

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia

Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteica

Renaira Oliveira da Silva

Dissertação para obtenção do título de Mestre
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Fisiopatologia e Toxicologia

**Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco
mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteica**

Renaira Oliveira da Silva

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

2021

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

S586i Silva, Renaira Oliveira da
Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios
de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição
proteica / Renaira Oliveira da Silva. -- São Paulo, 2020.
80p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia
(Fisiopatologia e Toxicologia)

Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio

1. Envelhecimento. 2. Desnutrição. 3. Célula tronco mesenquimal.
4. Imunomodulação. I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

Renaira Oliveira da Silva

Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteica

Dissertação para obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

Orientador/Presidente

Aprovado em

Banca examinadora

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

São Paulo ____ de _____ de 2020

Dedicatória

Aos meus pais,

Renée e Nilson, meus maiores exemplos. Ensinarão-me o valor do trabalho e da honestidade, a cumprir com a minha palavra, a ser forte, a lutar e a nunca desistir. Gratidão pelo apoio incondicional, amor eterno e dedicação. Eu amo vocês!

Às minhas irmãs,

Renée, meu grande exemplo de pesquisadora, por todo apoio e incentivo, por plantar em mim o amor pela Ciência e Raísa, por ser meu exemplo de força e perseverança, pelo carinho e amor. Vocês, minhas irmãs, são essenciais na minha vida!

Agradecimentos

Ao meu orientador, Dr Ricardo Ambrósio Fock, por ser um exemplo de ser humano, pesquisador e professor, pelos ensinamentos, pela confiança no meu trabalho e por contribuir com a minha formação profissional. Obrigada, professor, por abrir o caminho da Ciência na minha vida!

Às grandes amigas que o mestrado me deu e que tive o prazer de compartilhar o meu cotidiano: Gabriela Kodja, Andressa Antunes e Talita Sartori, vocês foram essenciais nessa trajetória, sou muito grata pela ajuda nos longos dias de experimento, pelas boas conversas, risadas e por tornarem essa caminhada mais leve. Vocês são amigas para vida toda!

À equipe do laboratório de hematologia, Bruna, Agata, Araceli, Carol, Fabiana, Juliana e Luciene por fazerem parte dessa trajetória.

Ao técnico do laboratório Edson, pela contribuição neste trabalho.

Aos meus amigos da pós graduação, em especial Julia, Luiz, Claudia e Vitor pela parceria nas disciplinas, organização do curso FisioTox e por tornarem a minha vida social ainda mais animada. Vocês fizeram a diferença!

Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado e vibraram com as minhas conquistas. Em especial, vó Lourdes, vô João, dinda Rejane, Juliana, Raielli, Ingrid, Amanda, Luciana, Thanyele, Luana, Dafne, Érica, Tainah e Tainara.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo auxílio financeiro e espaço físico.

À Comissão Coordenadora do Programa de Pós graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Às secretarias do programa Elaine Midori, Samantha Luiza e Edna Batista, pela assistência prestada nos momentos que precisei.

Ao CNPq, FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro.

Resumo

Silva, R.O. **Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteica.** 2020.80P. Dissertação (mestrado)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

As pessoas com idade mais avançada normalmente sofrem de algum grau de carência nutricional, sendo a mais comum a carência proteica. O envelhecimento e a desnutrição proteica vão comprometer a hematopoese, a geração de células imunológicas e a resposta imune, podendo causar uma maior suscetibilidade a infecções. As células tronco mesenquimais (CTMs) apresentam propriedades imunomoduladoras e são essenciais na hematopoese. Diante disso, esse trabalho tem como objetivo investigar, em um modelo de envelhecimento submetido à desnutrição proteica, aspectos relacionados a capacidade imunomodulatória das CTMs. Para isso, foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6. Esses animais foram divididos conforme a idade e foram separados em jovens (3-6 meses) e idosos (18-19 meses), quando atingiram a idade adequada foram separados em controles e desnutridos, os quais receberam rações normoproteicas (12% de proteína) e hipoproteicas (2% de proteína), respectivamente. O consumo de ração nos quatro grupos foi similar. O grupo desnutrido jovem perdeu em torno de 20% de peso e o grupo desnutrido idoso perdeu cerca de 16% de peso, quando comparados com o primeiro dia de dieta. Os animais desnutridos apresentaram anemia, leucopenia e hipoplasia medular; além de que a ingestão reduzida de proteínas provocou as menores taxas de proteínas totais, albumina e ureia no soro. Inicialmente as CTMs foram isoladas e caracterizadas, onde observou-se aumento da expressão de CD73 nas CTMs obtidas de animais idosos, independente do estado nutricional. Adicionalmente, CTMs de animais idosos apresentaram maior taxa de senescência. O sobrenadante de CTMs do grupo desnutrido jovem apresentou redução de IL-1 β , TGF- β , e PGE2 e aumento de IL-6; enquanto nas CTMs de animais do grupo idoso observamos aumento de IL-6 e IL-1 β e redução de TGF- β e PGE2. Em relação a expressão gênica, observamos de CTMs de animais do grupo idoso apresentaram maior expressão de NOS e NF κ B e menor expressão de STAT3. Quando avaliada a capacidade imunomodulatória de CTMs, observamos que, independente do grupo estudado, as CTMs foram capazes de reduzir a proliferação de macrófagos e linfócitos, porém CTMs de animais jovens apresentaram maior capacidade em reduzir a taxa de proliferação, principalmente de linfócitos. Em relação as citocinas produzidas por macrófagos quando cultivados com o meio condicionado de CTMs observamos que, independente do grupo avaliado, todos foram capazes de reduzir a produção de TNF α , IL-1 α e IL-1 β e aumentar a produção de IL-10. Quando avaliada a produção de citocinas por linfócitos cultivados em meio condicionado de CTMs, observamos que CTMs dos animais jovens apresentaram maior capacidade de reduzir a produção de IL-2 e aumentar a produção de IL-10; também observamos que linfócitos cultivados com sobrenadante de animais idosos produziram maior concentração de IFN γ . Portanto, sabendo-se que as CTMs tem sido cada vez mais aplicadas em diferentes situações que envolvem a terapia celular, podemos concluir que o envelhecimento e a desnutrição proteica são fatores que separados ou em conjunto influenciam no efeito imunomodulador dessas células e conseqüentemente podem afetar seu potencial terapêutico.

Palavra-chave: Envelhecimento, Desnutrição, Célula tronco mesenquimal, Imunomodulação.

Abstract

Silva, R.O. **Influence of aging on immunomodulatory aspects of medullary mesenchymal stem cells in situations of protein malnutrition.** 2020. 80P. Dissertation (master's degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2020.

Elderly people usually suffer from some degree of nutritional deficiency, the most common being protein deficiency. Aging and protein malnutrition will compromise hematopoiesis, the generation of immune cells and the immune response, and may cause greater susceptibility to infections. Mesenchymal stem cells (MSCs) have immunomodulatory properties and are essential in hematopoiesis. Therefore, this study aims to investigate, in an aging model subjected to protein malnutrition, aspects related to the immunomodulatory capacity of MSCs. For this, mice of the C57BL / 6 strain were used. These animals were divided according to age and were separated into young (3-6 months) and elderly (18-19 months), when they reached the appropriate age, they were separated into controls and malnourished, which received normoproteic diets (12% protein) and hypoprotein (2% protein), respectively. Feed consumption in the four groups was similar. The young malnourished group lost around 20% of weight and the elderly malnourished group lost about 16% of weight when compared to the first day of the diet. Malnourished animals presented anemia, leukopenia and spinal hypoplasia; in addition to the reduced protein intake caused the lowest rates of total proteins, albumin and urea in the serum. Initially, MSCs were isolated and characterized, where an increase in CD73 expression was observed in MSCs obtained from elderly animals, regardless of nutritional status. Additionally, MSCs from elderly animals showed a higher senescence rate. The supernatant of MSCs from the young malnourished group showed a reduction in IL-1 β , TGF- β , and PGE2 and an increase in IL-6; while in the CTMS of animals in the elderly group, we observed an increase in IL-6 and IL-1 β and a reduction in TGF- β and PGE2. Regarding gene expression, we observed that MSCs from animals in the elderly group showed higher expression of NOS and NF κ B and lower expression of STAT-3. When assessing the immunomodulatory capacity of MSCs, we observed that, regardless of the group studied, MSCs were able to reduce the proliferation of macrophages and lymphocytes, but MSCs from young animals showed greater capacity to reduce the proliferation rate, especially of lymphocytes. Regarding the cytokines produced by macrophages when grown with the conditioned medium of MSCs, we observed that, regardless of the group evaluated, all were able to reduce the production of TNF α , IL-1 α and IL-1 β and increase the production of IL-10. When evaluating the production of cytokines by lymphocytes cultured in conditioned medium of MSCs, we observed that MSCs from young animals showed greater capacity to reduce the production of IL-2 and increase the production of IL-10; we also observed that lymphocytes cultured with supernatant from elderly animals produced a higher concentration of IFN- γ . Therefore, knowing that MSCs have been increasingly applied in different situations involving cell therapy, we can conclude that aging and protein malnutrition are factors that separately or together influence the immunomodulatory effect of these cells and consequently can affect their therapeutic potential.

Keyword: Aging, Malnutrition, Mesenchymal stem cell, Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - CTMs durante o cultivo celular.....	36
Figura 2 - Imunofenotipagem das CTMs.....	37
Figura 3 - Fotomicrografias representam as CTMs senescente.....	39

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 Consumo de ração, peso corpóreo e consumo diário de ração	32
Gráfico 2 Marcação fenotípica de CTM	37
Gráfico 3 Marcação fenotípica de CTM.....	38
Gráfico 4 Senescência	40
Gráfico 5 Dosagem de citocinas	41
Gráfico 6 Expressão relativa de Mrna.....	43
Gráfico 7 Influência do meio condicionado de CTM sobre a proliferação de RAW....	45
Gráfico 8 Concentração de citocinas produzidas por RAW no meio condicionado de CTMs	46
Gráfico 9 Influência do meio condicionado de CTM sobre a proliferação de Linfócitos esplênicos.....	47
Gráfico 10 Concentração de citocinas produzidas por linfócitos esplênicos no meio condicionado de CTMs	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição da ração.....	25
Tabela 2 - Composição da mistura vitamínica.....	26
Tabela 3 - Composição da mistura salínica.....	26
Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos.....	33
Tabela 5 - Parâmetros hematológicos.....	34
Tabela 6 - Mielograma.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
AST	Aspartato aminotransferase
ALT	Alanina aminotransferase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFU-F	Unidades formadoras de colônias fibroblastóides
CONCEA	Conselho Nacional de Experimentação Animal
CTM	Célula tronco mesenquimal
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ELISA	<i>Enzyme linked Immuno Sorbent Assay</i>
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFNγ	Interferon γ
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LPS	Lipopolissacarídeo
MO	Medula Óssea
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio
M-CSF	Fator de crescimento de macrófagos
NaCl	Cloreto de sódio

NK Natural Killer

NO Óxido Nítrico

NOS Óxido Nítrico sintetase

NFκB Fator nuclear kappa B

OMS Organização Mundial da Saúde

PAMP Padrões moleculares associados a patógenos

PGE₂ Prostaglandina E 2

PBS Solução tampão fosfato salina

qsp Quantidade suficiente para

RNA Ácido ribonucleico

STAT Sinal de transdução e ativação de transcrição

SBF Soro bovino fetal

Treg Linfócitos T regulatórios

TNFα Fator de necrose tumoral α

TGFβ fator de crescimento transformador β

USP Universidade de São Paulo

VCAM Proteína celular de adesão vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Envelhecimento	16
1.2 Envelhecimento e desnutrição	17
1.3 Hematopoese e microambiente hematopoético	19
1.4 Célula tronco mesenquimal	20
1.5 Célula tronco mesenquimal e capacidade imunomoduladora	22
2 OBJETIVO.....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 Animais e dieta	24
3.2 Sangue total e soro	27
3.3 Obtenção de células da medula óssea e realização do mielograma	27
3.4 Isolamento e cultivo de CTMs	28
3.5 Caracterização de CTMs	28
3.6 Avaliação da senescência	29
3.7 Expressão relativa de mRNA	29
3.8 Produção de citocinas por CTMs	30
3.9 O efeito do condicionado de CTMs sobre a proliferação de macrófagos RAW e produção de citocinas	30
3.10 O efeito do condicionado de CTMs sobre a proliferação de linfocitária e produção de citocinas	31
3.11 Análise estatística	31
4 RESULTADOS.....	32
4.1 Avaliação do estado nutricional	32
4.2 Análise das concentrações de proteína, albumina, ureia, creatinina, AST, ALT, colesterol e triglicerídeos.....	33
4.3 Perfil hematológico.....	34
4.4 Avaliação do mielograma.....	35

4.5 Caracterização das CTMs.....	35
4.6 Avaliação da senescência	39
4.7 Dosagem de citocina por ELISA.....	40
4.8 Expressão relativa de mRNA.....	42
4.9 Avaliação da influência do meio condicionado de CTM sobre a proliferação de RAW e produção de citocinas	44
4.10 Avaliação da influência do meio condicionado de CTM sobre a proliferação de linfócitos esplênicos e produção de citocinas	46
5 DISCUSSÃO.....	49
6 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXOS.....	74

INTRODUÇÃO

1.1. ENVELHECIMENTO

O envelhecimento é um processo dinâmico, progressivo e irreversível durante o qual ocorrem diversas mudanças no organismo do indivíduo, tais como mudanças funcionais, morfológicas, bioquímicas e psicológicas (TRAVASSOS *et al.*, 2020). A depender do organismo, o processo de envelhecimento pode sofrer variações, sendo mais acelerado para uns e mais gradativo para outros. Tais variações dependem também de outros fatores, como estilo de vida, presença de doenças crônicas e condições econômicas e sociais (CAETANO *et al.*, 2006). Por isso, tratar sobre envelhecimento é identificar a existência de um universo de interpretações que estão relacionadas tanto às questões orgânicas quanto socioculturais de um indivíduo.

O envelhecimento biológico pode ser caracterizado pela perda de função das células, dos tecidos, dos órgãos e do sistema, ocasionada pelo aumento cronológico do tempo e, por fim, levando o idoso à morte (LESS *et al.*, 2016). No processo de envelhecimento, as células senescentes se acumulam e sua quantidade aumenta, contribuindo para a decadência de tecidos e órgãos, bem como para o surgimento de doenças relacionadas à idade (DE PINHO *et al.*, 2020).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o envelhecimento é caracterizado como um fenômeno complexo, pois envolve inúmeros programas biológicos (OMS, 2015). De fato, a participação de alguns marcadores moleculares e celulares determina o fenótipo durante o processo de envelhecimento, como instabilidade genômica, atrito de telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, detecção desregulada de nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e alteração na comunicação intercelular (LÓPEZ-OTÍN, 2013).

Para os países em desenvolvimento, a OMS define como idoso o indivíduo com idade igual ou superior a 60 anos; já para os países desenvolvidos, essa idade seria de 65 anos ou mais (OMS, 2015). No mundo, a população idosa aumenta exponencialmente. No ano de 2015, a quantidade de pessoas com 60 anos ou mais era 48% maior do que no ano 2000; no ano de 2050 esse valor será triplicado quando comparado com o ano 2000 (UNITED NATIONS, 2015). Atualmente, a população brasileira vive um intenso processo de envelhecimento, pois houve a redução das taxas de fecundidade associada ao aumento da expectativa de vida (BORBON *et*

al., 2016). De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2043, 25% da população terá mais de 60 anos de idade, ao passo que a proporção de indivíduos com até 14 anos será de apenas 16,3% (IBGE, 2019). Isso demonstra a intensidade de crescimento da população idosa e a necessidade cada vez maior de que sejam realizados investimentos relacionados à saúde, visto que o envelhecimento é um fator de risco para diversas doenças.

1.2. ENVELHECIMENTO E DESNUTRIÇÃO

Os distúrbios nutricionais possuem um papel de destaque entre os casos clínicos de pacientes idosos, um exemplo consiste na desnutrição, definida pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) como um estado fisiológico anormal, tendo como causa a ingestão inadequada e desregulada de macronutrientes, como proteínas, e micronutrientes, como vitaminas e minerais, elementos essenciais para o funcionamento normal do organismo (OLIVEIRA *et al.*, 2014; FIDELIX *et al.*, 2013; FAO, 2015).

A classificação da desnutrição pode ser estabelecida por meio de sua origem ou de sua gravidade (TEIXEIRA *et al.*, 2016). Quanto à origem, tem-se a desnutrição primária, que ocorre quando há insuficiência na oferta e/ou na disponibilidade de variadas proporções de alimentos, consequência da precariedade da situação socioeconômica do indivíduo, que dificulta tanto a reposição energética e proteica quanto o consumo de outros nutrientes fundamentais; e a desnutrição secundária, que ocorre quando existe a disponibilidade de alimentos, mas há uma situação que dificulta o acesso aos mesmos, sendo essa espécie de desnutrição identificada principalmente em pessoas que estão hospitalizadas por muito tempo, em portadores de doenças crônicas e inflamatórias, em indivíduos que precisam de dieta enteral/parenteral e/ou naqueles que fazem tratamentos quimioterápicos (SHETTY *et al.*, 2006; TEIXEIRA *et al.*, 2016). Em relação à gravidade, a desnutrição pode ser leve, moderada ou grave, a depender das manifestações clínicas, da associação com outras doenças, do fator idade, do tempo e da causa da deficiência (SHETTY *et al.*, 2006).

A desnutrição aumenta consideravelmente o risco de mortalidade na população idosa (NASEER *et al.*, 2015). No Brasil, o índice de desnutrição continua elevado, de modo que o risco de que os idosos morram em razão desse fator aumenta gradativamente, devendo serem levados em consideração também os problemas sociais e a desigualdade no acesso aos

alimentos adequados, fatores que se fazem presentes no país (WAITZBERG *et al.*, 2017; REZENDE *et al.*, 2010).

Dentre as várias causas de desnutrição, destaca-se a desnutrição proteica, um problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas no mundo inteiro, sendo a população idosa uma das mais prejudicadas (GUYONNET *et al.*, 2015).

A desnutrição proteica é ocasionada pela ingestão inadequada de proteínas, o que pode acarretar em inúmeros problemas metabólicos (SANTOS *et al.*, 2017). No idoso, as diversas modificações fisiológicas alteram a utilização de proteínas, associado a isso há a interação farmacológica, as alterações psicológicas, a incapacidade física e os fatores socioeconômicos que agravam esse processo (PHILLIPS *et al.*, 2016; LONNIE *et al.*, 2018; SILVEIRA *et al.*, 2012). Como consequência da carência proteica, tem-se a elevação da incapacidade funcional, o aumento da quantidade de internações, o agravamento de doenças pré-existentes, a maior susceptibilidade a infecções, a diminuição da qualidade de vida e o aumento de casos de mortalidade (SOUZA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016)

No envelhecimento, a carência proteica é um dos principais fatores que ocasionam as mudanças no sistema imune inato e adaptativo (TANNOU *et al.*, 2019). A desnutrição proteica induz mudanças estruturais, as quais resultam na involução do timo dos gânglios linfáticos e do baço (SANTOS *et al.*, 2017). Tais modificações podem prejudicar o funcionamento do sistema imunológico, visto que esses órgãos são os principais locais onde a resposta imune acontece (FOCK *et al.*, 2010). Vale ressaltar que, no âmbito da desnutrição, os órgãos linfáticos e hematopoiéticos estão relacionados de forma direta com os déficits na resposta imune, ocasionando um aumento da suscetibilidade a infecções (SANTOS *et al.*, 2017; ORTIZ *et al.*, 2009).

A desnutrição proteica causa, também, a hipoplasia da medula óssea, considerada um tecido complexo, pois apresenta diversas linhagens celulares que estão em vários estágios maturacionais do desenvolvimento (FOCK *et al.*, 2010), o que culmina na diminuição da geração de células hematopoiéticas (SANTOS *et al.*, 2017; BORELLI *et al.*, 2009). A redução da quantidade de progenitores eritrocíticos e a diminuição da maturação celular da linhagem granulocítica também decorrem da desnutrição proteica (XAVIER *et al.*, 2007; VITURI *et al.*, 2008), sendo verificada, ainda, a diminuição dos leucócitos no sangue, principalmente dos linfócitos, o que sugere que algumas deficiências nutricionais podem estar alterando a função

da medula óssea e reduzindo sua capacidade de produzir linfócitos novos (FOCK *et al.*, 2010; KUVIBIDILA *et al.*, 1993).

1.3. HEMATOPOESE E MICROAMBIENTE HEMATOPOÉTICO

Compreende-se por hematopoese o processo que envolve a formação, maturação e diferenciação das células sanguíneas (SANTOS *et al.*, 2017). Em síntese, a hematopoese caracteriza-se por sua alta taxa de renovação, tendo em vista que as células maduras apresentam tempo de vida relativamente curto na circulação sanguínea, e por sua flexibilidade e adaptação às diferentes situações fisiológicas e patológicas (GROARKE *et al.*, 2019). As células sanguíneas desempenham inúmeras funções que são primordiais para o funcionamento do organismo, como a regulação da homeostase sanguínea, o transporte do gás oxigênio e o controle do sistema imune inato e adaptativo (DEXTER, 1991). Desse modo, é fundamental que haja a manutenção da homeostasia e da plasticidade, estabelecendo-se um concentrado de células sanguíneas adequados para a sobrevivência do organismo (GROARKE *et al.*, 2019).

Nos adultos, a hematopoese ocorre no tecido hematopoético da medula óssea, em regiões histo-anatômicas específicas, chamadas de microambientes hematopoético, onde as células tronco hematopoéticas residem (FERNANDEZ e DE ALARCON, 2013; ASRI, *et al.*, 2016). Esse microambiente foi descrito por Schofield como regulador das células tronco hematopoéticas (CTHs), modulando os processos de diferenciação, proliferação e auto-renovação (SCHOFIELD, 1978).

