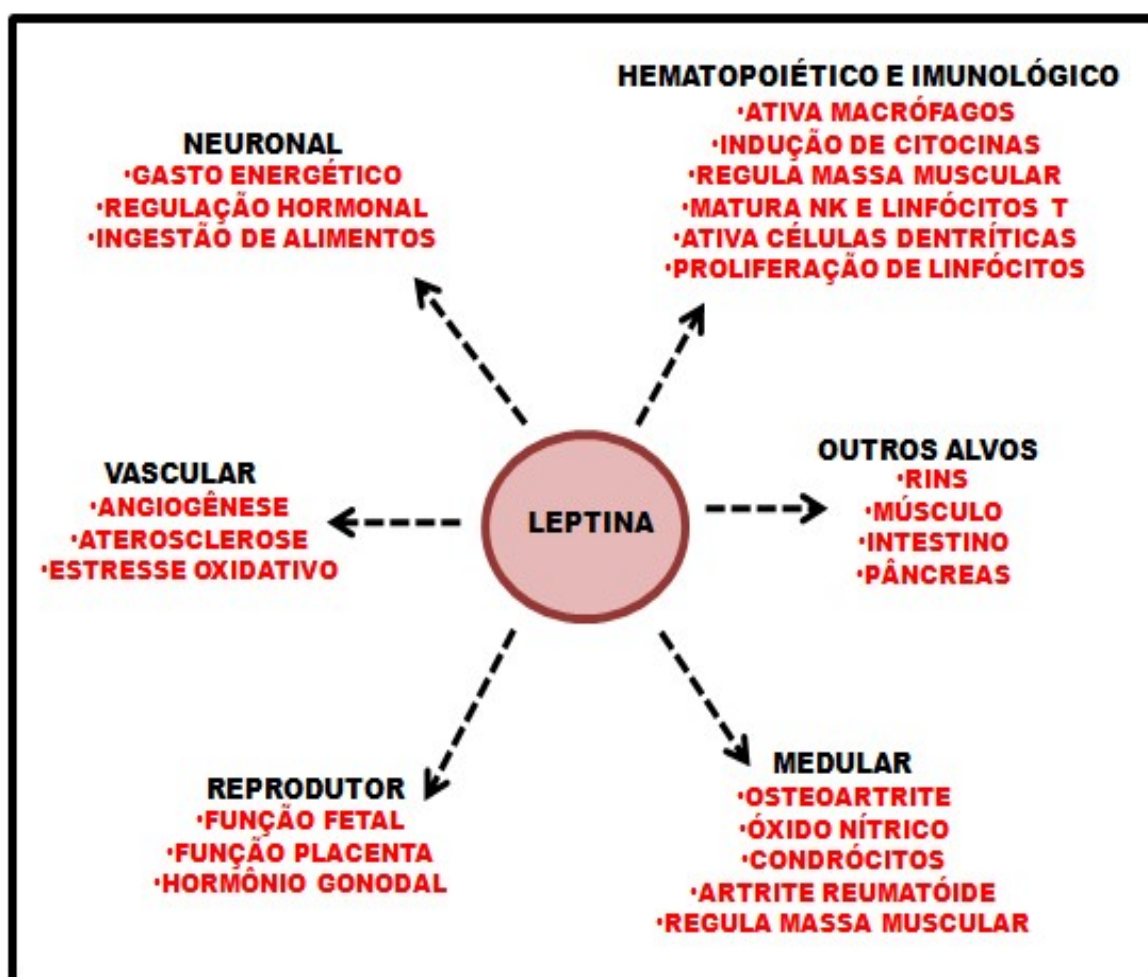


Figura 5. Função pleiotrópica da leptina. A leptina apresenta efeitos múltiplos no organismo (LAGO *et al.*, 2007).

Neste contexto, outras descobertas revelaram diferentes modulações da leptina no sistema hematopoiético. As CTHs apresentam o receptor de leptina e efeito como a proliferação foi observado em células monocíticas. Após o estímulo com leptina, houve produção das citocinas IL-6 (BAUMANN *et al.*, 1996) e de TNF- $\alpha$  (FINCK & JOHNSON, 2000). Nas células NKs, a leptina induz ao aumento da resposta citotóxica (BÄHR *et al.*, 2018). Em linfócitos T, ela estimula a maturação e a sobrevivência celular (SÁNCHEZ-MARGALET & NAJIB, 1999). E por fim, em linfócitos B a leptina secreta a produção de citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  e IL-10 (AGRAWAL *et al.*, 2011).

#### 1.4.1 Leptina e a desnutrição proteica

Sabendo disto, qual seria o papel da leptina na desnutrição?

A leptina sérica é conhecida como um marcador biológico, pois sua concentração apresenta-se diminuída nos casos de desnutrição (PRENTICE *et al.*, 2002). Da mesma forma, quando há reintrodução nutricional, os níveis séricos de leptina encontram-se aumentados (BARTZ *et al.*, 2014). A título de exemplo, bebês ugandenses que sobreviveram à reabilitação nutricional, apresentaram recuperação dos níveis da leptina (BARTZ *et al.*, 2014). Por isto que atualmente, a leptina sérica é descrita como um fator importante para a sobrevivência em casos de desnutrição (MACKEY-LAWRENCE & PETRI, 2012), considerada como biomarcador na evolução do estado nutricional (AMIRKALALI *et al.*, 2010).

Outro papel da leptina foi revelado em pacientes HIV positivos, que apresentam baixos níveis de leptina sérica (ESTRADA *et al.*, 2010) e por esta razão, a leptina é estudada como uma possível terapia para casos de imunossupressão, associado à desnutrição (ALTI *et al.*, 2018). O estudo também propõe o uso da leptina em casos de desnutrição e acometimento da leishmaniose visceral (ALTI *et al.*, 2018).

Como já explicitado, a diminuição na concentração de leptina, induz a um comprometimento da função imunológica e hematopoiética. Por isto, pesquisadores estudam quais os mecanismos estariam relacionados a esta deficiência (PROCACCINI *et al.*, 2011). Em um modelo deficiente de leptina (modelo murino obeso, anteriormente relatado), a indução do tratamento com leptina promoveu a proliferação de leucócitos (GAINSFORD & ALEXANDER, 1999). Já, pacientes caquéticos com níveis de leptina diminuídos apresentaram piora na recuperação da tuberculose, por exemplo (CREVEL *et al.*, 2002).