

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

A participação da autofagia na regulação da célula-tronco
hemopoética em camundongos knockouts para Atg7 e
transglutaminase 2

Jackeline Soares de Oliveira Beltran

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Primavera Borelli

Co-orientador: Prof. Dr. João Gustavo P. Amarante-Mendes

São Paulo

2018

Jackeline Soares de Oliveira Beltran

A participação da autofagia na regulação da célula-tronco
hemopoética em camundongos knockouts para Atg7 e
transglutaminase 2

Jackeline Soares de Oliveira Beltran
Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Profa. Dra. Primavera Borelli

Co-orientador: Prof. Dr. João Gustavo P. Amarante-Mendes

São Paulo

2018

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 eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a 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

B453p BELTRAN, Jackeline Soares de Oliveira
A participação da autofagia na regulação da célula-tronco hemopoética em camundongos Knockouts para Atg7 e transglutaminase 2 / Jackeline Soares de Oliveira BELTRAN. - São Paulo, 2018.
134 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador: Borelli, Primavera
Coorientador: Amarante-Mendes, Joao Gustavo Pessini

1. Desnutrição. 2. célula-tronco hemopoética . 3. autofagia. 4. ATG7. 5. transglutaminase 2 . I. T. II. Borelli, Primavera, orientador. III. Amarante-Mendes, Joao Gustavo Pessini, coorientador.

Jackeline Soares de Oliveira Beltran

A participação da autofagia na regulação da célula-tronco
hemopoética em camundongos knockouts para Atg7 e
transglutaminase 2

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof^a. Dr^a. Primavera Borelli
orientadora/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, ____ de _____ 2018.

Resumo

Beltran, J.S.O. **A participação da autofagia na regulação da célula-tronco hemopoética em camundongos knockouts para Atg7 e transglutaminase 2.** 2018. 134 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A desnutrição é um dos principais problemas de saúde pública do mundo, que contribui significativamente para o aumento da morbidade e mortalidade. Estima-se um total de 815 milhões de pessoas subnutridas no mundo, e apesar da melhoria dos recursos alimentares o número de pessoas desnutridas ainda é alarmante. Estudos de nosso laboratório tem demonstrado, em modelo murino de desnutrição proteica, hipoplasia medular com evidências histológicas de alterações na matriz extracelular (MEC) e permanência da célula-tronco hemopoética (CTH) na fase G0/G1 do ciclo celular em camundongos desnutridos. Dados deste trabalho evidenciaram alterações nas proteínas Akt /mTOR, que podem contribuir para o aumento da expressão autofágica nas CTHs e CTPHs (célula-tronco progenitora). A literatura demonstra que desequilíbrios nutricionais e metabólicos podem induzir ativação autofágica. Autofagia é um processo catabólico que participa da manutenção da homeostase celular, da MEC e na regulação das CTHs, dados deste trabalho demonstram diminuição da quantidade de CTH e CTPH em camundongos desnutridos sem a presença do gene Atg7, proteína participativa no processo autofágico. Já camundongos com deleção da transglutaminase 2 (TG2) e submetidos a privação de nutrientes por 24 horas, apresentou diminuição da quantidade de CTH e aumento da diferenciação da CTPH. A TG2 tem participação na impulsão e formação do fagóforo (processo inicial autofágico). Considerando que a desnutrição proteica leva a comprometimento da hemopoese, alterações no ciclo celular das CTHs e hipoplasia medular com pancitopenia periférica e que privação e ou jejum prolongado de nutrientes pode aumentar a atividade autofágica, concluímos nesse projeto que autofagia é importante para regulação da CTH e diferenciação da CTPH, entretanto a desnutrição proteica e privação de nutrientes estimula de maneira diversa o mecanismo de diferenciação da CTH.

Palavras chaves: Desnutrição, autofagia, célula-tronco hemopoética, ATG7 e transglutaminase 2

ABSTRACT

Beltran, J.S.O. **The participation of autophagy in hemopoietic stem cell regulation in mice Knockouts for Atg7 and transglutaminase 2**. 2018. 134 f. Thesis (PhD) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