No microambiente medular há uma localização anatômica conhecida como nicho hematopóético (SCHOFIELD, 1978). As CTHs estão localizadas próximas às regiões endostiais e distribuídas em grande quantidade no nicho hematopoético endosteal e no nicho hematopoético perivascular (TRUMPP *et al.*, 2010). O nicho endosteal localiza-se na interface entre a medula óssea e o osso trabecular, sendo composto principalmente por osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Por sua vez, o nicho perivascular é composto por uma alta densidade de células endoteliais, células mesenquimais multipotentes e células musculares lisas (BRAHAM *et al.*, 2017).

Composto pelo sistema celular hematopoético e estromal, pela matriz extracelular e por um conjunto de substâncias solúveis (DEANS e MOSELEY, 2000), o microambiente medular mostra-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica, pois fornece o

parênquima de sustentação para as CTHs e concede um “ambiente bioquímico” primordial para a proliferação, diferenciação e maturação dessas células (MENDEZ-FERRER *et al.*, 2015). Além disso, ele é o responsável pela liberação das células hematopóéticas da medula óssea para o sangue periférico (VITURI *et al.*, 2000).

O sistema estromal é constituído por uma malha de tecido conjuntivo e também por uma diversidade de células, como fibroblastos, células endoteliais, células reticulares e adipócitos, entre outros tipos celulares (ANJO *et al.*, 2000). Dentre as células que fazem parte do estroma, destaca-se a célula-tronco mesenquimal (CTM), responsável por promover o estroma de suporte para hematopoese (HOCKING & GIBRAN, 2010). O estroma é fundamental na tradução de sinais extramedulares para as CTHs, posto que o mesmo é altamente flexível aos estímulos externos (MULLER-SIEBURG e DERYUGINA, 1995). Desse modo, o estroma irá modular a sobrevivência, proliferação e o desenvolvimento das células hematopóéticas em todos os seus níveis de diferenciação, fenômeno que ocorre por meio da produção local de citocinas e de proteínas da MEC (SATO *et al.*, 2010; KOLF *et al.*, 2007).

Por sua vez, a hematopoese consiste em um fenômeno complexo, altamente regulado e influenciado por vários estímulos que atuam em diferentes níveis do processo (PREHAM *et al.*, 2018). Dessa forma, consideram-se as interações célula-célula e célula-estroma, que ocorrem tanto no microambiente indutor da hematopoese como em outras localizações (TRENTIM, 1978); a ação dos diferentes fatores de crescimento e citocinas; a ação hormonal; a ação de mediadores plasmáticos e celulares da resposta inflamatória; e os impactos do envelhecimento e do estado nutricional do indivíduo (GROARKE & YOUNG, 2019; SANTOS *et al.*, 2017; BORELLI e NARDELLI, 2001).

1.4. CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL (CTM)

As CTMs, denominadas também como células estromais mesenquimais multipotentes, são um conjunto de células clonogênicas encontradas ao longo da medula óssea e têm a capacidade de se diferenciar em tipos celulares integrantes do estroma, sendo, assim, fundamentais para o microambiente medular (ABDALLAH & KASSEM, 2008; HOCKING & GIBRAN, 2010).

Na década de 70, Friedenstein foi o primeiro a exibir evidências sólidas de que a medula óssea contém células precursoras não-hematopoiéticas, desenvolvendo métodos de cultura *in*

in vitro necessários para isolar e testar o potencial de diferenciação das CTMs. O cultivo dessas células culminou na formação de colônias que foram denominadas de unidade formadora de colônia de fibroblasto (CFU-F), pois se assemelhavam aos fibroblastos (FRIEDENSTEIN, 1976).

Em anos posteriores, inúmeros estudos estabeleceram, por métodos iguais ao proposto por Friedenstein, que essas células – conhecidas atualmente como células tronco mesenquimais – são capazes de se diferenciar em tipos celulares mesodérmicos, como miócitos, osteoblastos, condrócitos e adipócitos (KURODA *et al.*, 2010). As CTMS podem ser isoladas de inúmeros tecidos adultos, tais como da medula óssea, cordão umbilical, adiposo, sangue periférico, fígado e polpa do dente (ELAHI *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que as CTMs correspondem uma pequena fração (0,001-0,01%) de todas as células nucleadas da medula óssea. Contudo, elas podem ser isoladas e expandidas *in vitro* com grande êxito, posto que aderem seletivamente a superfícies plásticas quando comparadas com as células hematopoéticas (BARRY & MURPHY, 2004). Quanto à sua morfologia, apresentam características fusiformes e fibroblastóide, pois no início do crescimento *in vitro*, formam colônias parecidas com as colônias de fibroblastos (ABDALLAH & KASSEM, 2008).

As CTMs, provenientes de murinos, possuem caracterização fenotípica das células positivas para os marcadores hematopoéticos CD105, CD73, CD90 (BARRY & MURPHY, 2004; KASSEM & ABDALLAH, 2008) e CD44 (KASSEM & ABDALLAH, 2008) e são negativas para CD45, CD34 e CD14. Para caracterizá-las com maior assertividade, dado que os marcadores propostos não são específicos, são usados outros marcadores de superfície complementares, como CD29, CD49e, CD106 (BARRY & MURPHY, 2004; KOLF *et al.*, 2007; MOSNA *et al.*, 2010), CD271 (KUÇI *et al.*, 2010) e Sca-1 (MORIKAWA *et al.*, 2009).

Por meio da interação direta célula-célula e da liberação de um vasto espectro de fatores bioativos, as CTMs podem influenciar a função de outras células, consistindo em um exemplo disso as citocinas e os fatores de crescimento (LI & HUA, 2017). Em relação a esse aspecto, vale frisar que entre os fatores secretados estão compreendidos o fator de crescimento endotélio-vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) -1, fator de crescimento transformador (TGF), fator inibidor da leucemia (LIF), fator derivado de células estromais, angiopoietinas e ILs (FU & LI, 2009; MEIRELLES *et al.*, 2008).

1.5. CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E CAPACIDADE IMUNOMODULADORA

Além de regularem o nicho hematopoético e influenciarem na função das células existentes no microambiente, as CTMs possuem propriedades imunorreguladoras, por meio das quais são capazes de interagir com as células do sistema imune (LI e HUA, 2017). Tais células expressam moléculas de adesão, como ICAM-1, ICAM-2 e VCAM (ZHANG *et al.*, 2004; NAUTA *et al.*, 2006), conseguindo interagir com células T, células B, célula natural killer (NK), macrófagos, células dendríticas (DCs), neutrófilos e mastócitos por meio do contato célula-célula (LI e HUA, 2017). Além disso, modulam a produção de fatores solúveis, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e angiopoietinas (DA SILVA MEIRELLES *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2010; BAIGUERA *et al.*, 2012). Dessa forma, as CTMs possuem um importante papel na modulação da resposta imune.

A plasticidade imunológica das CTMs está diretamente associada com os tipos de estímulos inflamatórios provenientes do microambiente em que estas residem (WANG *et al.*, 2012), um exemplo disso é o caráter imunossupressor adquirido por essas células na presença de citocinas como IFN- γ ou TNF- α (DAZZI *et al.*, 2012). Vale ressaltar que a imunossupressão acontece tanto pelo contato entre as células quanto pela liberação de fatores solúveis pelas CTMs, os quais são mediados por uma variedade de moléculas, como prostaglandina E2 (PGE2), indoleamina-2,3-dioxigenase (IDO), óxido nítrico, IL-27, TGF- β , proteína monocítica quimiotática 1 (MCP-1/CCL2), antígeno leucocitário humano G, molécula de adesão celular, entre outros (DUFFY *et al.*, 2011).

Conforme apontado, as CTMs possuem a capacidade de modular tanto a função de células do sistema imune inato quanto as células do sistema imune adaptativo (LI e HU, 2017). No sistema imune inato, a cocultura de macrófagos com as CTMs ocasiona a geração de macrófagos M2, que secretam elevados níveis de IL-10 e menores níveis de citocinas inflamatórias, como a IL-12, IL-1 β , TNF- α e IL-23, além de aumentarem a capacidade fagocítica ao exibir a expressão reduzida de moléculas coestimuladoras CD86 e MHCII (ZHANG *et al.*, 2010; SELLERI *et al.*, 2016). Ademais, as CTMs podem melhorar o recrutamento de macrófagos para o lugar que sofreu a lesão, promovendo, dessa forma, a regeneração do tecido, melhorando o quadro imunológico (LIU *et al.*, 2016).

Além dos macrófagos, as CTMs modulam as células dendríticas (CD), inibindo a diferenciação e maturação dessas células por meio da secreção de IL-6, fator de crescimento de

colônias macrofágicas (M-CSF) e prostaglandina E₂ (PGE₂), diminuindo a expressão de moléculas co-estimuladoras e modificando o perfil de produção de citocinas por DC (MARTI *et al.*, 2011; NAUTA *et al.*, 2006). Além disso, podem inibir a proliferação e diferenciação das células natural killer (NK) por meio da produção de IDO, TGF- β , PGE₂ e de suas propriedades citotóxicas exercidas pelo contato celular, CTM-NK (SPAGGIARI *et al.*, 2006). Dessa forma, é aceitável considerar que as CTMs possuem um efeito imunomodulador no sistema imune inato.

No sistema imune adaptativo, as CTMs afetam inúmeras propriedades das células T, como a inibição da proliferação de células T CD4⁺, a coibição da formação das células T CD8⁺ citotóxicas, a redução dos níveis de citocinas T_{H1} pró-inflamatórias, o aumento na secreção de citocinas T_{H2} anti-inflamatórias e a indução na produção de células Treg. Essa propriedade imunomodular das células T ocorre por meio da associação de várias moléculas, como a IL-10, HGF, TGF- β , PGE₂, IDO, IFN- α e TNF- α (TABERA *et al.*, 2008; MARTI *et al.*, 2011).

É importante frisar que as CTMs apresentam uma subpopulação produtora de IL-17, que age de forma autócrina e ativa a via de sinalização do NF κ B, inibindo a produção de TGF- β e comprometendo, assim, sua característica imunossupressora (KRSTIC *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2013). Segundo a literatura, as CTMs inibem a diferenciação de células T precursoras de memória e células T *naïve* em T_{H17} por meio da secreção de PGE₂, reduzindo o número de T_{H17} no local da inflamação (DUFFY *et al.*, 2011).

Nas células B, as CTMs exercem efeitos inibitórios ou estimulantes. Em humanos e murinos, as CTMs podem suprimir o processo de proliferação, diferenciação e ativação das células B, de modo que a inibição destas acabará por comprometer o ciclo celular nas fases G0/G1. Por outro lado, o estímulo que as células B podem receber a partir das CTMs resulta na sua diferenciação sem sofrer o processo de apoptose natural, fenômeno observado nesses linfócitos (LI e HUA, 2017). Desse modo, o perfil imunomodulador da CTM é de extrema importância para a regulação do sistema imune como um todo (GLENN e WHARTENBY, 2014).

São poucos os estudos que abordam a relação entre a desnutrição proteica e a imunomodulação das CTMs. No entanto, no recente estudo do nosso grupo foi observado que as CTMs provenientes de animais desnutridos modularam a produção das citocinas TGF- β , IL-1 β e IL-6, evidenciando que a desnutrição proteica modifica as propriedades imunossupressoras dessas células (DOS SANTOS *et al.*, 2016). Até o momento, não existem

estudos que mostrem os efeitos do envelhecimento sobre aspectos proliferativos e imunomodulatórios das CTMs em uma situação de desnutrição proteica.

2. OBJETIVO

Sabendo que o envelhecimento e a desnutrição proteica são capazes de comprometer a hematopoese e, conseqüentemente, a geração das células e a resposta do sistema imune, o que pode causar uma maior suscetibilidade a infecções, e tendo em vista que as CTMs apresentam propriedades imunomodulatórias, possuindo um importante papel na regulação da hematopoese, o objetivo deste trabalho é investigar, em um modelo de envelhecimento submetido a desnutrição proteica, os aspectos relacionados à capacidade imunomodulatória das células tronco mesenquimais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS E DIETA

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, jovens (3 a 6 meses de idade) e idosos (18 e 19 meses de idade), todos isogênicos. A ração destinada aos animais do grupo controle continha 12% de proteína (dieta normoproteica) e a destinada aos animais do grupo desnutrido possuía 2% de proteína (dieta hipoproteica) (**Tabela 1**). A caseína foi utilizada como fonte proteica das rações. As misturas salínica e vitamínica utilizadas foram aquelas recomendadas por REEVES et al., 1993 (**Tabela 2 e 3**). A determinação da concentração proteica das rações foi efetuada segundo o método de micro-Kjedahl (WARD, 1963) e realizada no laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), protocolo CEUA nº 544.

Quando os animais atingiram a idade em relação à qual foram considerados jovens e idosos, foi realizado o período chamado de adaptação, em que os animais foram alimentados com dieta controle por uma semana para estabilizar o peso corporal. Após esse período, foi iniciada a etapa de indução à desnutrição, de modo que os animais foram divididos em dois grupos: o grupo controle, composto pelos animais que receberam a dieta normoproteica, e o

grupo desnutrido, composto pelos animais que receberam a dieta hipoproteica por quatro semanas. A avaliação nutricional foi realizada pelo monitoramento do peso corporal, consumo alimentar e ingestão de proteínas a cada 48 horas durante o período de indução à desnutrição. A variação do peso corporal foi calculada por meio do valor relativo do peso corporal do animal do primeiro e do último dia de indução à desnutrição.

Constituintes	Ração normoproteica (g/Kg de ração)	Ração hipoproteica (g/Kg de ração)
Caseína (85% pureza)	120	20
Mistura salínica	35	35
Mistura vitamínica	10	10
Sacarose	100	100
Óleo de Milho	80	80
Fibra alimentar (Celulose)	10	10
Metionina	1,5	1,5
Bitartarato de Colina	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008
Amido de milho	640,992	740,992

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

Constituintes	Ração Normoproteica e Hipoproteica (g/kg de mistura vitamínica)
Ácido nicotínico	3,00
Panteonato de cálcio	1,60
Ácido fólico	0,20
Piridoxina-HCl	0,70
Riboflavina	0,60
Tiamina-HCl	0,60
D-biotina	0,02
Vitamina A	0,80
Vitamina B12	2,50
Vitamina E	15,00
Vitamina D3	0,25
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,655

Tabela 2: Composição da mistura vitamínica utilizada na produção das rações *in house* (normoproteica e hipoproteica)

Constituintes	Ração Normoproteica (g/kg de mistura salínica)	Ração Hipoproteica (g/kg de mistura salínica)
Carbonato de cálcio	357,00	357,00
Fosfato de potássio	236,16	353,21
Cloreto de sódio	74,00	74,00
Sulfato de potássio	46,60	46,60
Citrato de potássio	39,00	0,00
Óxido de magnésio	24,00	24,00
Citrato férrico	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65
Meta-silicato de sódio	1,45	1,45
Carbonato de Manganês	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30
Sulfato de potássio e crômio	0,275	0,275
Cloreto de lítio	0,0174	0,0174
Selenato de sódio	0,01025	0,01025
Iodeto de potássio	0,01	0,01
Ácido bórico	0,0815	0,0815
Paramobilidato de amônio	0,00795	0,00795
Fluoreto de sódio	0,0635	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066	0,0066
Sacarose	212,646	134,596

Tabela 3: Composição da mistura salínica utilizada na produção das rações *in house* (normoproteica e hipoproteica)

3.2. SANGUE TOTAL E SORO

Após o período de 4 semanas de indução à desnutrição, os animais foram previamente anestesiados com cloridrato de quetamina (50 mg/Kg de massacorporal) associado ao cloridrato de xilazina (50 mg/Kg de massacorporal), via intramuscular. Foi realizada, então, a coleta de sangue total com anticoagulante EDTA 10% para o hemograma e de soro para os exames bioquímicos. No soro, foram dosadas as proteínas totais, albumina, ureia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase), ALT (alanina aminotransferase), colesterol e triglicerídeos. A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método do Biureto (GORNALL, *et al.*, 1949) e a determinação de albumina pelo método do Verde de Bromo Cresol (DOUMAS, *et al.*, 1971). As amostras foram processadas em duplicata e as leituras foram efetuadas em espectrofotômetro automatizado COBAS c501 (ROCHE®). Para a realização do hemograma, o número de eritrócitos e de leucócitos foi determinado no equipamento ABX Micros ABC Vet (Horiba ABX, Montpellier, França). Os valores relativos ao número de leucócitos foram determinados em extensões sanguíneas, realizadas após a coleta do sangue e coradas pela coloração de May Grunwald-Giensa modificada (ROSENFELD, 1947).

3.3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA E REALIZAÇÃO DO MIELOGRAMA

Após a eutanásia, os fêmures de cada animal foram seccionados entre as articulações fêmur-íliaca e fêmur-tibial. Com o auxílio de agulha e seringa, foi realizada a lavagem das cavidades femorais com 4,0 mL de meio de cultura cada, sendo o meio de cultura utilizado o meio Dulbecco modificado (DMEM) baixa glicose (Cultilab®, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab®, Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). Posteriormente, as suspensões celulares foram centrifugadas (1500 rpm por 10 minutos), os sobrenadantes foram desprezados e as células foram cuidadosamente ressuspensas em 1,0 mL do meio DMEM. Foi separado uma alíquota da suspensão celular do fêmur para a realização do mielograma e o material remanescente foi destinado para a caracterização das CTMs. Todos os procedimentos de coleta e cultivo celular foram realizados em fluxo laminar bidirecional para não contaminação das culturas celulares.

3.4. ISOLAMENTO E CULTIVO DE CTMS

O isolamento das CTMs dos animais foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Friedenstein (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976), que se baseia na capacidade que essas células possuem em aderir ao plástico em meio com baixa concentração de glicose, formando culturas celulares relativamente isentas de CTHs e de outras células aderentes que precisam de concentrações elevadas de glicose para sobreviverem (COLTER *et al.*, 2000). Após a obtenção das células da medula, as CTMs dos animais controles e desnutridos foram isoladas e cultivadas em atmosfera umidificada (95%), a 37°C e 5% de CO₂. O crescimento e a morfologia das CTMs foram monitorados a cada 48 horas em microscópio invertido e o meio de cultura foi trocado no 3º, 7º e 14º dias após seu isolamento da MO.

3.5. CARACTERIZAÇÃO DE CTM

As CTMs foram caracterizadas por citometria de fluxo. Para a confirmação do fenótipo da CTM, as culturas celulares foram centrifugadas por 10 minutos a 300g em temperatura ambiente. Efetuada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspense em 400µL de PBS (solução tampão fosfato salina), pH 7,2 e 2 a 5µL de anticorpos para cada 1 x 10⁶ células/mL. Foi realizada incubação por 20 minutos, em temperatura ambiente. Posteriormente, o sedimento celular foi centrifugado por 10 minutos a 300g, na mesma temperatura. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspense em 500µL de PBS, sendo realizada a centrifugação por 10 minutos a 300g, em temperatura ambiente. Após nova lavagem, foram adicionados 400µL de PBS pH 7,2 e realizadas as aquisições em citômetro de fluxo. Os anticorpos utilizados foram os seguintes: anti-CD14 (Catálogo 5577195), -CD34 (Catálogo 560233), -CD45 (Catálogo 553087), -CD90 (Catálogo 561404), -CD271 (Catálogo 557195), -CD73 (Catálogo 550741) e CD105 (Catálogo 562759), todos obtidos da BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA. O painel de anticorpos descrito foi utilizado para a caracterização das CTM. Os controles negativos foram realizados por *fluorescenceminusone* (FMO). Após a marcação com os anticorpos, o perfil fenotípico dessas células foi obtido por citometria de fluxo (BD FACSCanto II[®], BECTON DICKSON, San Jose, EUA) e analisado pelo software FlowJo[®]10 (Tree Star Inc., Ashland, EUA).

3.6. AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA

Após o cultivo das CTMs, tais células foram plaqueadas na concentração de 5×10^5 em uma placa de 24 poços. Após esse período, o meio de cultura foi removido das células e a placa foi enxaguada uma vez com 1 mL de PBS. Posteriormente, foram adicionados 500 ul de solução fixadora a cada poço por 10 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi lavada duas vezes com 1 mL de PBS e, então, foram adicionados 500 ul da solução de coloração com β -Galactosidase a cada poço (*Senescence β -Galactosidase Staining Kit*). Por fim, houve a incubação da placa a 37°C, *overnight*, em uma incubadora seca (sem CO₂). As células foram verificadas em um microscópio (ampliação total de 200X), verificando-se que as células senescentes desenvolvem a cor azul.

3.7. EXPRESSÃO RELATIVA DE mRNA

Após o cultivo das CTMs, foi extraído o RNA total com o kit de extração RNeasy (Qiagen, Germantown, MD, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O RNA total (250ng) foi transcrito reversamente em cDNA, sendo utilizado o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As amostras de cDNA foram amplificadas no TaqMan Fast Advancedmaster mix (AppliedBiosystems). Para tal, foram utilizados os genes IL-10 (Mm01288386_m1, Applied Biosystems), IL-6 (Mm00446190_m1, Applied Biosystems), IL-1 β (Mm00434228_m1, Applied Biosystems), NOS2 (Mm00440502_m1, AppliedBiosystems), *Nfkb2* (Mm00479807_m1, AppliedBiosystems), STAT-1 (Mm01257286_m1, Applied Biosystems) e STAT-3 (Mm01219775_m1, Applied Biosystems). O Gapdh (Mm99999915_g1, AppliedBiosystems) foi utilizado como controle interno. A expressão gênica foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando Step One Plus™ (AppliedBiosystems). Os valores quantitativos da expressão gênica foram obtidos pelos valores do Ct, caracterizado pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi empregado o método de quantificação relativa (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) segundo a seguinte fórmula: Taxa de expressão relativa = $2^{-(\Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ calibrador})} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$. O ΔCt foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média dos Cts do controle endógeno

para a normalização dos dados. Como calibrador, foi utilizada a média aritmética do ΔC_t das CTMs do grupo controle, empregada como base para resultados comparativos.

3.8. PRODUÇÃO DE CITOCINAS POR CTM

Para investigar se o envelhecimento e a desnutrição foram capazes de afetar aspectos imunomodulatórios das CTMs, foram coletados os sobrenadantes das mesmas para dosar as citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10 e TGF- β por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Quantikine[®] ELISA, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), seguindo as orientações do fabricante.

3.9. O EFEITO DO CONDICIONADO DE CTM SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE RAW E PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Após o cultivo das CTMs, o sobrenadante produzido pelas células foi utilizado para a realização da cultura condicionada com macrófagos da linhagem Raw 264.7 (*mouse leukaemic monocytemacrophage cell line*). Essas células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modificado (DMEM) baixa glicose (Cultilab[®], Campinas, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Cultilab[®], Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA) e 100 μ g/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA), em atmosfera umidificada (95%), a 37°C e 5% de CO₂, sendo o seu meio de cultura trocado a cada 3 dias. Quando próximas da confluência, as Raw foram tripsinizadas e plaqueadas junto com o sobrenadante de CTMs, na concentração de 2x10⁵ RAW/400 μ L de sobrenadantes de CTMs obtidos dos animais dos quatro grupos. Após o plaqueamento, as células foram estimuladas com 1,25 μ g/mL de LPS (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA) por 24 horas. Passado esse período, os sobrenadantes foram coletados e acondicionados à temperatura de -40°C para a determinação da produção de citocinas (IL-10, IL-6, TNF- α , IL-1 β e IL-1 α) por ELISA. A proliferação dessas células foi determinada por meio do ensaio de MTT.

3.10. O EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CTM NA PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA E PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Após o cultivo das CTMs, o sobrenadante produzido pelas células foi utilizado para a realização da cultura condicionada com linfócitos. Assim, os baços dos camundongos C57BL/6 foram removidos e dissociados suavemente por meio do uso de agulhas e pinças em placas de Petri contendo 2 mL de Dulbecco modificado (DMEM) baixa glicose (Cultilab[®], Campinas, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Cultilab[®], Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA). A cápsula do baço foi descartada e o conteúdo intracapsular foi ressuspenso em 2 mL de DMEM, sendo homogeneizado e colocado na geladeira por 10 minutos. Após esse período, foram colocados 4 mL de FicollHistopaque[®] (SigmaAldrich) em um tubo estéril, no qual foi adicionado lentamente o sobrenadante resultante e então, centrifugado em 400g por 30 minutos. Posteriormente, com auxílio de uma pipeta de Pasteur, foi realizada a retirada somente da fase celular mononuclear que, colocada em tubo estéril, foi lavada com PBS e centrifugada em 1500 rpm por 5 minutos. Por fim, ressuspendeu-se com 1 mL de meio DMEM. A contagem celular foi realizada na câmara de Neubauer e as células mononucleares foram plaqueadas com sobrenadante de CTMs na concentração de 2×10^5 células mononucleares/400µL de sobrenadantes de CTMs dos quatro grupos estudados. Após o plaqueamento, as células foram estimuladas com 1,25 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, EUA) por 72 horas. Transcorrido esse período, os sobrenadantes foram coletados e acondicionados à temperatura de -40°C para a determinação da produção de citocinas (IL-2, IL-10, IL-4, IL-17 e INF γ) por ELISA e a proliferação celular foi determinada por meio do ensaio de MTT.

3.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA

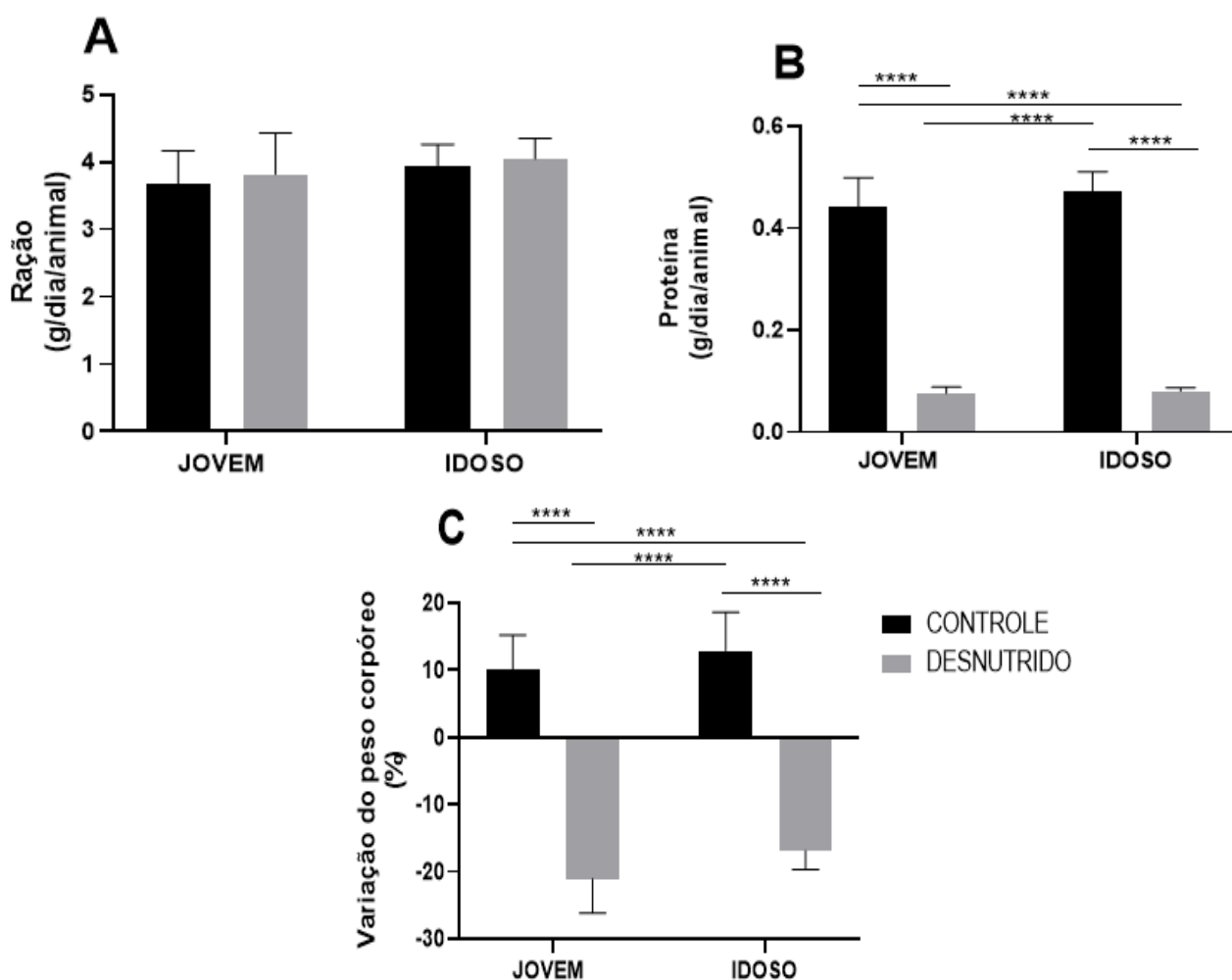
Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o programa Graph Pad Prism 8. Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de homocedasticidade da amostra e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva Normal (curva Gaussiana). Os dados obtidos em nossos experimentos foram analisados por ANOVA 2 vias, sendo utilizado o pós teste de Tukey. Diferenças estatísticas com valores de $p \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

4. RESULTADOS

4.1. AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL

Após o período de uma semana de adaptação, tanto os animais jovens quanto os idosos foram separados em grupos controle e desnutrido, obtendo-se, assim, os grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso. Ao final do período de indução de quatro semanas, os animais consumiram uma quantidade similar de ração. Quando comparado ao primeiro dia de dieta, o grupo desnutrido jovem perdeu em torno de 20% de peso, enquanto o grupo desnutrido idoso perdeu cerca de 16% de peso. Em relação ao consumo de proteína, os grupos controles consumiram mais proteínas que os desnutridos (**Gráfico 1**).

Gráfico 1: (A) Resultados representam a média do consumo de ração em gramas por dia e por animal, (B) Resultados representam a variação final do peso corpóreo, (C) Resultados representam a média do consumo diário



de proteína em gramas por dia dos grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso, n=10 (número de animais). Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (* $p \leq 0,05$), (** $p \leq 0,01$), (***) $p \leq 0,001$), (**** $p \leq 0,0001$).

4.2. ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA, ALBUMINA, UREIA, CREATININA, AST (ASPARTATO AMINOTRANSFERASE), ALT (ALANINA AMINOTRANSFERASE), COLESTEROL E TRIGLICERÍDEOS

Em relação ao fator nutricional, observou-se que a concentração de proteína sérica, ureia, albumina, colesterol e triglicerídeos foi menor nos grupos dos animais desnutridos do que nos controles, tanto de jovens quanto de idosos; houve um aumento na concentração de AST nos grupos desnutridos em relação aos controles, jovens e idosos; a concentração de ALT foi menor no desnutrido idoso em relação ao controle idoso. No envelhecimento, nota-se a redução de albumina e triglicerídeos e aumento de colesterol no grupo controle idoso em relação ao controle jovem. Além disso, houve redução de triglicerídeos no grupo desnutrido idoso quando comparado ao desnutrido jovem. Na interação entre os grupos, foi observado que o desnutrido idoso teve menor concentração de proteína sérica, albumina, ureia, ALT, colesterol e triglicerídeo em relação ao controle jovem. Não foi observado nenhuma alteração na creatinina (**Tabela 4**).

Bioquímica	Controle Jovem	Desnutrido Jovem	Controle Idoso	Desnutrido Idoso
Proteína Sérica (g/dL)	5,37 \pm 0,29	4,69 \pm 0,26 ^a	5,18 \pm 0,38 ^f	4,42 \pm 0,28 ^{b,e}
Albumina (g/dL)	3,27 \pm 0,28	2,5 \pm 0,25 ^a	2,97 \pm 0,20 ^{c,f}	2,27 \pm 0,24 ^{b,e}
Uréia (g/dL)	29,60 \pm 2,06	15,10 \pm 3,42 ^a	34,90 \pm 8,29 ^f	19,10 \pm 3,72 ^{b,e}
Creatinina (g/dL)	0,14 \pm 0,03	0,11 \pm 0,01	0,15 \pm 0,03	0,12 \pm 0,03
AST (U/L)	76,20 \pm 6,19	100,8 \pm 8,24 ^a	72,80 \pm 19,00 ^f	94,50 \pm 24,96 ^b
ALT(U/L)	37,80 \pm 3,32	34,00 \pm 4,76	31,50 \pm 6,39	24,90 \pm 6,74 ^{d,e}
Colesterol(mg/dL)	119,2 \pm 12,37	97,70 \pm 7,02 ^a	144,7 \pm 13,20 ^{c,f}	105,6 \pm 6,31 ^{b,e}
Triglicerídeos (U/L)	63,70 \pm 5,27	48,20 \pm 3,42 ^a	51,70 \pm 3,26 ^c	37,50 \pm 2,41 ^{b,d,e}

Tabela 4: Parâmetros bioquímicos dos grupos CONTROLE JOVEM (CJ), DESNUTRIDO JOVEM(DJ), CONTROLE IDOSO(CI), DESNUTRIDO IDOSO(DI), n=10 (número de animais). (^a)CJ x DJ, (^b) CI x DI, (^c) CJ x CI, (^d) DJ x DI, (^e) CJ x DI, (^f) DJ x CI. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM).

4.3. PERFIL HEMATOLÓGICO

Quanto à análise do hemograma, foi observado que o grupo desnutrido jovem e idoso apresentou redução significativa nas hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos em relação aos seus respectivos controles. A interação entre os grupos mostrou redução de hemácias, hemoglobina, hematócrito, leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócito no grupo desnutrido idoso em relação ao grupo controle jovem (**Tabela 5**).

Hemograma	Controle Jovem	Desnutrido Jovem	Controle Idoso	Desnutrido Idoso
Hemácias($\times 10^6/\text{mm}^3$)	6,00 \pm 1,26	4,56 \pm 1,04 ^a	5,32 \pm 0,86	4,30 \pm 0,58 ^{b,e}
Hemoglobina(g/dL)	8,08 \pm 1,88	6,00 \pm 1,5 ^a	7,28 \pm 1,56	5,61 \pm 1,50 ^{b,e}
Hematócrito (%)	26,78 \pm 5,57	20,29 \pm 4,75 ^a	24,54 \pm 1,46	19,72 \pm 4,28 ^{b,e}
Leucócitos (/mm ³)	1,73 \pm 0,38	1,00 \pm 0,82 ^a	1,63 \pm 0,65 ^f	0,87 \pm 0,42 ^{b,e}
Neutrófilos (/mm ³)	388,2 \pm 289,3	154,8 \pm 140,7 ^a	397,1 \pm 208,5 ^f	168,1 \pm 128,6 ^{b,e}
Linfócitos(/mm ³)	1283,0 \pm 337,0	732,2 \pm 594,2 ^a	1237,0 \pm 622,0	672,9 \pm 382,0 ^{b,e}
Monócitos(/mm ³)	48,79 \pm 26,94	13,50 \pm 21,94 ^a	28,64 \pm 30,63	3,231 \pm 6,648 ^{b,e}
Eosinófilo (/mm ³)	15,29 \pm 19,13	6,429 \pm 23,48	17,07 \pm 27,44	2,429 \pm 6,123

Tabela 5: Parâmetros hematológicos dos grupos CONTROLE JOVEM (CJ), DESNUTRIDO JOVEM(DJ), CONTROLE IDOSO(CI), DESNUTRIDO IDOSO(DI), n=14 (número de animais). (^a)CJ x DJ, (^b) CI x DI, (^c) CJ x CI, (^d) DJ x DI, (^e) CJ x DI, (^f) DJ x CI. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM).

4.4. AVALIAÇÃO DO MIELOGRAMA

Foi analisada a contagem diferencial das células medulares dos quatro grupos estudados. Na desnutrição, observou-se que houve redução da contagem de células totais e de eritrócitos jovens nos grupos desnutridos jovens e idosos. Além disso, para o grupo desnutrido jovem foram menores: os blastos, formas jovens, forma em anel, forma segmentada, linfócito e eritroblasto maduro quando comparados ao controle jovem. No envelhecimento, houve redução de células totais, blastos, formas jovens, forma em anel, linfócito, eritroblasto jovem e eritroblasto maduro no controle idoso em relação ao controle jovem. A interação entre os grupos mostrou redução de células totais, blastos, formas jovens, forma em anel, forma segmentada, linfócito, eritroblasto jovem e eritroblasto maduro no grupo desnutrido idoso em relação ao controle jovem (**Tabela 6**).

Células medulares	Controle Jovem	Desnutrido Jovem	Controle Idoso	Desnutrido Idoso
Células totais (x10 ⁶ /mL)	14,83± 0,42	8,11 ± 0,82 ^a	8,350 ±2,87 ^c	4,792±2,88 ^{b, e}
Blasto(x10 ⁵ /mL)	3,30 ±1,05	1,67±0,27 ^a	1,95±0,84 ^c	0,88±0,39 ^e
Granulócitos				
Formas Jovens (x10 ⁵ /mL)	4,55±0,52	3,10±0,36 ^a	2,92±0,80 ^c	1,92±1,21 ^e
Formas em Anel (x10 ⁵ /mL)	9,50±1,91	5,94±0,95 ^a	5,99±1,79 ^c	4,26±2,92 ^e
Formas segmentadas(x10 ⁵ /mL)	53,74±5,80	30,21±7,35 ^a	36,43±17,43	18,51±11,5 ^e
Eosinófilos(x10 ⁵ /mL)	2,76±1,66	0,84±0,72	2,05±1,85	1,40±0,77
Eritroblastos Jovens (x10 ⁵ /mL)	6,03±0,89	3,13±0,90 ^a	3,99±1,12 ^c	2,29±1,08 ^{b, e}
Eritroblastos Maduros (x10 ⁵ /mL)	36,12±3,32	18,25±2,01 ^a	16,39±9,17 ^c	9,62±6,66 ^e
Linfócitos(x10 ⁵ /mL)	32,07± 5,47	17,82±3,62 ^a	13,91±6,62 ^c	8,75±6,60 ^e
Monócitos(x10 ⁵ /mL)	0,27±0,22	0,17±0,19	0,12±0,12	0,1±0,08

Tabela 6: Mielograma dos grupos CONTROLE JOVEM (CJ), DESNUTRIDO JOVEM(DJ), CONTROLE IDOSO(CI), DESNUTRIDO IDOSO(DI), n=14 (número de animais). (^a)CJ x DJ, (^b) CI x DI, (^c) CJ x CI, (^d) DJ x DI, (^e) CJ x DI, (^f) DJ x CI. Resultados expressos em média ± desvio padrão da média (DPM).

4.5. CARACTERIZAÇÃO DAS CTMs

As CTMs foram caracterizadas por meio da morfologia e imunofenotipagem celular.

➤ **Morfologia das CTMs**

Com objetivo de investigar possíveis diferenças morfológicas das CTMs entre os quatro grupos estudados, foi analisada em microscópio óptico invertido a morfologia dessas células cultivadas por 3, 7 e 14 dias desde a sua coleta. Para todos os grupos foram plaqueados 1×10^6 células/mL (**Figura 1**). Na fotomicrografia apresentada seguir, são observadas as morfologias fusiformes (*fibroblast-like*) das células, características das CTMs, dos 4 grupos estudados.

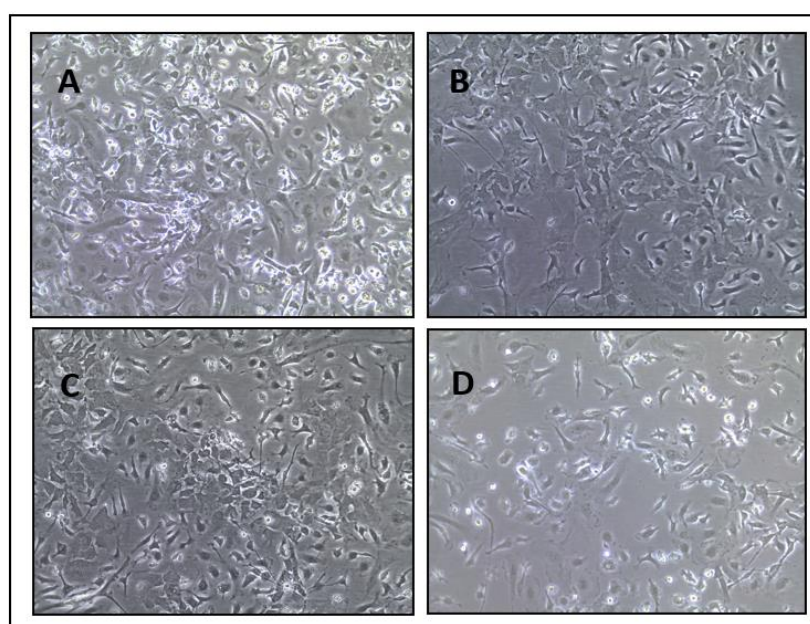


Figura 1: Fotomicrografias representativas de CTMs durante o cultivo celular, após 14 dias do plaqueamento, Controle jovem (A), Desnutrido jovem (B), Controle idoso (C) e Desnutrido idoso (D) (magnitude óptica 20x).

➤ **Imunofenotipagem das CTMs**

Para caracterizar as CTMs dos quatro grupos, foram utilizados os seguintes marcadores: CD45, CD14, CD34, CD90, CD73, CD105 e CD271. Conforme expresso pelo histograma exibido abaixo, as CTMs apresentaram um fenótipo característico, sendo positivas para CD90, CD73, CD105 e CD271, e negativas para CD45, CD14 e CD34 (**Figura 2**). Foi observado que para o marcador CD73 houve redução no desnutrido jovem e idoso quando comparados ao controle jovem (**Gráfico 3**).

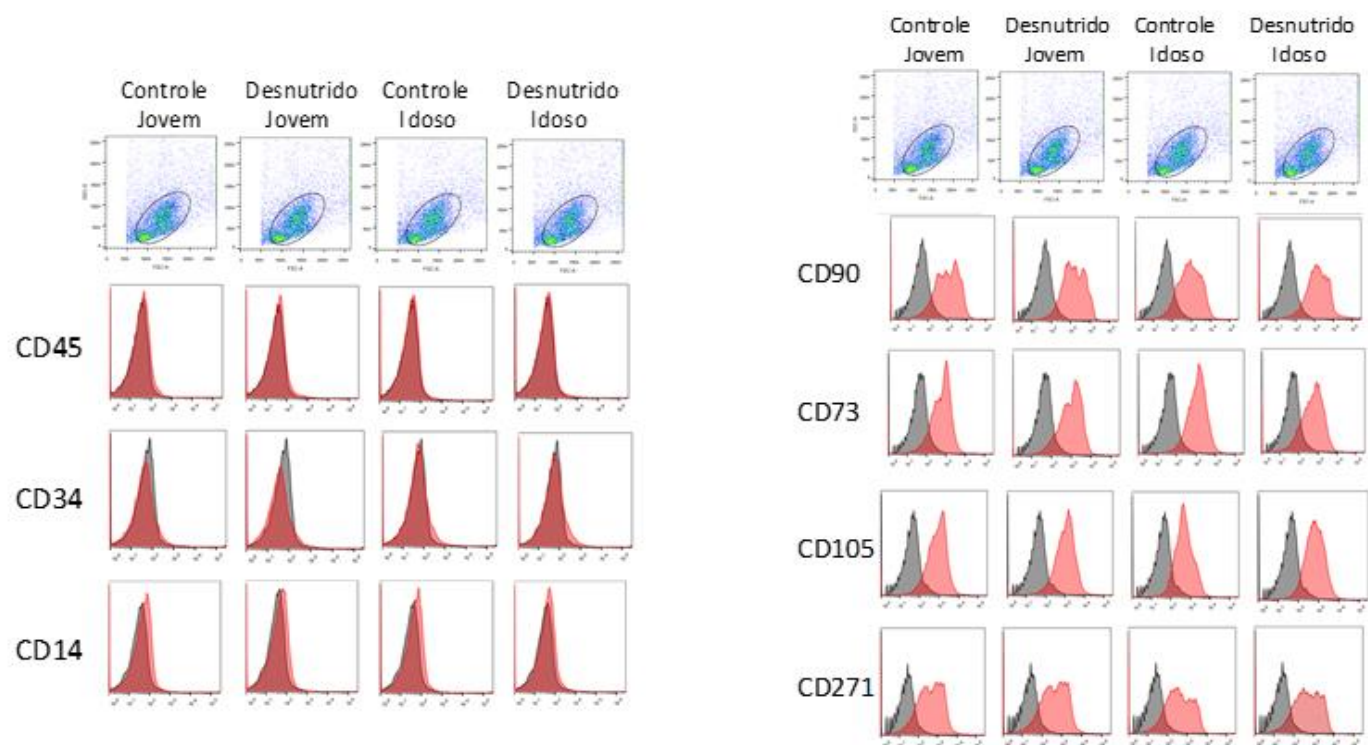


Figura 2. Imunofenotipagem das CTMs. Histogramas obtidos por meio da citometria de fluxo (FASCCan®, BECTON DICKSON, San Jose, CA) resultantes da imunofenotipagem da população total dos quatro grupos estudados.