Malnutrition is one of the world's major public health problems, which contributes significantly to increased morbidity and mortality. An estimated 815 million people are undernourished in the world, and despite the improvement in food resources the number of undernourished people is still alarming. Studies of our laboratory have demonstrated in murine model of protein malnutrition, medullary hypoplasia with histological evidence of extracellular matrix (ECM) changes and hemopoietic stem cell (HSC) stay in the G0/ G1 phase of the cell cycle in malnourished mice. Data from this work showed alterations in Akt / mTOR proteins, which may contribute to the increase of autophagic expression in HSC and HPC (progenitor stem cell). The literature demonstrates that nutritional and metabolic imbalances can induce autophagic activation. Autophagy is a catabolic process that participates in the maintenance of cellular homeostasis, ECM and in the regulation of HSC, data from this work demonstrate a decrease in the amount of HSC and HPC in malnourished mice without the presence of the Atg7 gene, a participatory protein in the autophagic process. Mice with transglutaminase 2 deletion (TG2) and submitted to nutrient deprivation for 24 hours showed a decrease in the amount of HSC and an increase in the differentiation of HPC. TG2 plays a role in the uptake and formation of phagophore (autophagic initial process). Considering that protein malnutrition leads to hemopoiesis, alterations in the cell cycle of HSC and spinal cord hypoplasia with peripheral pancytopenia, and that prolonged nutrient starvation or fasting may increase the autophagic activity, we conclude in this project that autophagy is important for regulation of HSC and differentiation of HPC, however, protein malnutrition and nutrient deprivation stimulate in a different way the mechanism of differentiation of HSC.

Keywords: Malnutrition, autophagy, hemopoietic stem cell, ATG7 and transglutaminase 2

À minha filha
Íris Oliveira Beltran

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Francisca Soares e João Mendes pelo carinho e palavras de otimismo durante todos esses anos na minha trajetória acadêmica, amo vocês e também ao meu irmão Kaique.

Ao meu esposo Thiago Beltran pelo amor, compreensão e muita paciência, por saber lidar com os momentos de estresse e muitas vezes com a com a minha ausência, te amo!

À minha filha Íris Beltran que amo tanto, foi muito difícil para eu deixá-la muitas vezes de lado, mas espero recompensar o tempo perdido.

Aos meus padrinhos: João de Deus Mourão (*in memoriam*) e Germana Olímpio Mourão pelo amor e carinho.

A Profa. Dra. Primavera pela paciência e confiança dada a mim para este trabalho ser realizado. Agradeço muito pela oportunidade, sua amizade e todos os seus ensinamentos. A senhora é uma ótima orientadora e uma grande amiga, tenho muito orgulho de ter sido sua aluna.

Ao Prof. Dr. Gustavo Pessini Amarante-Mendes por ter aceitado ser meu coorientador, pelo apoio e todos os seus ensinamentos, muito obrigado pela oportunidade de coração.

Ao Prof. Dr. Mauro Piacentini pela oportunidade de realizar meu doutorado “sanduiche” no laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Roma “Tor Vergata” na Itália e por toda a confiança dada a mim e seus ensinamentos.

Per i miei amici del laboratorio Piacentini: Manuela D'Eletto, Federica Rossin, Danielle Ticioni, Luca Occhigrossi, Maria Grazia Farrace e Magdalena.

Per la mia amica Serafina Olivero pela amizade e por todos os ensinamentos de autofagia apoio dado a este trabalho.

Per i miei amici del laboratorio INMI Istituto Spallanzani: Veronica Bordini, Eleonora, Chiara, Fabiola e Antonella pela amizade e por todo apoio dado neste projeto.

Ao Prof. Dr. Ricardo Fock por ter participado da minha formação profissional e pelos momentos de amizade.

À Carolina Dias e Graziela Batista da Silva, pela ajuda em todos os momentos deste trabalho e principalmente, pela sua amizade e companheirismo.

Aos companheiros de pós-graduação: Dalila Cunha, Ed Wilson dos Santos, Andreia Bovini, Amanda Nogueira Pedro pela amizade e apoio nos momentos felizes e difíceis.

Aos colegas do laboratório de hematologia Araceli Hastreiter e Andressa Santos pela amizade.

Aos meus colegas do laboratório de Biologia Celular e Molecular do ICB IV: Nathalia Cruz, Elisabeth, Luciana Medina, Henry, Isabela, Amir, Sandy, Jennifer e Melanie pelos momentos de amizade e apoio nos meus experimentos.

Aos técnicos de laboratório: Edson Makiyama e Renata Albuquerque pelo auxílio nos experimentos e também pela sua amizade.

À minha querida Silvia Massironi (Silvinha) do Biotério de Reprodução do ICB IV, muito obrigado pelo o apoio e carinho.

À minhas amigas da graduação: Joana de Souza e Kátia Oliveira pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Edgar Paredes-Gamero e Marcus Buri pelo apoio nos experimentos de Citometria de Fluxo *cell sorting* na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

E a todos os colaboradores e estagiários do laboratório de hematologia pela amizade e contribuição.

À CNPq pela concessão da bolsa de doutorado, e ao apoio financeiro concedido pela CNPq Projeto Universal, para a realização desta pesquisa.