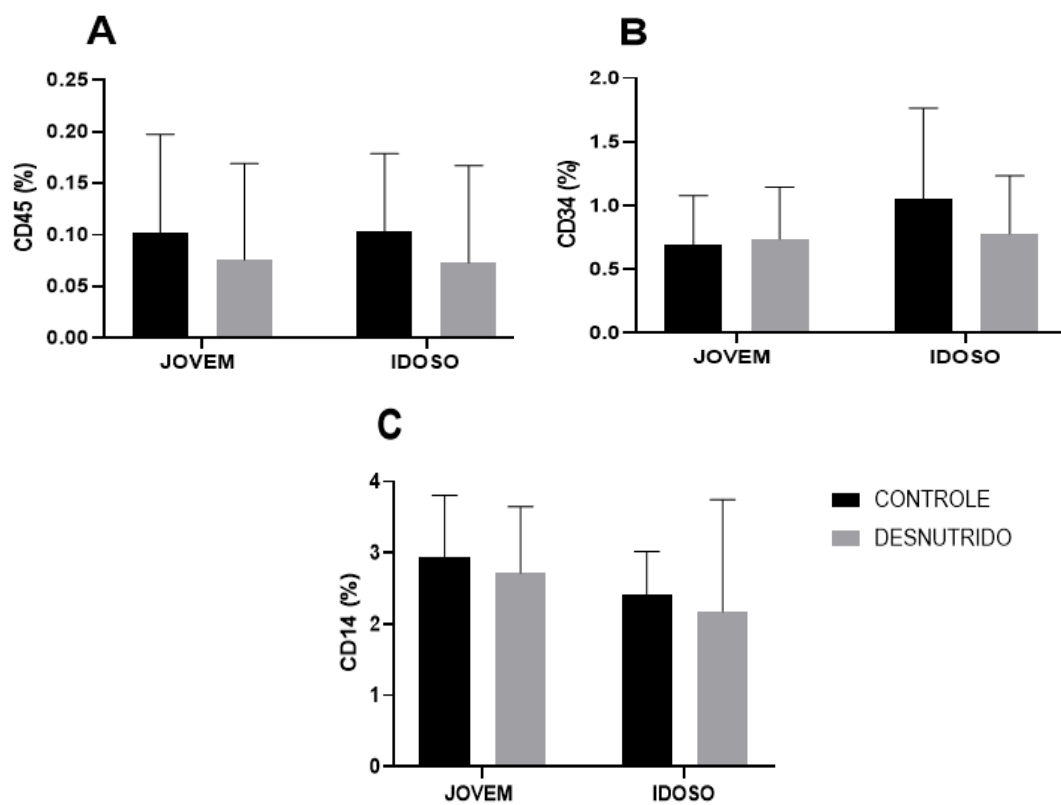


Gráfico 2: Valores referente a porcentagem da marcação fenotípica dos grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso; n=6 (número de animais). (A) CD45, (B) CD34, (C) CD14. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM).

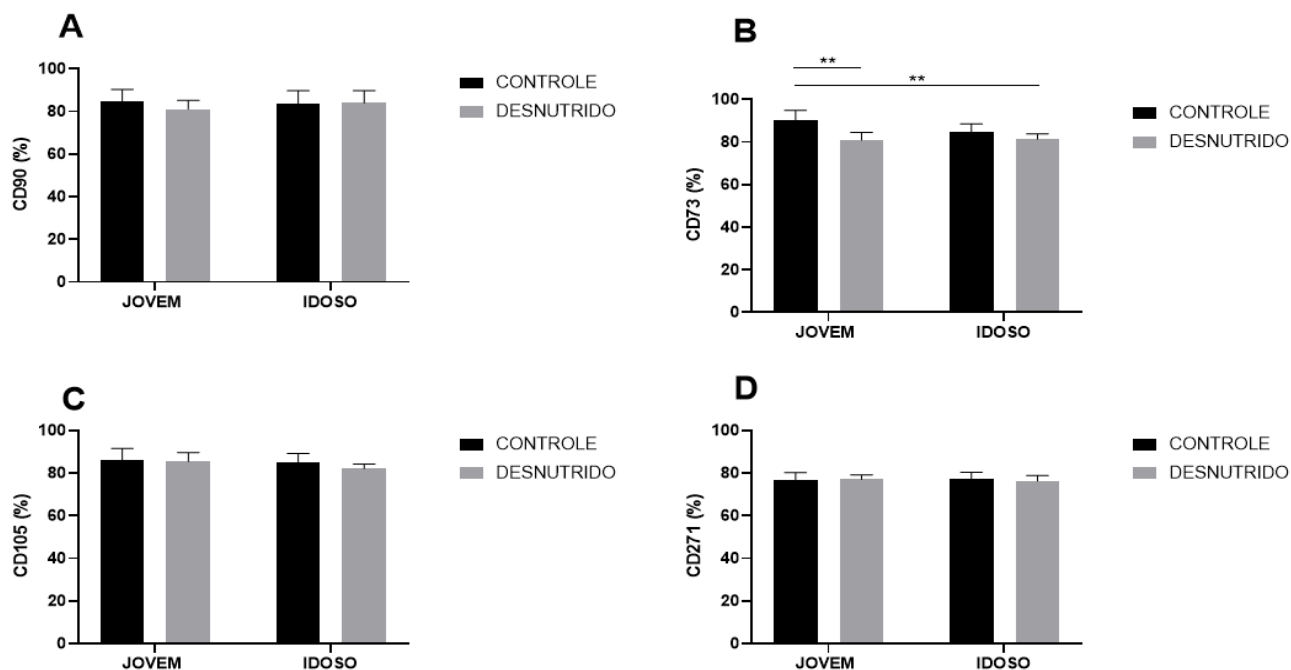


Gráfico 3: Valores referente a porcentagem da marcação fenotípica dos grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso; n=6 (número de animais). (A) CD90, (B) CD73, (C) CD105, (D) CD271. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (** p \leq 0,01).

4.6. AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA

O envelhecimento a nível celular foi avaliado por meio do método de detecção enzimática para β -galactosidase associado à senescência (SA- β -gal). A figura abaixo mostra as CTMs após estas serem expostas a um substrato cromogênico (X-Gal; 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β D-galactopiranosídeo), podendo-se observar que as células senescentes produziram um precipitado na cor azul, detectado por microscopia. O resultado mostrou que as células do grupo dos animais idosos foram mais senescentes que as células do grupo dos jovens (**Gráfico 4**).

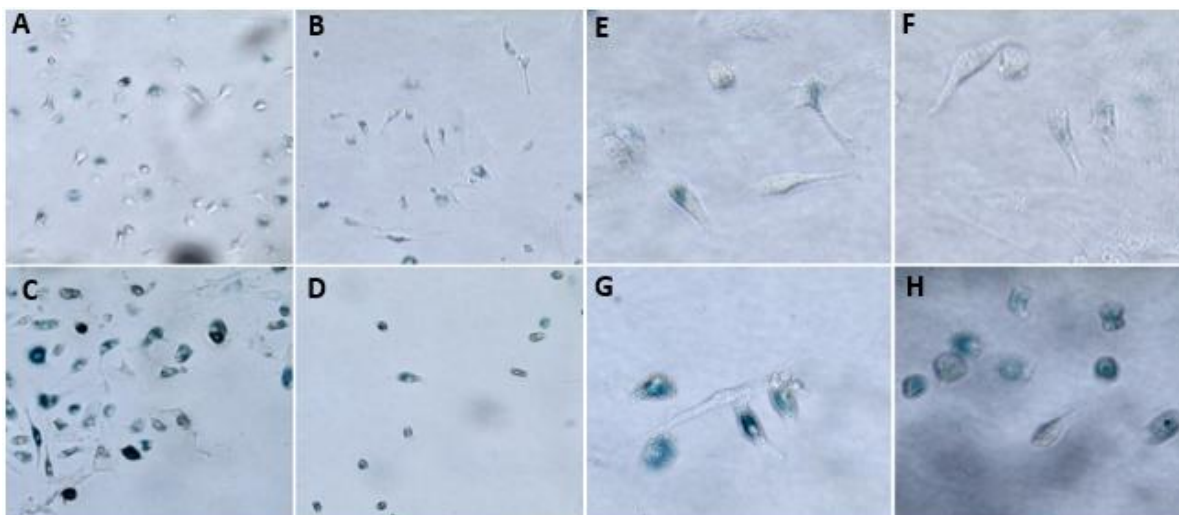


Figura 3: Fotomicrografias representam as CTMs senescente, precipitado azul, e não senescente. CONTROLE JOVEM (A), DESNUTRIDO JOVEM (B), CONTROLE IDOSO (C) e DESNUTRIDO IDOSO (D) (magnitude óptica 20x); CONTROLE JOVEM (E), DESNUTRIDO JOVEM (F), CONTROLE IDOSO (G) e DESNUTRIDO IDOSO (H) (MAGNITUDE ÓPTICA 40X).

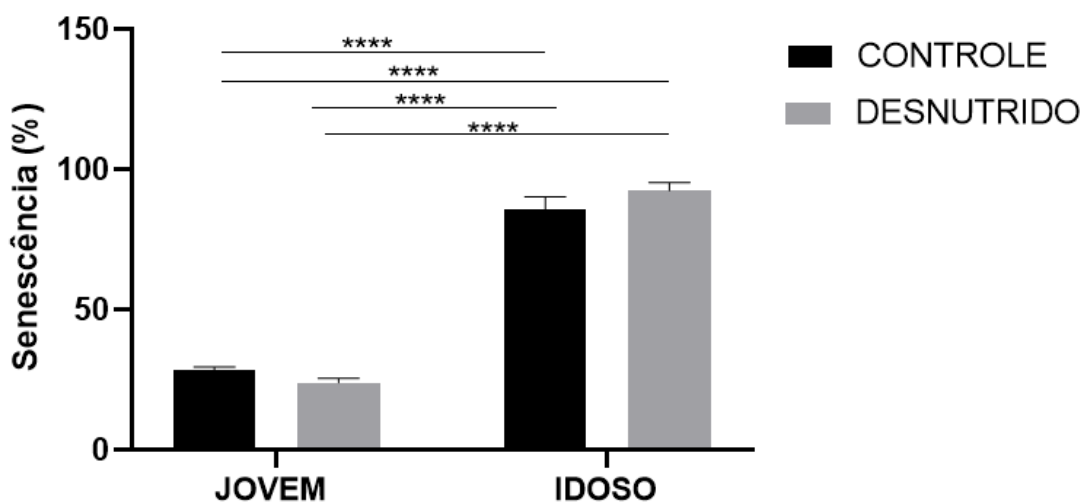


Gráfico 4: Resultado representa a porcentagem de células em senescência entre os grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso; n=3 (número de animais). Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (**** $p \leq 0,0001$).

4.7. DOSAGEM DE CITOCINAS POR ELISA

Com o objetivo de investigar se o envelhecimento e a desnutrição foram capazes de imunomodular as CTMs, essas células, depois de cultivadas, foram plaqueadas (1×10^6 células da cultura) e estimuladas com LPS por 24 horas. Foram dosadas as seguintes citocinas: IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-10 e PGE₂. Na desnutrição, houve redução das citocinas IL-1 β , TGF- β , e PGE₂ e aumento de IL-6 nos jovens, sendo a concentração de TGF- β no grupo DESNUTRIDO IDOSO menor que a do grupo CONTROLE IDOSO. No envelhecimento, houve aumento de IL-6 e IL-1 β e redução de TGF- β e PGE₂ (**Gráfico 5**).

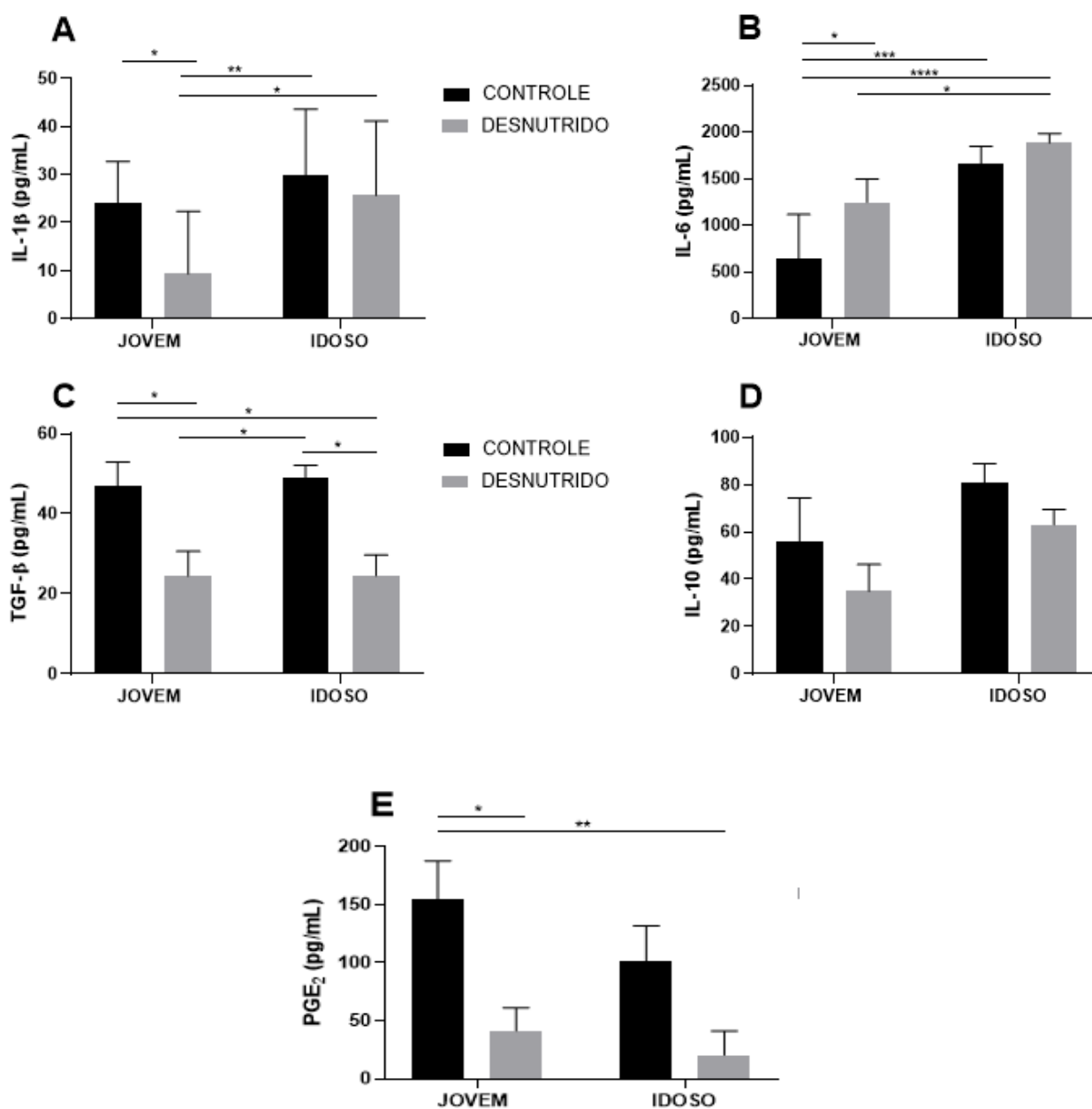


Gráfico 5: Resultados representam a média da dosagem de citocinas entre os grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso; n=5 (número de animais). (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) TGF β , (D) IL-10 e (E) PGE₂. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (*p \leq 0,05), (** p \leq 0,01), (***) p \leq 0,001), (**** p \leq 0,0001).

4.8. EXPRESSÃO RELATIVA DE mRNA

A fim de avaliar se a desnutrição proteica e o envelhecimento modulam as CTMs a partir da expressão relativa de mRNA, foram analisados os genes IL-1 β , IL-6, IL-10, NOS, NF κ B, STAT-1 e STAT-3 (**Gráfico 6**). Assim, no envelhecimento, foi observado aumento na expressão de NOS (**Gráfico 6D**) e NF κ B (**Gráfico 6G**) e redução na expressão de STAT-3 (**Gráfico 6F**) tanto no grupo controle idoso como no grupo desnutrido idoso quando comparados ao grupo jovem.

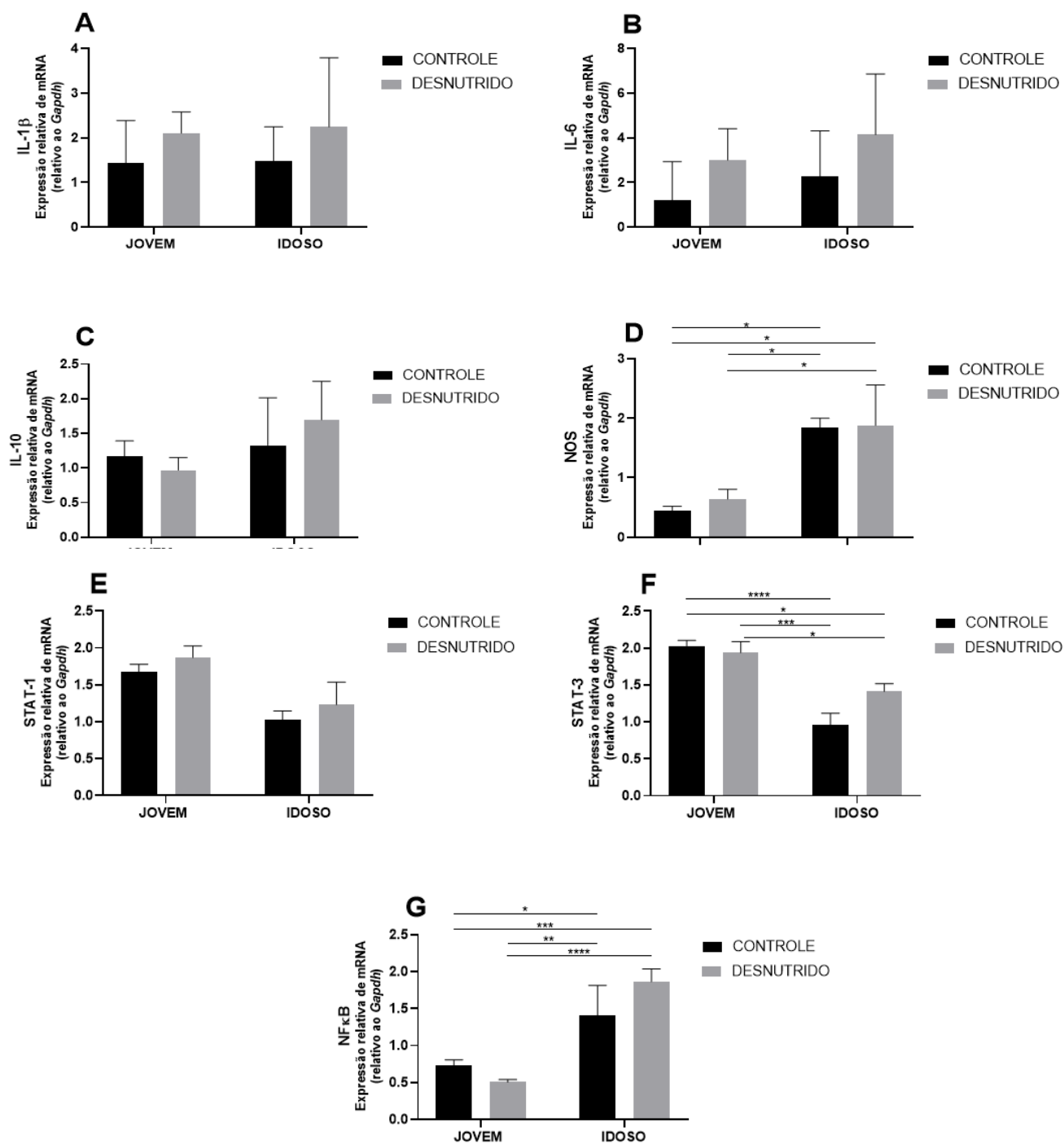


Gráfico 6: Expressão relativa de mRNA nos grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso; n=5 (número de animais). (A) IL-1 β (B) IL-6 (C) IL-10 (D) NOS (E) STAT-1 (F) STAT-3 e (G) NF κ B. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (*p \leq 0,05) (** p \leq 0,01), (***) p \leq 0,001), (**** p \leq 0,0001).

4.9. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MEIO CONDICIONADO DE CTM SOBRE A PROLIFERAÇÃO RAW E PRODUÇÃO DO CITOCINA.

Com intuito de avaliar se as CTMs têm a capacidade de imunomodular os macrófagos, foram cultivados macrófagos da linhagem RAW 264.7 no meio condicionado de CTMs e estimulados com LPS por 24 horas. Depois desse período, foi analisada a proliferação dos macrófagos por MTT, assim como a sua produção de citocina IL-1 α , IL-1 β , IL-10 e TNF α . De acordo com a análise dos dados, as RAW+LPS cultivadas com meio condicionado de CTMs dos quatro grupos estudados proliferaram menos do que quando comparada à RAW+LPS cultivada na ausência do meio condicionado (**Gráfico 7**). Quanto à produção de citocinas, houve redução de TNF α e IL-1 α e aumento de IL-10 nos quatro grupos RAW+LPS cultivados com meio condicionado de CTMs em comparação com a RAW+LPS cultivada na ausência de meio condicionado de CTMs (**Gráfico 8.A, 8.B e 8.C**). Adicionalmente, observou-se redução de IL-1 β na RAW+LPS cultivada com meio condicionado de CTMs do grupo jovem em comparação com a RAW+LPS cultivada na ausência de meio condicionado de CTMs (**Gráfico 8.D**)

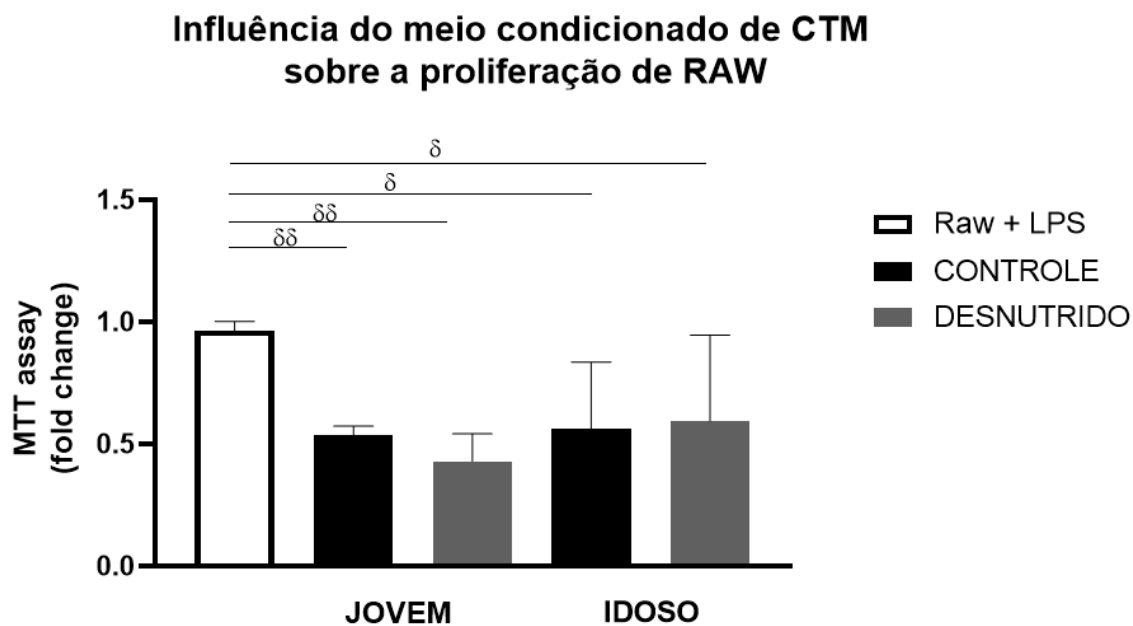


Gráfico 7: Resultados representam a absorbância da influência do meio condicionado de CTM sobre a proliferação de RAW, entre os grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso; n=4 (número de animais). Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos ($^{\delta}$ $p \leq 0,05$), ($^{\delta\delta}$ $p \leq 0,01$).

Influência do meio condicionado de CTM sobre a produção de citocina por RAW

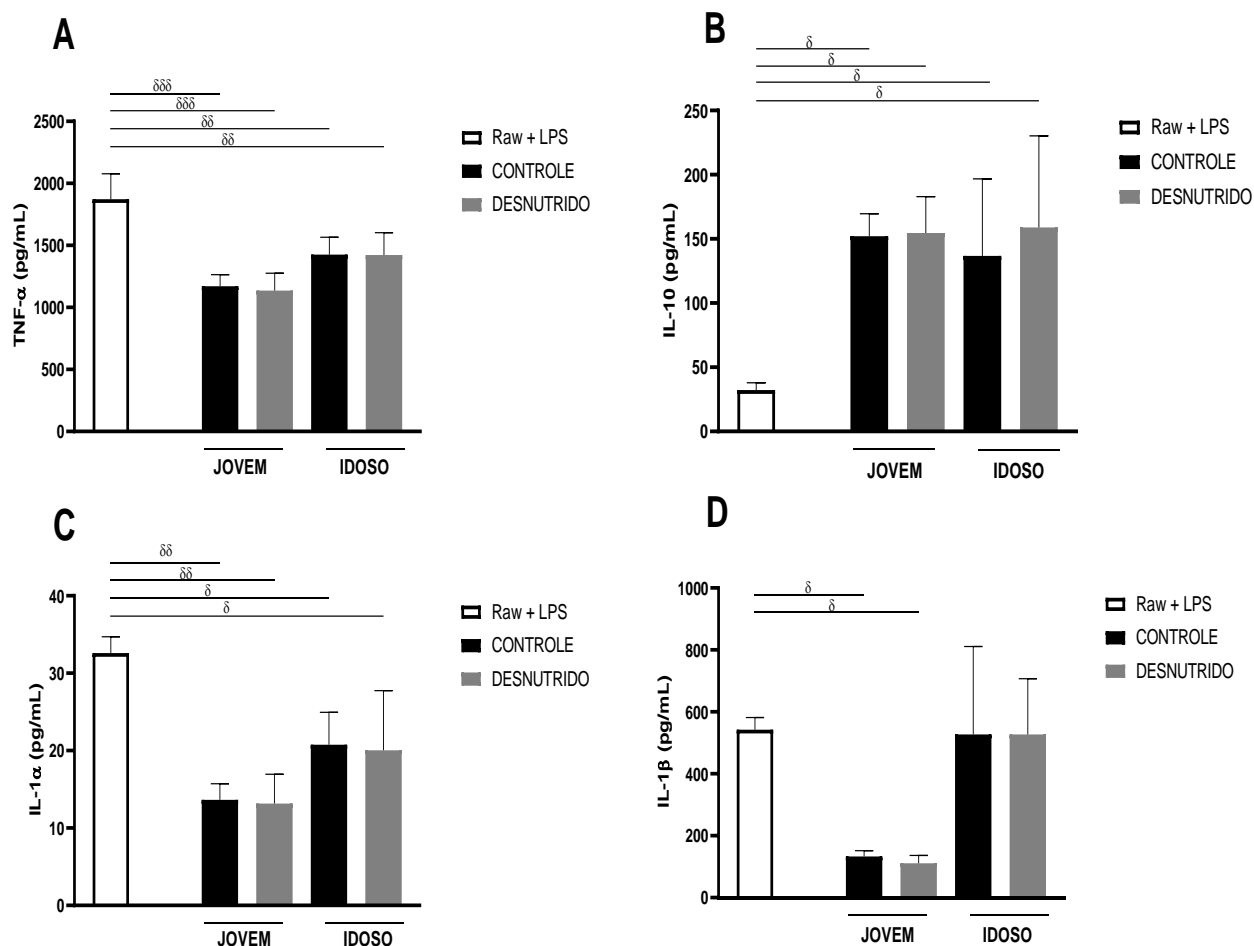


Gráfico 8: Resultados representam a concentração de citocinas produzidas por RAW no meio condicionado de CTMs dos grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso; n=3 (número de animais). (A) TNF α , (B) IL-10, (C) IL-1 α e (D) IL-1 β . Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (δ $p \leq 0,05$), ($\delta\delta$ $p \leq 0,01$), ($\delta\delta\delta$ $p \leq 0,001$).

4.10. AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO MEIO CONDICIONADO DE CTM SOBRE A PROLIFERAÇÃO LINFÓCITOS ESPLÊNICOS E PRODUÇÃO DE CITOCINA.

Com objetivo de investigar se as CTMs têm a capacidade de imunomodular os linfócitos, foram cultivados linfócitos esplênicos, retirados de camundongos C57BL/6 jovens e saudáveis, no meio condicionado de CTMs e estimulados com LPS por 72 horas. Depois desse

período, foi analisada a proliferação dos linfócitos por MTT, assim como a produção das citocinas IL-2, IL-4, IL-10, IL-17 e IFN- γ . Segundo a análise dos resultados, os linfócitos+LPS cultivados com meio condicionado de CTMs dos quatro grupos reduziram a proliferação linfocitária (**Gráfico 9**). Quanto à produção de citocina, os linfócitos+LPS cultivados com meio condicionado de CTMs dos animais jovens reduziram a concentração de IL-2 e aumentaram a concentração de IL-10, e o IFN- γ aumentou nos linfócitos+LPS cultivados com meio condicionado de CTMs dos grupos desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso, sendo que todos foram comparados aos linfócitos+LPS (**Gráfico 10.A, 10.B e 10.C**). Houve aumento de IFN- γ e redução de IL-10 nos linfócitos+LPS cultivados com meio condicionado de CTMs dos grupos desnutrido jovem e dos idosos quando comparados aos linfócitos+LPS cultivados com meio condicionado de CTMs do grupo controle jovem (**Gráfico 10.B e 10.C**).

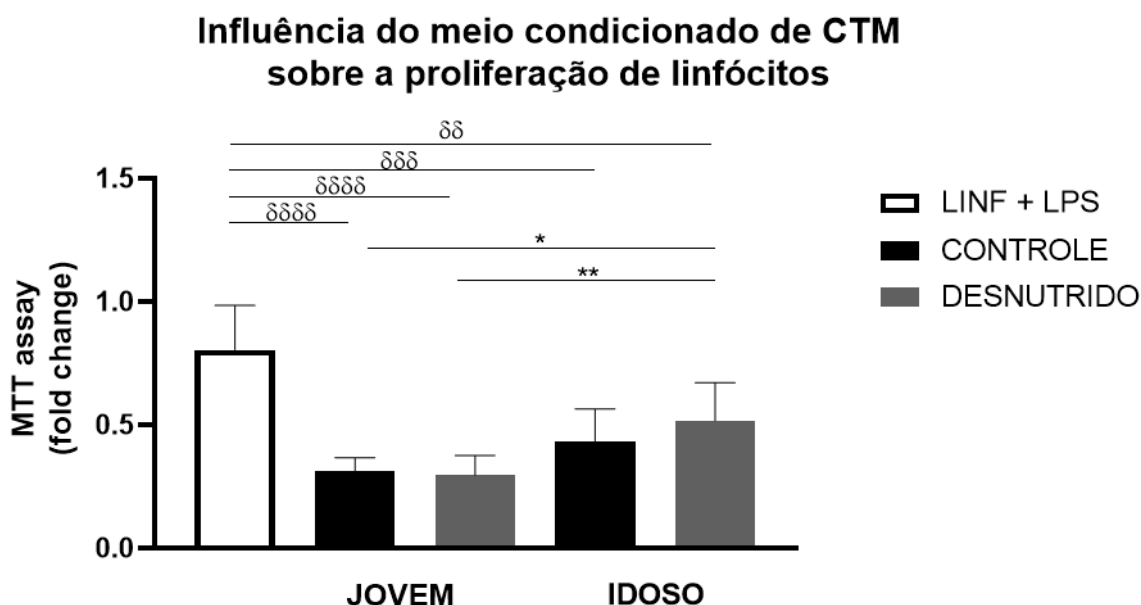


Gráfico 9: Resultados representam a absorbância da influência do meio condicionado de CTM sobre a proliferação de Linfócitos esplênicos, entre os grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso; n=5 (número de animais). Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (δ p \leq 0,05), ($\delta\delta$ p \leq 0,01), ($\delta\delta\delta$ p \leq 0,001), ($\delta\delta\delta\delta$ p \leq 0,0001), (* p \leq 0,05), (** p \leq 0,01).

Influência do meio condicionado de CTM sobre a produção de citocina por linfócitos

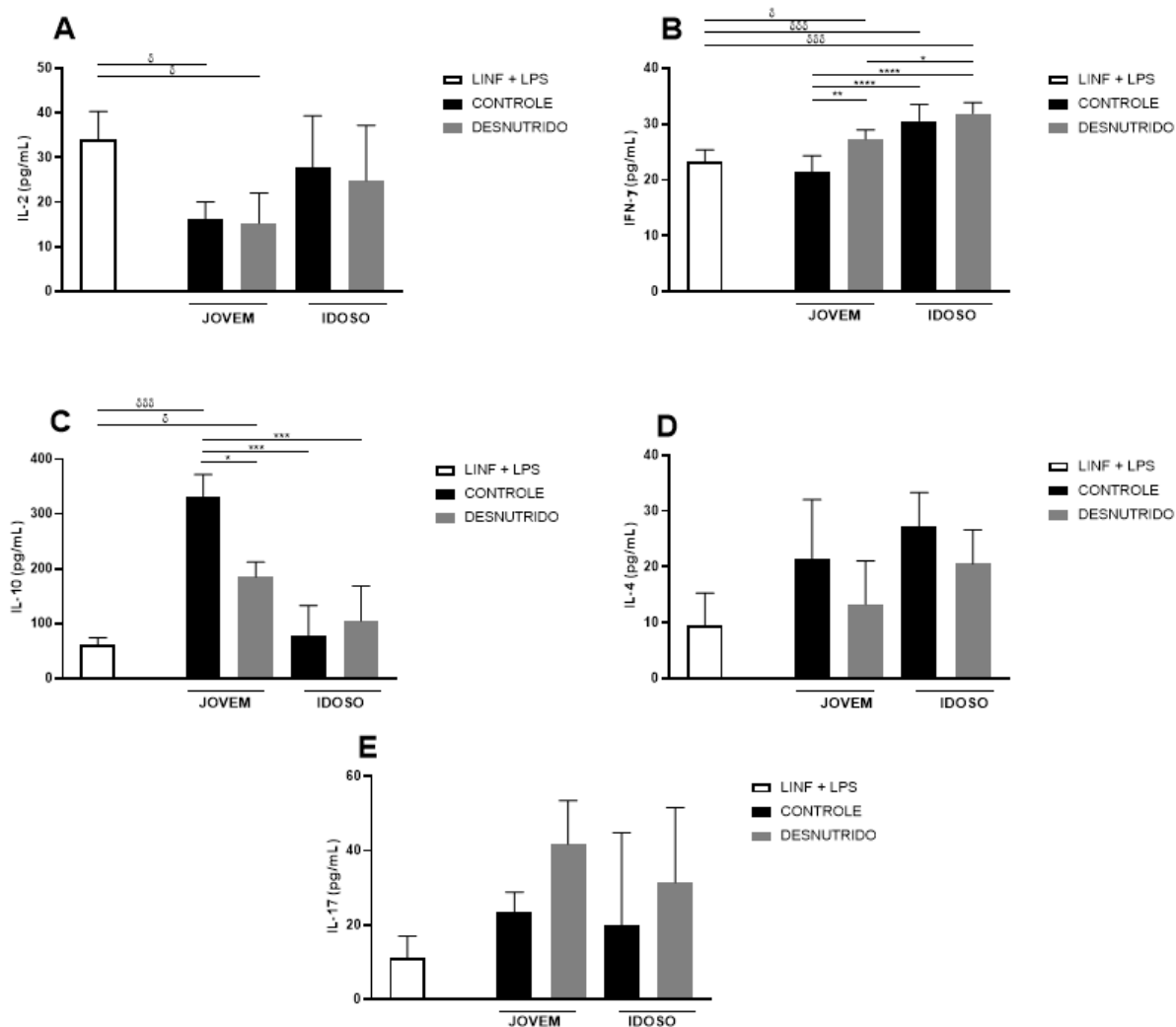


Gráfico 10: Resultados representam a concentração de citocinas produzidas por linfócitos esplênicos no meio condicionado de CTMs dos grupos controle jovem, desnutrido jovem, controle idoso e desnutrido idoso; n=6 (número de animais). (A) IL-2, (B) IFN- γ , (C) IL-10, (D) IL-4 e (E) IL-17. Resultados expressos em média \pm desvio padrão da média (DPM). Diferença significativa entre os grupos (δ $p \leq 0,05$), ($\delta\delta$ $p \leq 0,01$), ($\delta\delta\delta$ $p \leq 0,001$), ($*p \leq 0,05$), ($** p \leq 0,01$), ($*** p \leq 0,001$), ($**** p \leq 0,0001$).

5. DISCUSSÃO

O risco de desnutrição aumenta com o passar da idade e, apesar dos avanços alcançados no campo da medicina, os casos relativos à mesma ainda são recorrentes, sendo a desnutrição considerada um problema de saúde pública significativo e altamente prevalente no mundo (GUYONNET & ROLLAND, 2015). Assim, a fim de compreender o processo de envelhecimento associado à desnutrição, foi induzido um modelo de desnutrição proteica em camundongos C57bl/6 devido à sua característica isogênica. Foram utilizados animais machos para não haver alterações hormonais provocadas pelo ciclo estral das fêmeas, o que poderia causar interferência no perfil hematológico (AJAYI & AKHIGBE, 2020). Tendo em vista que a hematopoese apresenta importantes mudanças em relação à idade, tanto em animais quanto em humanos (GROARKE & YOUNG, 2019), este trabalho utilizou animais controles e desnutridos, que foram separados, aleatoriamente, em jovens (3 a 6 meses de idade) e idosos (18 a 19 meses de idade) (DUTTA & SENGUPTA, 2016).

Os camundongos passaram por um período de adaptação de 7 dias, fundamental para a ambientação dos animais. Após essa etapa, foi realizada a indução à desnutrição pelo período de 28 dias, seguindo os trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo (DE OLIVEIRA *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2016). Em seu estudo, Quinn atestou que 28 dias de vida de um animal equivalem a dois anos do período de vida do homem (QUINN, 2005). Diante disso, observa-se que a indução da desnutrição proteica de quatro semanas é equivalente a dois anos de alterações na dieta humana, sendo este modelo considerado crônico e grave.

Ao final do período de indução à desnutrição, foi analisado o consumo de ração e o resultado foi similar nos quatro grupos, não havendo comprometimento de micronutrientes para os animais desnutridos. A desnutrição proteica é caracterizada pela perda de peso maior que 10% do peso corporal normal, pela perda de massa muscular e pelo desenvolvimento de feridas crônicas e infecções; sendo a perda de proteína corporal a principal responsável pelas complicações e morbidades (NAKAJIMA *et al.*, 2014; COLLINS, 2003). Diante disso, segundo os resultados obtidos neste trabalho, pode-se afirmar que os animais submetidos a uma dieta hipoproteica sofreram redução de peso ocasionada pelo baixo consumo de proteína, haja vista que o grupo desnutrido jovem perdeu em torno de 20% de peso e o grupo desnutrido idoso perdeu cerca de 16% de peso, quando comparados com o primeiro dia de dieta.

Os animais desnutridos, tanto jovens como idosos, apresentaram menores concentrações séricas de proteínas totais, albumina, ureia e colesterol. Esses biomarcadores analisados são considerados indicadores bioquímicos fundamentais para o diagnóstico da desnutrição proteica. Tal aspecto é visualizado, de fato, na clínica, pois o estudo realizado por Zhang e colaboradores evidenciou que indivíduos com alto risco de desnutrição apresentaram valores significativamente menores de proteínas totais, albumina, ureia e colesterol do que aqueles considerados sem risco de desnutrição (ZHANG *et al.*, 2017).

O envelhecimento é um dos fatores que ocasiona o declínio de albumina, tendo o estudo de OMRAN e MORLEY mostrado que a albumina, nos idosos, é menor quando comparada aos jovens (OMRAN & MORLEY, 2000). Os resultados deste trabalho evidenciaram, de fato, a redução de albumina no grupo idoso. Vale ressaltar que a albumina é a principal e mais abundante proteína sérica, de modo que a sua baixa produção é responsável pela hipoalbuminemia, vista em dietas com baixo teor proteico (LEVITT & LEVITT, 2016). Quanto a ureia, segundo o estudo realizado por Batool e colaboradores, os pacientes com desnutrição proteica apresentaram baixas concentrações de aminoácidos do ciclo da ureia e alanina (BATOOL *et al.*, 2015). Essa relação entre os aminoácidos do ciclo da ureia e a síntese de albumina explicam a redução desses biomarcadores tanto no envelhecimento quanto na desnutrição.

Segundo o estudo realizado por Zang e colaboradores, não há evidências na literatura que indiquem que a creatinina e o triglicerídeo sejam considerados biomarcadores da desnutrição (ZHANG *et al.*, 2017). Porém, neste trabalho, avaliamos esses dois parâmetros bioquímicos e os resultados mostraram que, no que tange à creatinina, não houve alteração na desnutrição e tampouco no envelhecimento, enquanto em relação ao triglicerídeo houve redução tanto na desnutrição quanto no envelhecimento. Apesar de não haver evidências que incluam o triglicerídeo como indicador de desnutrição, o fato é que a desnutrição proteica está frequentemente relacionada à homeostase e à desregulação do metabolismo energético. O estudo realizado por Bergmans e colaboradores mostrou que houve redução de triglicerídeos em animais submetidos à desnutrição proteica (BERGMANS *et al.*, 2020).

Com o objetivo de analisar as funções metabólicas realizadas pelos órgãos, tecidos e, primordialmente, pela função hepática, foi realizada a quantificação das enzimas ALT e AST. Na desnutrição, os níveis de AST são maiores do que os ALT, podendo tal fator ser consequência de uma degradação tecidual, conforme indica Batool e colaboradores (BATOOL

et al., 2019). De fato, neste trabalho, foram observadas alterações causadas por esses marcadores na desnutrição proteica.

Quanto à análise do hemograma, o eritrograma (hemácias, hemoglobina e hematócrito) e o leucograma (leucócitos, neutrófilos, linfócitos e monócitos) foram reduzidos na desnutrição proteica tanto dos animais jovens quanto dos animais idosos, de maneira que ambos apresentaram anemia e leucopenia. Vale ressaltar que tanto na desnutrição quanto no envelhecimento ocorrem alterações no sistema hematopoético, ocasionando anemia e prejuízo no sistema imunológico (HASTREITER *et al.*, 2020; HOFFAMAN *et al.*, 2019; DOS SANTOS *et al.*, 2016). Além disso, de acordo com os trabalhos escritos anteriormente pelo nosso grupo (FOCK *et al.*, 2007; FOCK *et al.*, 2010; FOCK *et al.*, 2010), a leucopenia pode ser responsável, em parte, pelo comprometimento da imunidade inata e adquirida.

Outro importante fator analisado neste trabalho se refere à hipoplasia medular, ocorrendo tanto na desnutrição quanto no envelhecimento. A desnutrição proteica ocasionou a hipoplasia da medula óssea, o que pode estar relacionado à menor produção de substrato, comprometendo a síntese proteica fundamental para que haja uma adequada proliferação celular. Outro fator importante relacionado a tal aspecto consistiria na alteração no microambiente medular responsável pela regulação das células tronco hematopoéticas, ocasionada pela modificação das proteínas que constituem o compartimento medular estromal (DOS SANTOS *et al.*, 2016; BORELLI *et al.*, 1995; XAVIER *et al.*, 2007).

O intuito deste trabalho foi avaliar a modulação das CTMs de animais envelhecidos numa situação de desnutrição proteica. Assim, como o microambiente medular apresenta uma diversidade de células, foi necessário caracterizar as CTMs por meio de parâmetros morfológicos e fenotípicos. Vale ressaltar que a caracterização dessas células é complexa e a expressão dos marcadores pode variar conforme a espécie (humano, camundongo) ou até mesmo entre as diferentes linhagens de camundongos (ANJOS-AFONSO e BONNET, 2011; BOXALL e JONES, 2012).

Além disso, por fazerem parte de um microambiente hematopoético, podendo ser modificado pela desnutrição, foi pesquisado se o envelhecimento e a desnutrição proteica causariam algum efeito sobre a morfologia das CTMs. Quando analisadas no microscópio de inversão, as CTMs dos quatro grupos estudados apresentaram morfologia fusiforme fibroblastóide, característica comum a essas células (ABDALLAH e KASSEM, 2008), porém não foram observadas diferenças morfológicas causadas pelo envelhecimento e pela

desnutrição nas mesmas. Cabe destacar, ainda, que as CTMs têm como característica a formação de colônias fibroblastóides (GOTHARD *et al.*, 2013), de modo que, tanto em controles e desnutridos quanto em jovens e idosos, tais colônias foram formadas, como era esperado.

A caracterização das CTMs foi realizada também por meio da imunofenotipagem. Segundo os resultados obtidos, as CTMs dos grupos estudados apresentaram marcações negativas para CD45, CD14 e CD34, e positivas para CD90, CD73, CD105 e CD271. Os marcadores usados foram baseados na escolha de um painel que marcassem essas células positivamente e que excluíssem outros tipos celulares. Então, a marcação negativa para CD45, CD14 e CD34 indica que as células estudadas não pertencem às linhagens leucocitárias, monocítica e tronco hematopoética, respectivamente. A marcação positiva para CD90, CD271, CD73 e CD105 caracterizam as CTMs (LIU *et al.*, 2009).

Cabe ressaltar que os animais desnutridos jovens e idosos apresentaram menor expressão de CD73, nucleotidase que converte AMP em adenosina (TORTAJADA *et al.*, 2017), quando comparados ao grupo controle jovem. A literatura mostra que o CD73 é expresso por diversas células durante lesões, infecções e durante condições de estado estacionário (ALAM *et al.*, 2015). Quando ocorre lesão tecidual, a produção de adenosina aumenta devido à liberação de ATP das células e, uma vez produzida, atua como moléculas sinalizadoras ligando-se aos receptores transmembrana purinérgicos localizados nas superfícies das células alvo (ALAM *et al.*, 2015; DE OLIVEIRA BRAVO *et al.*, 2016). Dessa forma, a sinalização da adenosina é vista como um estímulo anti-inflamatório, geralmente se opondo aos efeitos induzidos pelo ATP (DE OLIVEIRA BRAVO *et al.*, 2016). Diante disso, a redução do CD73 na desnutrição pode ser causada pela não liberação de ATP pelas CTMs, impedindo a sinalização da adenosina que controlaria o ambiente inflamatório. Para confirmar essa hipótese, seria crucial a análise do ATP.

Adicionalmente, vale destacar a senescência observada nas CTMS de animais idosos de ambos os grupos. A senescência é um processo característico do envelhecimento, pois as células senescentes se acumulam com a idade (MATJUSAITIS *et al.*, 2016). Existem vários métodos para a avaliação a senescência, no entanto, a abordagem mais comum é realizada por meio do método de detecção enzimática para β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) (CHILDS *et al.*, 2019).

Segundo a literatura, por meio do uso de biomarcadores de senescência é possível realizar a observação das células senescentes acumuladas nos tecidos com a idade, tornando a

senescência um modelo excelente para estudos *in vitro* de envelhecimento (Debacq-Chainiaux *et al.*, 2016; Wadhwa *et al.*, 2016). Outro ponto importante destacado nos estudos é a associação de células senescentes à doenças relacionadas à idade, como diabetes, aterosclerose, doenças pulmonares, etc. (MuñozEspín e Serrano, 2014; McHugh e Gil, 2018; Chi *et al.*, 2019; Chandrasekaran *et al.*, 2017). Os resultados deste trabalho corroboram com os achados na literatura, pois foi evidenciado um aumento das células em senescência no envelhecimento, visto que houve maior expressão da enzima β -galactosidase nas células dos animais idosos, enquanto nas células dos animais jovens tal expressão foi menor.

As CTMs possuem um importante papel no sistema imune, mas o mecanismo detalhado das propriedades imunomodulárias das CTMs ainda não está bem elucidado (LIU *et al.*, 2020). Contudo, a literatura já demonstra que os fatores tróficos provenientes das CTMs desempenham um papel essencial na modulação da resposta imunológica (DOS SANTOS *et al.*, 2016). Diversos estudos relataram a liberação de fatores solúveis, como citocinas, e fatores de crescimento pelas CTMs, que seria um mecanismo que modula a resposta imune (LIU *et al.*, 2020). Para mimetizar um sistema imunológico em condição de estresse, as CTMs de ambos os grupos foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), um dos principais componentes da parede celular de bactérias gram-negativas e amplamente utilizadas no estudo de respostas inflamatórias/imunes (RIETSCHEL *et al.*, 1994). Este trabalho avaliou a influência do envelhecimento e da desnutrição proteica sobre o perfil de produção de citocinas por CTMs. Logo, foi analisada a produção das seguintes citocinas: IL-1 β , IL6, IL-10, TGF- β e PGE₂.

As propriedades imunomodulatórias das CTMs são induzidas por citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-1 β , produzidas durante uma resposta imune (YU *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2016). A associação dessas citocinas promove a produção de diversos fatores solúveis indutíveis, tais como fator de crescimento transformador- β 1 (TGF- β 1), prostaglandina E2 (PGE2), óxido nítrico (NO) e indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO), que, por sua vez, induzem as funções imunossupressoras das MSCs (YU *et al.*, 2014). O nosso grupo demonstrou no trabalho de Dos Santos e colaboradores o efeito da desnutrição na imunomodulação das CTMs, sendo visto que as CTMs do grupo desnutrido reduzem a produção IL-1 β e TGF- β , enquanto ocorre um aumento de IL-6 (DOS SANTOS *et al.*, 2016). Diante do exposto, nossos resultados corroboram os resultados presentes na literatura (DOS SANTOS *et al.*, 2016), mostrando que a desnutrição reduz a produção de IL-1 β e TGF- β nos animais jovens – havendo a redução do último também no grupo desnutrido idoso – e aumenta a produção de

IL-6. Foi observado que a desnutrição levou a uma menor produção de PGE₂ pelas CTMs. No envelhecimento, também foi observado que as CTMs conseguem modular o sistema imune, pois houve aumento de IL-1 β e IL-6.

Para avaliar a atividade imunomodulatória das CTMs, foi realizado o estímulo dessas células com LPS, coletados os sobrenadantes e realizado o cultivo de macrófagos e linfócitos nesse meio condicionado. Como resultado, foi visto que o meio condicionado dos quatro grupos estudados reduziu a proliferação tanto de macrófagos quanto de linfócitos quando comparado, respectivamente, aos macrófagos e linfócitos somente estimulados com LPS. Além disso, os resultados evidenciaram que o meio condicionado de CTMs do grupo desnutrido idosos teve maior proliferação de linfócitos quando comparado aos grupos controle e desnutrido jovem. No trabalho de Dos Santos e colaboradores foi demonstrado que houve redução na proliferação das células do sistema imune quando cultivadas com sobrenadante de CTM, outros trabalhos mostraram também essa redução na proliferação de linfócitos e macrófagos quando cultivados com sobrenadante de CTMs (DOS SANTOS *et al.*, 2016, LARANJEIRA *et al.*, 2015, CLUTTERBUCK *et al.*, 2000).

Além de analisar os efeitos causados pelos meios condicionados de CTMs sobre a proliferação de macrófagos e linfócitos, foi avaliada também a produção de citocinas IL-10, IL-1 α , IL-1 β e TNF α por macrófagos e IL-10, IL-2, IL-4, IL-17 e INF quando estimulados com LPS e cultivados com sobrenadante de CTMs.

O efeito das CTMs no sistema imune inato têm sido alvo de diversos estudos. A literatura aponta vários estudos que demonstram a capacidade das MSC de modular macrófagos M1 inflamatórios e promover macrófagos M2 anti-inflamatórios (LUZ-CRAWFORD *et al.*, 2016; BRAZA *et al.*, 2016; KIM *et al.*, 2009). O estudo realizado por Mathias e colaboradores, por exemplo, mostrou o efeito do tratamento com CTM nos pulmões de pacientes asmáticos, obtendo-se como resultado o aumento da produção de mediadores anti-inflamatórios e redução de citocina pró-inflamatória por macrófagos alveolares (MATHIAS *et al.*, 2013). Neste trabalho, os resultados mostraram que os macrófagos estimulados com LPS e cultivados no sobrenadante de CTMs dos quatro grupos estudados foram capazes de reduzir os mediadores pro-inflamatórios, IL-1 α , IL-1 β e TNF α , e aumentar o mediador anti-inflamatório, IL-10, corroborando os estudos de Mathias e colaboradores (MATHIAS *et al.*, 2013). Isso demonstra como as CTMs participam ativamente da modulação do sistema imune.

Estudos mostram que as CTMs, quando estimuladas com IFN- γ , citocina pró-inflamatória, causam a inibição na proliferação células T ativadas, além de inibir as citocinas TH1, como a IL-2 (CHINNADURA *et al.*, 2014). Este trabalho demonstrou resultados similares ao estudo de Chinnadura e colaboradores, pois os linfócitos estimulados com LPS e cultivados com sobrenadante CTMs dos quatro grupos estudados tiveram a proliferação reduzida quando comparados aos linfócitos+LPS, havendo redução na produção de IL-2 nos linfócitos estimulados com LPS e cultivados com sobrenadante de CTMs do grupo jovem quando comparados aos linfócitos+LPS. Em contrapartida, houve maior produção de IFN- γ nos linfócitos estimulados com LPS e cultivados com sobrenadante de CTMs do grupo idoso e do grupo desnutrido jovem em relação aos linfócitos+LPS. Isso mostra que o sobrenadante de CTMs dos grupos estudados tem efeito imunomodulatório.

Sabendo que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de suprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (KYURKCHIEV *et al.*, 2014), como a IL-2, IFN- γ , IL-4 e IL-17, neste trabalho foi observado o aumento da mesma e a redução de IL-2 nos linfócitos estimulados com LPS e cultivados com sobrenadante de CTMs do grupo jovem quando comparada com os linfócitos+LPS, mas o IFN- γ continuou aumentado nos linfócitos estimulados com LPS e cultivados com sobrenadante de CTMs do grupo jovem desnutrido e idoso em relação aos os linfócitos+LPS. Não houve diferença estatística na produção de IL-4 e IL-17.

Quanto à produção de citocinas nos linfócitos cultivados com sobrenadante de CTMs e estimulado com LPS entre os quatro grupos estudados, foi observado que a concentração de IFN- γ foi maior tanto no grupo desnutrido jovem quanto nos idosos quando comparados ao grupo controle jovem. Já a concentração de IL-10 foi menor nos grupos desnutrido jovem e nos grupos dos idosos quando comparados ao grupo controle jovem. Nota-se, assim, que a desnutrição e o envelhecimento modularam a resposta imune nessas citocinas, pois houve aumento de IFN- γ e redução de IL-10 tanto no grupo desnutrido quanto no grupo idoso. Resultados similares a esses foram vistos no trabalho de Dos Santos e colaboradores, pois nesse estudo houve aumento de IFN- γ e redução de IL-10 na desnutrição (DOS SANTOS *et al.*, 2016). Por sua vez, no estudo realizado por Laranjeira e colaboradores foi demonstrado que as CTMs de humanos saudáveis são capazes de inibir o IFN- γ produzidos pelos linfócitos, diferente dos achados de nosso trabalho, no qual se evidenciou que o envelhecimento e a

desnutrição aumentaram a produção dessa citocina por linfócitos+LPS cultivados com sobrenadante de CTMs (LARANJEIRA *et al.*, 2015).

A fim de avaliar se as expressões dos genes de interesse alterariam a imunomodulação das CTMs no período transcricional, foi realizada a análise dos seguintes genes: IL-1 β , IL-6, IL-10, NOS, NF κ B, STAT-1 e STAT-3. Os genes IL-1 β , IL-6, IL-10 e STAT-1 não apresentaram alterações em sua expressão. Entretanto, em CTMs de animais do grupo idoso, foi observado aumento na expressão de NF κ B e NOS e redução na expressão de STAT-3.

A literatura indica que esse aumento do NF κ B é frequentemente detectado em células imunes e não imunes em tecidos afetados por inflamação crônica, pois acredita-se que as funções estão prejudicadas pela indução da expressão de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β e IL-6, que orquestram e sustentam a resposta inflamatória e causam danos teciduais (WULLAERT *et al.*, 2011). De fato, este trabalho mostra que as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e IL-6 estão mais elevadas no grupo idoso do que no controle jovem. Assim, o aumento de NF κ B é considerado um importante fator patogênico em diversos distúrbios inflamatórios agudos e crônicos (WULLAERT *et al.*, 2011). A NOS é uma enzima responsável pela síntese de NO que causa estresse oxidativo, neste trabalho foi observado o aumento de NOS nas CTMs do grupo idoso, o que pode estar relacionado ao estresse ocasionado pela inflamação (LIND *et al.*, 2017).

Por fim, neste trabalho foi observada a redução da expressão de STAT3 – consistente em um fator de transcrição de genes de fase aguda que medeia sinais extracelulares, como citocinas e fatores de crescimento, por meio da interação com receptores polipeptídicos na superfície celular, sendo ativado por IL6 (YOU *et al.*, 2015) –, mesmo havendo aumento de IL-6 nas CTMs do grupo idoso.

6. CONCLUSÃO

O envelhecimento e a desnutrição proteica comprometeram a hematopoese. Com isso, as CTMs alteraram a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias, e produziram fatores solúveis que diminuíram a proliferação dos macrófagos e dos linfócitos, sendo capazes de imunomodular as citocinas produzidas por essas células do sistema imune. O grupo idoso apresentou maior número de CTMs senescentes e alteraram a expressão de genes inflamatórios. Portanto, o envelhecimento e a desnutrição são fatores que, separados ou em conjunto, influenciaram no efeito imunomodulador das CTMs.

REFERÊNCIAS

AJAVI, A. F., AKHIGBE, R. E. **Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update.** Fertility Research and Practice. 2020 Mar 14; 6:5. doi: 10.1186/s40738-020-00074-3. PMID: 32190339; PMCID: PMC7071652.

ABDALLA, B. M.; KASSEM, M. **Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications.** Gene Therapy, v.15, n.2, p.109-16, Jan 2000. doi: 10.1038/sj.gt.3303067

ANJOS, R. A.; SILVA, A. M.; BORELLI, P. **Matriz extracelular e Leucemia.** Revista Brasileira De Hematologia e Hemoterapia, São José do Rio Preto, v.22 p.404-12, 2000.

ANJOS-AFONSO, F.; BONNET, D. Prospective identification and isolation of murine bone marrow derived multipotent mesenchymal progenitor cells. Best Pract Ver Clin Haematol, v.24, n.1, p.13-24, Mar 2011. ARAI, F; SUDA, T. **Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells i the osteoblastic niche.** Ann N Y Acad Sci, v 1106, p.41-53, Jun 2007

ASRI, A.; SABOUR, J.; ATASHI, A.; SOLEIMANI, M. **Homing in hematopoietic stem cells: focus on regulatory role of CXCR7 on SDF1a/CXCR4 axis.** EXCLI J. 2016 Feb 15; 15:134-43. doi: 10.17179/excli2014-585. PMID: 27092040; PMCID: PMC4827072.

ALAM, M. S.; COSTALES, M. G.; CAVANAUGH, C.; WILLIAMS, K. **Extracellular adenosine generation in the regulation of pro-inflammatory responses and pathogen colonization.** *Biomolecules.* 2015;5(2):775-792. Published 2015 May 5. doi:10.3390/biom5020775

BURTON, D. G. A.; STOLZING, A. **Cellular senescence: Immunosurveillance and future immunotherapy.** Ageing Research Reviews. 2018 May; 43:17-25. doi: 10.1016/j.arr.2018.02.001. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29427795.

BAIGUERA, S.; JUNGEBLUTH, P.; MAZZANTI, B.; MACCHIARINI, P. **Mesenchymal stromal cells for tissue-engineered tissue and organ replacements.** Transpl Int, v. 25, n. 4, p. 369-82, Apr 2012. doi: 10.1111/j.1432-2277.2011.01426. x. ISSN 0934- 0874

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. **Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.** Int J Biochem Cell Biol, v. 36, n. 4, p. 568-84, Apr 2004. ISSN 1357-2725

(Print) 1357-2725 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15010324> >

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

BORELLI, P.; SOUZA, I.P.; BOROJEVIC, R.; DAGLI, M.L.Z.; KANG, H.C. **Protein malnutrition**: some aspects of the in vitro adhesion of peritoneal mouse macrophages. *Ann. Nutr. Metab.*, Basel, v.42, p.367- 373, 1998. doi: 10.1159/000012757. PMID: 9895425.

BORELLI, P.; BARROS, F.E; NAKAJIMA, K; BLATT, S.L.; BEUTLER, B.; PEREIRA, J.; TSUJITA, M.; FAVERO, G.M.; FOCK, R.A. **Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates**. *Braz J Med Biol Res*, v.42, n.6, p. 523-30, Jun 2009. doi: 10.1590/s0100-879x2009000600008. PMID: 19448901.

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

BOXALL, S. A.; JONES, E. **Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells**. *Stem Cells Int*, v.2012, p. 975871, 2012. doi: 10.1155/2012/975871. Epub 2012 May 14. PMID: 22666272; PMCID: PMC3361338.

BARBON, Fabiola Jardim; WIETHÖLTER, Paula; FLORES, Ricardo Antunes. **Alterações celulares no envelhecimento humano**. *Journal of Oral Investigations*, Passo Fundo, v. 5, n. 1, p. 61-65, out. 2016. ISSN 2238-510X. doi: <https://doi.org/10.18256/2238-510X/j.oralinvestigations.v5n1p61-65>

BATOOL, R.; BUTT, M. S.; SULTAN, M. T.; SAEED, F. & NAZ, R. **Protein–Energy Malnutrition**: A Risk Factor for Various Ailments. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015; 55:2, 242-253. doi: 10.1080/10408398.2011.651543. PMID: 24915388.

BERGMANS, R. S.; NIKODEMOVA, M.; STULL, V. J.; RAPP, A.; MALEEKI, K. M. C. **Comparison of cricket diet with peanut-based and milk-based diets in the recovery from**

protein malnutrition in mice and the impact on growth, metabolism and immune function. *PLoS One*. 2020;15(6): e0234559. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234559>

BRAZA, F.; DIROU, S.; FOREST, V.; SAUZEAU, V.; HASSOUN, D. **Mesenchymal stem cells induce suppressive macrophages through phagocytosis in a mouse model of asthma.** *Stem Cells* 2016; 34:1836–45. doi: 10.1002/stem.2344. Epub 2016 Mar 14. PMID: 26891455.

CHATUVERDI, P.; GILKES, D. M.; TAKANO, N.; SEMENZA, G. L. (2014) **Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triple-negative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment.** *P Natl Acad Sci USA* 111(20):E2120–E2129. doi:10.1073/pnas.1406655111 133.

CAETANO, L. M. **o Idoso e a Atividade Física.** Horizonte: Revista de Educação www.interscienceplace.org - Páginas 130 de 194 Física e desporto, V.11, n. 124, p.20-28, 2006.

COLLINS, N. **Protein-energy malnutrition and involuntary weight loss: nutritional and pharmacological strategies to enhance wound healing.** *Expert Opin Pharmacother*. 2003;4(7):1121-1140. doi: 10.1517/14656566.4.7.1121. PMID: 12831338.

CHI, C.; Li, D. J.; JIANG, Y. J.; TONG, J.; Fu. H.; Wu, Y. H., SHEN, F. M. **Vascular smooth muscle cell senescence and age-related diseases: State of the art.** *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2019 Jul 1;1865(7):1810-1821. doi: 10.1016/j.bbadis.2018.08.015. Epub 2018 Aug 16. PMID: 31109451.

CHILDS, B. G.; BUSSIAN, T. J.; BAKER, D. J. **Cellular Identification and Quantification of Senescence-Associated β -Galactosidase Activity In Vivo.** *Methods Mol Biol*. 2019; 1896:31-38. doi:10.1007/978-1-4939-8931-7_4

CHANDRASEKARAN, A.; IDELCHIK, M. D. P. S.; MELENDEZ, J. A. **Redox control of senescence and age-related disease.** *Redox Biol*. 2017 Apr; 11:91-102. doi: 10.1016/j.redox.2016.11.005. Epub 2016 Nov 16. PMID: 27889642; PMCID: PMC5126126.

CLUTTERBUCK, R.; POWLES, R.; MILLAR, J.; CATOVSKY, D. **Interleukin-6 and other gp130-dependent cytokines selectively inhibit proliferation of macrophage-lineage hemopoietic progenitor cells.** *Exp Hematol*. 2000 Oct;28(10):1120-8. doi: 10.1016/s0301-472x(00)00512-9. PMID: 11027830.

CHINNADURAI, R.; COPLAND, I. B.; PATEL, S. R.; GALIPEAU, J. **IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- γ -licensed human mesenchymal stromal cells.** *J Immunol.* 2014 Feb 15;192(4):1491-501. doi: 10.4049/jimmunol.1301828. Epub 2014 Jan 8. PMID: 24403533.

DOS SANTOS, G. G.; BATOOL, S.; HASTREITER, A.; SARTORI, T.; NOGUEIRA-PEDRO, A.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. **The influence of protein malnutrition on biological and immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells.** *Clin Nutr.* 2017 Aug;36(4):1149-1157. doi: 10.1016/j.clnu.2016.08.005.

DEBACQ-CHAINIAUX, F.; BEN AMEUR, R.; BAUWENS, E.; DUMORTIER, E.; TOUTFAIRE, M.; TOUSSAINT, O. (2016) **Stress-Induced (Premature) Senescence.** In: Rattan S., Hayflick L. (eds) *Cellular Ageing and Replicative Senescence. Healthy Ageing and Longevity.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26239-0_13

DE OLIVEIRA BRAVO, M.; CARVALHO, J. L.; SALDANHA-ARAÚJO, F. **Adenosine production: a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression.** *Purinergic Signal.* 2016 Dec;12(4):595-609. doi: 10.1007/s11302-016-9529-0. Epub 2016 Aug 25. PMID: 27557887; PMCID: PMC51240

DAZZI, F.; LOPES, L.; WENG, L. **Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'?** *Immunology*, v. 137, n. 3, p. 206-13, Nov 2012. doi: 10.1111/j.1365-2567.2012.03621.x. PMID: 22804624; PMCID: PMC3482678.

DA SILVA MEIRELES, L.; CAPLAN, A.I.; NARDI, N.B. **In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells.** *Stem Cells*, v. 26, n.9, p. 2287-99, Set 2008. doi: 10.1634/stemcells.2007-1122. Epub 2008 Jun 19. PMID: 18566331.

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

DEXTER, T.M. **Growth and differentiation in the haemopoietic system.** *Biochem Soc Trans*, v.19, n.2, p. 303- 6, Apr 1991

DUTTA, S.; SENGUPTA, P. **Men and mice: Relating their ages.** Life Sci. 2016 May 1; 152:244-8. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.025. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.025. Epub 2015 Oct 24. PMID: 26596563.

DUFFY, M. M.; PINDJAKOVA, J.; HANLEY, S. A.; MCCARTHY, C.; WEIDHOFER, G. A.; SWEENEY, E. M.; ENGLISH, K.; SHAW, G.; MURPHY, J. M.; BARRY, F. P.; MAHON, B. P.; BELTON, O.; CEREDIG, R.; GRIFFIN, M. D. **Mesenchymal stem cellinhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor.** Eur J Immunol, v. 41, n. 10, p. 2840-51, Oct, 2011. ISSN 0014-2980. doi: 10.1002/eji.201141499. Epub 2011 Aug 30. PMID: 21710489.

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

DE OLIVEIRA, D. C; HASTREITER, A. A.; MELLO, A. S.; DE OLIVEIRA BELTRAN, J. S.; OLIVEIRA SANTOS, E. W.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. **The effects of protein malnutrition on the TNF-RI and NF-κB expression via the TNF-α signaling pathway.** Cytokine. 2014 Oct;69(2):218-25. doi: 10.1016/j.cyto.2014.06.004. Epub 2014 Jul 6. PMID: 25005154.

DE PINHO, N. B.; MARTUCCI, R. B.; RODRIGUES, V. D.; D'ALMEIDA, C. A.; THULER, L. C. S.; SAUNDERS, C.; JAGER-WITTENAAR, H.; PERES, W. A. F. **High prevalence of malnutrition and nutrition impact symptoms in older patients with cancer: Results of a Brazilian multicenter study.** Cancer. 2020 Jan 1;126(1):156-164. doi: 10.1002/cncr.32437. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31497875

ELAHI, K. C.; KLEIN, G.; AVCI-ADALI, M.; SIEVERT, K. D.; MACNEIL, S.; AICHER, W. K. **Human Mesenchymal Stromal Cells from Different Sources Diverge in Their Expression of Cell Surface Proteins and Display Distinct Differentiation Patterns.** Stem Cells Int. 2016; 2016:5646384. doi: 10.1155/2016/5646384. Epub 2015 Dec 6. PMID: 26770208; PMCID: PMC4684891.

FIDELIX, MSP; Santana, AFF; Gomes, JR. **Prevalência de desnutrição hospitalar em idosos Prevalence.** Ver. da Ass. Bra. de Nutr., v.5, n. 1, p. 60-68, Jan 2013

FAO (Food and Agriculture Organization). 2015. **The State of Food Insecurity in the World 2014**. www.fao.org/publications/sofi/2014/en/.

FOCK, R. A.; BLAT, S. L.; BEUTLER, B.; PEREIRA, J.; TSUJITA, M.; DE BARROS, F. E.; BORELLI, P. **Study of lymphocyte subpopulations in boné marrow in a modelo f protein-energy malnutrition**, v. 26, n.10, p. 1021-8, Oct 2010

FOCK, R. A.; ROGERO, M. M.; VINOLO, M. A.; CURI, R.; BORGES, M. C.; BORELLI, P. **Effects of protein-energy malnutrition on NF-KappaB signalling in murine peritoneal macrophages**. *Inflammation*, v.33, n.2, p.101-9, Apr 2010.

FERNÁNDEZ, K. S.; DE ALARCÓN, P. A. **Development of the hematopoietic system and disorders of hematopoiesis that present during infancy and early childhood**. *Pediatr Clin North Am*. 2013 Dec;60(6):1273-89. doi: 10.1016/j.pcl.2013.08.002. PMID: 24237971.

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

FU, X.; LI, H. **Mesenchymal stem cells and skin wound repair and regeneration: possibilities and questions**. *Cell Tissue Res*, v. 335, n. 2, p. 317-21, Feb 2009. doi: 10.1007/s00441-008-0724-3. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19034523.

GOTHARD, D.; DAWSON, J. I.; OREFFO, R. O. **Assessing the potential of colony morphology for dissecting the CFU-F population from human bone marrow stromal cells**. *Cell Tissue Res*. 2013 May;352(2):237-47. doi: 10.1007/s00441-013-1564-3. Epub 2013 Feb 9. PMID: 23397425.

GROARKE, E. M.; YOUNG, N. S. **Aging and Hematopoiesis**. *Clin Geriatr Med*. 2019 Aug;35(3):285-293. doi: 10.1016/j.cger.2019.03.001. Epub 2019 May 9. PMID: 31230730.

GLENN, J. D.; WHARTENBY, K. A. **Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy**. *World J Stem Cells*, v. 6, n. 5, p. 526-39, Nov 2014. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.526. PMID: 25426250; PMCID: PMC4178253.

GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. **Determination of serum proteins by means of the biuret reactions.** J. Biol. Chem., Birmingham, v.177, p.751, 1949. PMID: 18110453.

GUYONNET, S.; ROLLAND, Y. **Screening for Malnutrition in Older People.** Clin Geriatr Med. 2015 Aug;31(3):429-37. doi: 10.1016/j.cger.2015.04.009. Epub 2015 May 13. PMID: 26195101.

HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S. **Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair.** Exp Cell Res, v. 316, n. 14, p. 2213-9, Aug, 2010.

HOFFMAN, C. M.; HAN, J.; CALVI, L. M. **Impact of aging on bone, marrow and their interactions.** Bone. 2019 Feb; 119:1-7. doi: 10.1016/j.bone.2018.07.012. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30010082.

HASTREITER, A. A.; MAKIYAMA, E. N.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. **Impairment of G-CSF receptor on granulocytic progenitor cells causes neutropenia in protein malnutrition.** Nutrition. 2020 Jan; 69:110540. doi: 10.1016/j.nut.2019.06.021. Epub 2019 Jun 27. PMID: 31525700.

IBGE, Retratos a Revista do IBGE: 2019. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística;2019.

(https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/media/com_mediaibge/arquivos/d4581e6bc87ad8768073f974c0a1102b.pdf)

KYURKCHIEV, D.; BOCHEV, I.; IVANOVA-TODOROVA, E.; MOURDJEVA, M.; ORESHKOVA, T.; BELEMEZOVA, K.; KYURKCHIEV, S. **Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells.** World J Stem Cells. 2014 Nov 26;6(5):552-70. doi: 10.4252/wjsc.v6.i5.552. PMID: 25426252; PMCID: PMC4178255.

KIM, J.; HEMATTI, P. **Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages.** Exp Hematol 2009; 37:1445–53. doi: 10.1016/j.exphem.2009.09.004. Epub 2009 Sep 20. PMID: 19772890; PMCID: PMC2783735.

KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. **Mesenchymal stromal cells**. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation*. *Arthritis Res Ther*, v.9, n.1, p.204, 2007. doi: 10.1186/ar2116. PMID: 17316462; PMCID: PMC1860068.

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

KUCI, S.; KUCI, Z.; KREYENBERG, H.; DEAK, E.; PÜTSCH, K.; HUENEEKE, S.; AMARA, C.; KOLLER, S.; RETTINGER, E.; GREZ, M.; KOEHL, U.; LATIFI-PUPOVICI, H.; HENSCHLER, R.; TONN, T.; VON LAER, D.; KLINGEBIEL, T.; BADER, P. **CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties**. *Haematologica*. 2010 Apr;95(4):651-9. doi: 10.3324/haematol.2009.015065. Epub 2010 Feb 23. PMID: 20179086; PMCID: PMC2857196

KRSTIC, A.; MOJSILOVIC, S.; JOVCIC, G.; BUGARSKI, D. **The potential of intrleukin-17 to mediate hematopoietic response**. *Immunol Res*, v. 52, n. 1-2, p. 34-41, Abr 2012.

KOVACH, T. K.; DIGHE, A. S.; LOBO, P. I.; CUI, Q. **Interactions between MSCs and immune cells: implications for bone healing**. *J Immunol Res*. 2015; 2015:752510. doi: 10.1155/2015/752510. Epub 2015 Apr 27. PMID: 26000315; PMCID: PMC4427002.

LEVITT, D. G.; LEVITT, M. D. **Human serum albumin homeostasis: a new look at the roles of synthesis, catabolism, renal and gastrointestinal excretion, and the clinical value of serum albumin measurements**. *Int J Gen Med*. 2016; 9:229-255. Published 2016 Jul 15. doi:10.2147/IJGM.S102819

LIU, W. X.; ZHANG, S.; GU S. Z.; SANG, L. X.; DAI, C. (2015) **Mesenchymal stem cells recruit macrophages to alleviate experimental colitis through TGF beta 1**. *Cell Physiol Biochem* 35(3):858– 865. doi:10.1159/000369743 134.

LUZ-CRAWFORD, P.; DJOUAD, F.; TOUPET, K. *et al* **Mesenchymal stem cell-derived interleukin 1 receptor antagonist promotes macrophage polarization and inhibits B cell**

differentiation. Stem Cells 2016. doi: 10.1002/stem.2254. Epub 2015 Dec 31. PMID: 26661518.

LARANJEIRA, P.; PEDROSA, M.; PEDREIRO, S.; GOMES, J.; MARTINHO, A.; ANTUNES, B.; RIBEIRO, T.; SANTOS, F.; TRINDADE, H.; PAIVA, A. **Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells.** Stem Cell Res Ther. 2015 Jan 5;6(1):3. doi: 10.1186/scrt537. PMID: 25559824; PMCID: PMC4417198.

LI, N.; HUA, J. **Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system.** Cell Mol Life Sci. 2017 Jul;74(13):2345-2360. doi: 10.1007/s00018-017-2473-5. Epub 2017 Feb 18. PMID: 28214990.

LIU, W; SUN, Y; HE, Y; ZHANG, H; ZHENG, Y; YAO, Y; ZHANG, Z. L-1 β impedes the chondrogenic differentiation of synovial fluid mesenchymal stem cells in the human temporomandibular joint. Int J Mol Med, v.39 p.317–326, fev 2016. doi: 10.3892/ijmm.2016.2832. Epub 2016 Dec 15. PMID: 28000839; PMCID: PMC5358692.

LIU, Z. J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, O. C. **Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells.** J Cell Biochem. 2009;106(6):984-91. doi: 10.1002/jcb.22091. PMID: 19229871.

LIU, S.; LIU, F.; ZHOU, Y, JIN, B.; SUN Q.; GUO, S. **Immunosuppressive Property of MSCs Mediated by Cell Surface Receptors.** Front Immunol. 2020; 11:1076. Published 2020 Jul 28. doi:10.3389/fimmu.2020.01076

LÓPEZ-OTÍN, C.; BLASCO, M. A.; PARTRIDGE, L.; SERRANO, M.; KROEMER, G. **The hallmarks of aging.** Cell. 2013 Jun 6;153(6):1194-217. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.039. PMID: 23746838; PMCID: PMC3836174.

LEES, H.; WALTERS, H.; COX, L. S. **Animal and human models to understand ageing.** Maturitas. 2016 Nov; 93:18-27. doi: 10.1016/j.maturitas.2016.06.008. Epub 2016 Jun 9. PMID: 27372369.

LIND, M.; HAYES, A.; CAPRUDA, M.; PETROVIC, D.; RODRIGO, L.; KRUZLIAK, P.; ZULLI, A. **Inducible nitric oxide synthase: Good or bad?** Biomed Pharmacother. 2017 Sep; 93:370-375. doi: 10.1016/j.biopha.2017.06.036. Epub 2017 Jun 24. PMID: 28651238.

- MARTI, L. C.; RIBEIRO, A. A. F.; HAMERSCHLAK, N. **O efeito imunomodulatório de células-tronco mesenquimais Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells.** Einstein, v.9, n.2, p. 224-8, 2011
- MEIRELLES, L. S.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. **In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells.** Stem Cells, v. 26, n. 9, p. 2287-99, Sep 2008
- MORIKAWA, S.; MABUCHI, Y.; KUBOTA, Y.; NAGAI, Y.; NIIBE, K.; HIRATSU, E.; SUZUKI, S.; MIYAUCHI-HARA, C.; NAGOSHI, N.; SUNABORI, T.; SHIMMURA, S.; MIYAWAKI, A.; NAKAGAWA, T.; SUDA, T.; OKANO, H.; MATSUZAKI, Y. **Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow.** J Exp Med, v. 206, n. 11, p. 2483-96, Oct 26 2009. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841085> >
- MOSNA, F.; SENSEBE, L.; KRAMPERA, M. **Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide.** Stem Cells Dev, v. 19, n. 10, p. 1449-70, Oct 2010. doi: 10.1089/scd.2010.0140. PMID: 20486777.
- MULLER-SIEBURG, C.E; DERYUGINA, E. **The stromal cells guide to the stem cell universe.** Stem cells, v.13, p.477-86, set 1995
- MATJUANITIA, M.; CHIN, G.; SARNOSKI, E. A.; STOLZING, A. **Biomarkers to identify and isolate senescent cells.** Ageing Res Rev. 2016 Aug; 29:1-12. doi: 10.1016/j.arr.2016.05.003.
- MUÑOZ-ESPÍN, D.; SERRANO, M. **Cellular senescence: from physiology to pathology.** *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 482–496 (2014). doi: 10.1038/nrm3823. PMID: 24954210.
- MCHUGH, D.; GIL, J. **Senescence and aging: Causes, consequences, and therapeutic avenues.** J Cell Biol. 2018 Jan 2;217(1):65-77. doi: 10.1083/jcb.201708092.
- MATHIAS, L. J.; KHONG, S. M.; SPYROGLOU, L.; PAYNE, N. L.; SIATSKAS, C.; THORNBURN, A. N.; BOYD, R. L.; HENG, T. S. **Alveolar macrophages are critical for the inhibition of allergic asthma by mesenchymal stromal cells.** J Immunol. 2013
- NAUTA, A. J.; KRUISSELBRINK, A. B.; LURVINK, E.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. **Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and**

monocyte-derived dendritic cells. J Immunol, v. 177, n. 4, p. 2080-7, Aug 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2080. PMID: 16887966.

NASEER, M.; FORSSELL, H.; FAGERSTRÖM, C. **Malnutrition, functional ability and mortality among older people aged \geq 60 years: a 7-year longitudinal study.** Eur J Clin Nutr. 2016 Mar;70(3):399-404. doi: 10.1038/ejcn.2015.196. Epub 2015 Nov 25. PMID: 26603879.

NAKAJIMA, K.; CRISMA, A. R.; SILVA, G. B.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. **Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation.** Nutrition. 2014 Jan;30(1):82-9. doi: 10.1016/j.nut.2013.05.029. PMID: 24290603.

ORTIZ, R.; CORTES, L.; CORTES, E.; MEDINA, H. **Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulation of rats.** Clin Exo Immunol, v. 155, n. 1, p. 96-106, Jan 2009.

OMRAN, M. L.; MORLEY, J. E. **Assessment of protein energy malnutrition in older persons, Part II: Laboratory evaluation.** Nutrition. 2000;16(2):131-140. doi: 10.1016/s0899-9007(99)00251-8. PMID: 10696638.

OMS, Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde: 2015. (<https://sbgg.org.br/wp-content/uploads/2015/10/OMS-ENVELHECIMENTO-2015-port.pdf>)

OLIVEIRA, L. P.; CABRAL, N. L. A.; VALE, D.; LYRA, C. O.; LIMA, K. C.; **Prevalence of malnutrition in elderly institutionalized: a critical review systematized.** J. Health Biol Sci. v.2, n. 3, p. 135-141, 2014.

PEREIRA, I. F. S.; SPYRIDES, M. H. C.; ANDRADE, L. M. B. **Estado nutricional de idosos no Brasil: uma abordagem multinível** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, V.32, P. 00178814, Mai, 2016

PREHAM, O.; PINHO, F. A.; PINTO, A. I.; RANI, G. F.; BROWN, N.; HITCHCOOK, I. S.; GOTO, H.; KAYE, P. M. **CD4⁺ T Cells Alter the Stromal Microenvironment and Repress Medullary Erythropoiesis in Murine Visceral Leishmaniasis.** Front Immunol. 2018 Dec 18; 9:2958. doi: 10.3389/fimmu.2018.02958. PMID: 30619317; PMCID: PMC6305626.

QUINN, R. **Comparing rats to humans age: how old is my rat in people years?** Nutrition, v. 21, n. 6, p. 775-7, Jun 2005. doi: 10.1016/j.nut.2005.04.002. PMID: 15925305.

REZENDE, E. M.; SAMPAIO, B. M.; ISHITANI, L. H.; MARTINS, E. F.; VILELLA LDE, C. **Mortalidade de idosos com desnutrição em Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil**: uma análise multidimensional sob o enfoque de causas múltiplas de morte [Mortality of malnourished elderly in Belo Horizonte, Minas Gerais State, Brazil: a multidimensional analysis focusing on multiple causes of death]. *Cad Saude Publica*. 2010 Jun;26(6):1109-21. Portuguese. doi: 10.1590/s0102-311x2010000600005. PMID: 20657976.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. **AIN-93 purified diets for laboratory rodents**: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the Ain-76a Rodent Diet. *J. Nutr.*, Bethesda, v.123, n.11, p.1939- 1951, 1993. doi: 10.1093/jn/123.11.1939. PMID: 8229312.

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

RIETSCHER, E. T.; KIRIKAE, T.; SSCHADE, F. U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; et al. **Bacterial endotoxin**: molecular relationships of structure to activity and function. *FASEB J* 1994; 8:217e25. doi: 10.1096/fasebj.8.2.8119492. PMID: 8119492.

SATO, T.; TERAJ, M.; TAMURA, Y.; ALEXEEV, V.; MASTRANGELO, M. J.; SELVAN, S. R. **Interleukin 10 in the tumor microenvironment a target for anticancer immunotherapy**. *Immunol Res*, v. 51, n.2-3, p. 170- 82. Dec 2010

SHETTY, P. **Malnutrition and undernutrition**. *Medicine*, v.34, p.524-529, 2006

SHI, Y.; HU, G.; SU, J.; LI, W.; CHEN, Q.; SHOU, P.; XU, C.; CHEN, X.; HUANG, Y.; ZHU, Z.; HUANG, X.; HAN, X.; XIE, N.; REN, G. **Mesenchymal stem cells**: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, v. 20, n. 5, p. 510-8, May 2010. ISSN 1001-0602.

SPAGGIARI, G. M.; CAPOBIANCO, A.; BECCHETTI, S.; MINGARI, M. C.; MORETTA, L. **Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions**: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood*, v. 107, n. 4, p. 1484-90, Feb 15 2006. ISSN 0006-4971 (Print)0006-4971

SANTOS, E. W.; OLIVEIRA, D. C.; SILVA, G. B.; TSUJITA, M.; BELTARAN, J. O.; HASTREITER, A.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. **Hematological alterations in protein malnutrition**. Nutr Rev. 2017 Nov 1;75(11):909-919. doi: 10.1093/nutrit/nux041. PMID: 29025154.

SILVEIRA, V. N. **A Nutrição no Envelhecimento**. Rep Abe da Uni do Porto, P. 2-3, 2012

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

. SELLERI, S., BIFSHA, P.; CIVINI, S.; PACELLI, C.; DIENG, M. M.; LEMIEUX, W.; JIN, P.; BAZIN, R.; PATEY, N.; MARINCOLA, F. M.; MOLDOVAN, F.; ZAOUTER, C.; TRUDEAU, L. E.; BENABDHALLA, B.; LOUIS, I.; BEAUSEJOUR, C.; STRONCEK, D.; LE DEIST F.; HADDAD, E. (2016) **Human mesenchymal stromal cell-secreted lactate induces M2-macrophage differentiation by metabolic reprogramming**. Oncotarget 7(21):30193–30210. doi:10.18632/oncotarget.8623

TANNOU T.; KOEBERLE, S.; MANCKOUNDIA, P.; AUBRY, R. **Multifactorial immunodeficiency in frail elderly patients: Contributing factors and management**. Med Mal Infect. 2019 May;49(3):167-172. doi: 10.1016/j.medmal.2019.01.012. Epub 2019 Feb 16. PMID: 30782449.

TEIXEIRA, V. P.; MIRANDA, R. C.; BAPTISTA, D. R. **DESNUTRIÇÃO NA ADMISSÃO, PERMANÊNCIA HOSPITALAR E MORTALIDADE DE PACIENTES INTERNADOS EM UM HOSPITAL TERCIÁRIO**. Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 239-251, 7 mar. 2016. Universidade de Estado do Rio de Janeiro. <http://dx.doi.org/10.12957/demetra.2016.18457>.

TRENTIN, J. J. **Hemopoietic microenvironments**. Transplant. Proc., New York, v.10, p.77-82, 1978

TRUMPP A.; ESSERS, M.; WILSON, A. **Awakening dormant haematopoietic stem cells**. Nat Rev Immunol. 2010 Mar;10(3):201-9. doi: 10.1038/nri2726. PMID: 20182459.

TABERA, S.; PEREZ-SIMON, J. A.; DIEZ-CAMPELO, M.; SANCHEZ-ABARCA, L. I.; BLANCO, B.; LOPEZ, A.; BENITO, A.; OCIO, E.; SANCHEZ-GUIJO, F. M.; CANIZO, C.;

SAN MIGUEL, J. F. **The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes.** *Haematologica*, v. 93, n. 9, p. 1301-9, Sep 2008. ISSN 0390-6078. doi: 10.3324/haematol.12857. Epub 2008 Jul 18. PMID: 18641017.

TORTAJADA, M. M.; ROURA, S.; MONTÓN, C. G.; FRANQUESA, M.; GENIS, A. B.; BORRÀS, F. E. **Mesenchymal stem cells induce expression of cD73 in human Monocytes In Vitro and in a swine Model of Myocardial infarction In Vivo.** *Frontiers in Immunology*, v. 8, p.1577, Nov 2017. doi: 10.3389/fimmu.2017.01577. PMID: 29209319; PMCID: PMC5701925.

TRAVASSOS, L. C. P. *et al.* **Nutritional risk and signs and symptoms of swallowing disorders in hospitalized elderly.** *Revista Cefac*, [S.L.], v. 21, n. 6, p. 1982-0216, 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0216/20192166419>.

United Nations, *World population Prospects: 2015 Review*. New York: United Nation Department of Social and Economic Affairs; 2015. (https://population.un.org/wpp/Publications/Files/Key_Findings_WPP_2015.pdf)

VITURI, C. L.; BORELLI, P.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. Z. **Alterations of the bone marrow in extracellular matrix in undernourished mice.** *Braz. J. Med. Biol Res.*, Ribeirão Preto, v.33, p.889-895, 2000.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA M.; TRENTIN, A. G.; *et al.* **Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides in vitro no modelo de desnutrição proteica em camundongos [in Portuguese].** *Rev Bras Cienc Farm.* vol. 44, n. 3, jul./set., 2008.

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

WANG, L.; ZHAO, Y.; SHI, S. **Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration.** *J Dent Res*, v. 91, n. 11, p. 1003-10, Nov 2012. ISSN 0022-0345. doi: 10.1177/0022034512460404. Epub 2012 Sep 17. PMID: 22988011; PMCID: PMC3490280.

WAITZBERG, D. **Geriatria** In: Atheu, editor. *Nutrição Oral, Enteral e Parenteral na Prática Clínica*. 4ª ed. São Paulo 2009. 2º, p. 1175-84. WARD, P.G. A micro-kjeldahl procedure for fiel use. *Journal of Medical Laboratory Technology*. v. 20, p191- 195, 1963.

WARD, P. G. **A micro-kjeldahl procedure for fiel use**. *Journal of Medical Laboratory Technology*. v. 20, p191- 195, 1963.

WADHWA, R.; KAUL, Z.; KAUL, S. C. (2016) **Cell Cycle Checkpoints and Senescence**. In: Rattan S., Hayflick L. (eds) *Cellular Ageing and Replicative Senescence. Healthy Ageing and Longevity*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26239-0_9.

WULLAERT, A.; BONNET, M. C.; PASPARAKIS, M. **NF- κ B in the regulation of epithelial homeostasis and inflammation**. *Cell Res*. 2011;21(1):146-158. doi:10.1038/cr.2010.175

WAITZBERG, D. L.; DE AGUILAR-NASCIMENTO, J. E.; DIAS, M. C. G.; PINHO, N.; MOURA, R.; CORREIA, M. I. T. D. **Hospital and homecare malnutrition and nutritional therapy in Brazil**. Strategies for alleviating it: a position paper. *Nutr Hosp*. 2017 Jul 28;34(4):969-975. doi: 10.20960/nh.1098.

XAVIER, J. G.; FAVERO, M. E.; VINOLO, M, A. R., ROGERO, M. M.; DAGLI, M. L. Z.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; BOROJEVIC, R.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histology and Histopathology*, v. 22, n.6, p. 651-60, 2007. doi: 10.14670/HH-22.651. PMID: 17357095.

YU, K. R.; LEE, J. Y.; KIM, H. S.; HONG, I. S.; CHOI, S. W.; SEO, Y.; KANG, I.; KIM, J. J.; LEE, B. C., LEE, S.; KURTZ, A.; SEO, K. W.; KANG, K. S. **A p38 MAPK-mediated alteration of COX-2/PGE2 regulates immunomodulatory properties in human mesenchymal stem cell aging**. *PLoS One*. 2014 Aug 4;9(8):e102426. doi: 10.1371/journal.pone.0102426. Erratum in: *PLoS One*. 2014;9(10):e112030. PMID: 25090227; PMCID: PMC4121064.

YOU, L.; WANG, Z.; LI, H.; et al. **The role of STAT3 in autophagy**. *Autophagy*. 2015;11(5):729-739. doi:10.1080/15548627.2015.1017192. doi: 10.1080/15548627.2015.1017192. PMID: 25951043; PMCID: PMC4509450.

ZHANG, Q. Z.; SU, W. R.; SHI, S. H.; WILDER-SMITH, P.; XIANG, A. P.; WONG, A.; NGUYEN, A. L.; KWON, C. W.; LE, A. D. (2010) **Human gingivaderived mesenchymal stem cells elicit polarization of M2 macrophages and enhance cutaneous wound healing.** *Stem Cells* 28(10):1856–1868. doi:10.1002/stem.503. doi: 10.1002/stem.503. PMID: 20734355; PMCID: PMC3114043.

ZHANG, W.; GE, W.; LI, C.; YOU, S.; LIAO, L.; HAN, Q.; DENG, W.; ZHAO, R. C. **Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells.** *Stem Cells Dev*, v. 13, n. 3, p. 263-71, Jun 2004. ISSN 1547-3287 (Print) 1547-3287.

ZHANG, J.; NIU, C.; YE, L.; HUANG, H.; HE, X.; TONG, W. G.; ROSS, J.; HAUG, J.; JOHNSON, T.; FENG, J. Q.; HARRIS, S.; WIEDEMANN, L. M.; MISHINA, Y.; LI, L. **Identification of the haematopoietic stem 52 cell niche and control of the niche size.** *Nature*, v. 425, n. 6960, p. 836-41, Oct 23 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14574412> >

ZHOW, X.; HANSSON, G. K. **Effect of sex and age on sérum biochemical reference range in C57BL/6J mice.** *Comparative medicine*.v.54, n.2, p.176-178, 2012.

ZHANG, Z.; PEREIRA, S. L.; LUO, M.; MATHESON, E. M. **Evaluation of Blood Biomarkers Associated with Risk of Malnutrition in Older Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis.** *Nutrients*. 2017;9(8):829. doi: 10.3390/nu9080829. PMID: 28771192; PMCID: PMC5579622.

ANEXO I

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9142 - 9255582/1 - Renaira Oliveira da Silva

Email: oliveirarenaira@usp.br
Data de Nascimento: 06/07/1990
Cédula de Identidade: RG - 5453894 - PA
Local de Nascimento: Estado do Pará
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Bacharel em Farmácia - Universidade Federal do Pará - Pará - Brasil - 2018

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 13/07/2018
Início da Contagem de Prazo: 13/07/2018
Data Limite para o Depósito: 13/01/2021
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 13/07/2018 até o presente. Email: hemato@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 13/07/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 08/08/2019
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 13/07/2018

 Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor de 20/04/2013 até 28/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/07/2020

Impresso em: 28/10/2020 10:08:58



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FICHA DO ALUNO

9142 - 9255582/1 - Renaira Oliveira da Silva

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5757-8/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	02/08/2018	14/11/2018	15	1	100	A	N	Concluída
MPT5794-2/2	Ultraestrutura e Função Celular (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	11/09/2018	15/10/2018	75	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBC5709-7/1	Biologia Molecular em Análises Clínicas	12/09/2018	10/10/2018	60	4	100	A	N	Concluída
BIF5707-4/1	Regulação da Expressão Gênica em Processos Fisiológicos (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	17/09/2018	28/10/2018	120	0	-	-	N	Matrícula cancelada
BIF5794-2/2	Sinalização Celular (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	02/10/2018	10/12/2018	120	8	100	B	N	Concluída
FBC5793-14/2	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	12/03/2019	24/06/2019	15	1	100	A	N	Concluída
FBA5728-4/8	Aprimoramento Pedagógico	02/04/2019	30/04/2019	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5954-1/2	Redação de Trabalhos Científicos	11/04/2019	17/04/2019	15	0	-	-	N	Turma cancelada
FBA5756-1/3	Alergia Alimentar	29/04/2019	05/05/2019	30	0	-	-	N	Turma cancelada
FBF5805-2/7	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	20/08/2019	28/10/2019	90	6	100	A	N	Concluída
MCM5926-1/3	Células e Moléculas da Resposta Imune Inata (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	23/09/2019	06/10/2019	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	28
Estágios:			
Total:	0	25	28

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 27/07/2020

Impresso em: 28/10/2020 10:08:58

ANEXO II



Renaira Oliveira da Silva

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8021403187014065>

Última atualização do currículo em 28/10/2020

Resumo informado pelo autor

Farmacêutica, formada pela Universidade Federal do Pará - UFPA. Desenvolveu o projeto " Avaliação funcional de neutrófilos circulantes em pacientes portadores de Trombocitemia Essencial" pelo programa Institucional de bolsas de Iniciação científica- PIBIC, no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia- UFPA. Atualmente, sou mestranda do laboratório de Hematologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, desenvolvendo o projeto A Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteica.

(Texto informado pelo autor)

Nome civil

Nome Renaira Oliveira da Silva

Dados pessoais

Filiação nilson oliveira da silva e renee oliveira da silva

Nascimento 06/07/1990 - Brasil

Carteira de Identidade 5453894 segup - PA - 29/01/2004

CPF 008.254.632-03

Formação acadêmica/titulação

2018 Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
Título: Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteica

Orientador: Ricardo Ambrósio Fock 
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

2013 - 2018 Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Pará, UFPA, Belem, Brasil
Título: The role of hydroxyurea in neutrophil phagocytosis in patients with essential thrombocythemia
Orientador: Carolina Heilmann Mares Azevedo Ribeiro

- 2013 - 2018** Graduação em Farmácia.
Universidade Federal do Pará, UFPA, Belem, Brasil
Título: The role of hydroxyurea in neutrophil phagocytosis in patients with essential thrombocythemia
Orientador: Carolina Heitmann Mares Azevedo Ribeiro
Bolsista do(a): Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa
- 2006 - 2008** Ensino Médio (2o grau) .
grupo de ensino ideal, IDEAL, Brasil, Ano de obtenção: 2008

Formação complementar

- 2017 - 2017** Curso de curta duração em INGLÊS. (Carga horária: 90h).
OXFORD INTERNATIONAL ENGLISH SCHOOLS, ISI, Inglaterra
- 2014 - 2016** Curso de curta duração em INGLÊS. (Carga horária: 360h).
CENTRO DE CULTURA ANGLO AMERICANA, CCAA, Brasil
- 2015 - 2015** Curso de curta duração em CURSO DE VERÃO EM FARMACOLOGIA. (Carga horária: 80h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil

Atuação profissional

1. Fundação Amazônia Paraense de Amparo à Pesquisa - FAPESPA

Vínculo institucional

- 2016 - 2017** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista PIBIC- Iniciação Científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

2. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

- 2018 - Atual** Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Aluna de Mestrado, Regime: Dedicção exclusiva

3. Universidade Federal do Pará - UFPA

Vínculo institucional

- 2017 - 2017** Vínculo: Monitoria Voluntária , Enquadramento funcional: Monitoria , Carga horária: 16, Regime: Parcial
- 2016 - 2017** Vínculo: Iniciação científica voluntári , Enquadramento funcional: Iniciação científica , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2016 - 2017** AVALIAÇÃO DE NEUTRÓFILOS CIRCULANTES EM PACIENTES COM LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA PRÉ E PÓS-TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Descrição: O objetivo central foi avaliar os neutrófilos circulantes em pacientes com leucemia mielóide aguda pré e pós tratamento quimioterápico. Avaliando se ocorrem alterações na função fagocítica dos neutrófilos nestes pacientes e analisar o efeito do tratamento sobre os parâmetros descritos.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Renaira Oliveira da Silva; ERICA DOS SANTOS SARGES ; CAROLINA HEITMANN MARES DE AZEVEDO (Responsável); RAQUEL ESTER DALMACIO LOBO; THIAGO XAVIER CARNEIRO

- 2016 - 2018** Avaliação funcional de neutrófilos circulantes em pacientes portadores de Trombocitemia Essencial

Descrição: Tem como objetivo central verificar se ocorrem alterações quantitativas e qualitativas nos neutrófilos de pacientes portadores de trombocitemia essencial. Assim como, avaliar se ocorrem alterações na função fagocítica dos neutrófilos nestes pacientes e analisar o efeito do tratamento sobre os parâmetros descritos.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Mestrado acadêmico (1);



Integrantes: Renaira Oliveira da Silva; ERICA DOS SANTOS SARGES ; CAROLINA HEITMANN MARES DE AZEVEDO (Responsável); RAQUEL ESTER DALMACIO LOBO; THIAGO XAVIER CARNEIRO

Idiomas


Inglês Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.  [DOI](#) SARTORI, TALITA; SANTOS, ANDRESSA CRISTINA ANTUNES; OLIVEIRA DA SILVA, RENAIIRA; KODJA, GABRIELA; ROGERO, MARCELO MACEDO; BORELLI, PRIMAVERA; FOCK, RICARDO AMBRÓSIO
Branched chain amino acids improve mesenchymal stem cell proliferation, reducing nuclear factor kappa B expression and modulating some inflammatory properties. NUTRITION.  , v.78, p. 110935 - , 2020.

Apresentação de trabalho e palestra

1. SILVA, R. O.
imunomodulação das células tronco mesenquimais na desnutrição, 2019. (Conferência ou palestra, Apresentação de Trabalho)
2. SILVA, R. O.; Hastreiter, A.A; Vivian, G.K.; Fock, R. A.
Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteica, 2019. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. SILVA, G.E.A.; SARGES, E. S.; SILVA, R. O.; LOBO, R. E. D. ; DAMASCENO, D. W. I. ; CRUZ, L. N.; SARGES, C. D. S.; MELO, M. F. C. ; AZEVEDO, C. H. M.
ANEMIAS VERSUS PARASITÓSES: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA ENTRE AS COMUNIDADES RIBEIRINHAS SITUADAS NO ESTADO DO PARÁ, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
4. SARGES, E. S.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, D. W. I. ; LOBO, R. E. D. ; SILVA, G.E.A.; BEZERRA, A. B. R.; SARGES, C. D. S.; CARNEIRO, T. X.; AZEVEDO, C. H. M.
ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
5. SARGES, E. S.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, D. W. I. ; CARNEIRO, T. X.; AZEVEDO, C. H. M.
ATIVIDADE FAGOCÍTICA DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
6. SILVA, R. O.; LOBO, R. E. D. ; SARGES, E. S.; DAMASCENO, D. W. I. ; AZEVEDO, C. H. M. ; SILVA, G.E.A.; MACHADO , A. P. C.; COSTA, A.S.; SANTOS, V. N.
PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS PARA A AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS NEUTRÓFILOS: OBTENÇÃO CELULAR E FAGOCITOSE, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
7.  SILVA, R. O.; LOBO, R.E.D.; SARGES, E. S.; DAMASCENO, D. W. I. ; MACHADO , A. P. C.; SANTOS, V. N. ; SILVA, G. E. A.; COSTA, A.S.; AZEVEDO, C. H. M.
PADRONIZAÇÃO DE TÉCNICAS PARA A AVALIAÇÃO FUNCIONAL DOS NEUTRÓFILOS: OBTENÇÃO CELULAR E FAGOCITOSE, 2017. (Congresso, Apresentação de Trabalho)


Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação Oral no(a) **15 congresso nacional sban**, 2019. (Congresso)
Influência do envelhecimento sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteica.
2. **21 SIMPÓSIO DE FARMÁCIA EM HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**, 2017. (Simpósio)
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **HEMO**, 2017. (Congresso)
ATIVIDADE FAGOCITICA DE NEUTRÓFILOS EM PACIENTES PORTADORES DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS.
4. **WORKSHOP EM IMUNOTERAPIA DO CÂNCER: MUDANÇAS DE PARADIGMAS NO TRATAMENTO DA ONCOLOGIA**, 2017. (Outra)
5. Apresentação Oral no(a) **1 CICLO DE PALESTRAS ABERTAS DE TOXICOLOGIA**, 2016. (Seminário)
TOXICOLOGIA DE METAIS PESADOS, COM ÊNFASE DE METAIS DE INTERESSE DA AMAZÔNIA: MERCÚRIO, ARSÊNIO, MANGANÊS E ALUMÍNIO.
6. **1 SIMPÓSIO SOBRE O ESTUDO DA DOR**, 2016. (Simpósio)
7. **congresso medico amazônico**, 2014. (Congresso)
medico amazonico.
8. **congresso medico amazônico**, 2014. (Oficina)
curso em atualizações de exames laboratoriais.

Organização de evento

1. **OLIVEIRA DA SILVA, RENAIRA**
I Escola de Inverno em Análises Clínicas e Toxicológicas – I ClinTox,, 2019. (Outro, Organização de evento)
2. **SILVA, R. O.; SILVA, A R P; SANTOS, A. B.N.S.; PORTELA, A.C.R; DAMASCENO, A. M. S.; MORAES, D.L; RIBEIRO, D.E.M.; BRASIL, I.F.S.; COSTA, I.O.F.; PINHEIRO, J.C.; MONTEIRO, V. V. S.; SANTOS, L.T.; FARIA, L. V. ; SILVA, L. S. ; MORAES, F. L. S. ; BATISTA, A.V. A; BRAGA, P. H. C.; ANDRADE, L. N. ; SILVA, L.R.S.V.; CALANDRINI, M. S.**
I Simpósio Regional de Oncologia, 2017. (Outro, Organização de evento)
3. **SILVA, R. O.; SILVA, A R P; PORTELA, A.C.R; DAMASCENO, A. M. S.; BATISTA, A.V. A; SANTOS, A. B.N.S.; MONTEIRO, C.V.S.; MORAES, D.L; RIBEIRO, D.E.M.; MORAES, F. L. S. ; BRASIL, I.F.S.; COSTA, I.O.F.; PINHEIRO, J.C.; FARIA, L. V. ; SANTOS, L.T.; SILVA, L. S. ; ANDRADE, L. N. ; CALANDRINI, M. S.; BRAGA, P. H. C.; MONTEIRO, V. V. S.**
1 simposio de doenças cardiovasculres, 2017. (Outro, Organização de evento)
4.  **SILVA, R. O.; SILVA, A R P; SANTOS, A. B.N.S.; PORTELA, A.C.R; DAMASCENO, A. M. S.; PINHEIRO, J.C.; BATISTA, A.V. A; MORAES, D.L; RIBEIRO, D.E.M.; MORAES, F. L. S. ; BRASIL, I.F.S.; COSTA, I.O.F.; FARIA, L. V. ; SANTOS, L.T.; SILVA, L. S. ; ANDRADE, L. N. ; CALANDRINI, M. S.; BRAGA, P. H. C.; MONTEIRO, V. V. S.**
Ciclo de palestras multidisciplinar em doenças neurodegenerativas: Parkinson e Alzheimer, 2016. (Outro, Organização de evento)

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 28/10/2020 às 10:33:16.

ANEXO III

Comissão de ética



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

Ofício CEUA/FCF 085.2018-P544

São Paulo, 04 de setembro de 2018.

Prezada Senhora,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 04 de setembro de 2018, **aprovou** as alterações propostas para o projeto de pesquisa **"O Papel da Disfunção Endotelial Associada ao Envelhecimento na Hematopoiese"** (Protocolo CEUA nº 544), conforme constante nos documentos apresentados:

- a. *Inclusão das alunas como colaboradoras, Renaira Oliveira da Silva e Gabriela Kodja Vivian.*
- b. *O desligamento da aluna Carolina Carvalho Dias.*

Cordialmente,


Prof. Dra. **Neza Mariko Aymoto Hassimotto**
Coordenadora CEUA/FCF/USP

Ilma. Sra.
Pesquisadora: Araceli Aparecida Hastreiter
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
FBC/FCF/USP