“Fa tutto con il cuore oppure non fare niente..”
Desconhecido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A via de sinalização autofágica.....	25
Figura 2: Figura CTH.....	34
Figura 3: Autofagia na CTH.....	37
Figura 4: Esquema de cruzamento dos camundongos CAG CRE Atg7 flox	47
Figura 5: Esquema de tratamento do Tamoxifeno nos camundongos CAG CRE Atg7 flox	48
Figura 6: Esquema de separação dos grupos e submissão da desnutrição nos camundongos CAG CRE Atg7 flox	48
Figura 7: Resultados C57BL/6J Valores do consumo de ração e proteína.....	61
Figura 8: Cinética da variação do peso corporal e % da massa corporal final.....	61
Figura 9: Valores da concentração de proteína e albumina plasmática.....	62
Figura 10: Celularidade óssea.....	64
Figura 11: Efeito da desnutrição proteica das proteínas Akt total e fosforilado nas CTPHs de camundongos controle e desnutrido avaliado por Western Blotting.....	65

Figura 12: Efeito da desnutrição proteica das proteínas mTOR e seus complexos nas CTPHs de camundongos controle e desnutrido avaliado por Western Blotting.....	66
Figura 13: Efeito da desnutrição proteica nas proteínas envolvidas na sinalização autofágica em CTPHs de camundongos controle e desnutrido avaliado por Western	67
Figura 14: Efeito da desnutrição proteica na expressão gênica da autofagia em CTPHs de camundongos controle e desnutrido avaliado por Western Blotting.....	68
Figura 15: Estratégia de análise para separação da CTH por <i>cell sorting</i> e quantificação das populações de CTH e CTPH do camundongo controle.....	69
Figura 16: Estratégia de análise para separação da CTH por <i>cell sorting</i> e quantificação das populações de CTH e CTPH do camundongo desnutrido.	70
Figura 17: Efeito da desnutrição proteica na população de CTH e CTPH por citometria de fluxo <i>cell sorting</i>	70
Figura 18: Avaliação da apoptose e necrose das populações de CTH e CTPH do camundongo controle e desnutrido.....	71
Figura 19: Quantificação da apoptose e necrose das populações de CTH e CTPH por citometria.....	72
Figura 20: Avaliação da autofagia na CTH por microscopia de fluorescência camundongo controle.....	73
Figura 21: Avaliação da autofagia na CTH por microscopia de fluorescência camundongo desnutrido.....	74

Figura 22 Resultados CAG CRE Atg7 flox Genotipagem de camundongos CAG Cre Atg7 flox/flox e yfp/yfp.....	75
Figura 23: Expressão de ATG7 e LC3.....	79
Figura 24: % Variação do peso corpóreo.....	80
Figura 25: % Celularidade óssea.....	81
Figura 26: % CTH e CTPH.....	84
Figura 27: Anexina V	85
Figura 28: Ciclo celular.....	87
Figura 29: Resultados TG2 Celularidade óssea.....	87
Figura 30: Western Blotting	88
Figura 31: CTH e CTPH na TG2.....	89
Figura 32: Morte Celular na CTH.....	90
Figura 33: LC3 e p62.....	91
Figura 34: ERke Ki67.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos primers TG2.....	50
Tabela 2: Sequência dos primers CAG Cre, Atg 7 flox e YFP.....	50
Tabela 3: Composição da ração de crescimento.....	52
Tabela 4: Composição das Rações utilizadas.....	52
Tabela 5: Composição da Mistura Salínica.....	53
Tabela 6: Composição da Mistura Vitamínica.....	54
Tabela 7: Anticorpos utilizados no experimento para separação de CTH por <i>cell sorting</i>	54
Tabela 8: Anticorpos utilizados no experimento para viabilidade celular de CTH e CTPH por <i>cell sorting</i>	57
Tabela 9: Anticorpos utilizados no experimento para viabilidade celular de CAG CRE.....	59
Tabela 10: Anticorpos utilizados no experimento para viabilidade celular de TG2.....	59
Tabela 11: Tabela dos parâmetros da série eritrocitária.....	66
Tabela 12: Tabela dos valores referente ao leucograma.....	66
Tabela 13: Análise Diferencial das diferentes populações celulares.....	66
Tabela 14: Avaliação hematológica dos camundongos CAG Cre.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS

Akt	Proteínas conhecidas como Kinases B (PKB)
Apaf 1	Apoptotic Protease – Activating Factor 1
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina Bovina
Bcl-2	Proteína anti-apoptótica ligada à membrana mitocondrial
Beclin-1	APG6 , proteína relacionada à autofagia (AutoPhaGy)
CHCM	Concentração da hemoglobina corpuscular média
CTH	Célula-tronco Hemopoética
DNA	Ácido deoxirribonucléico
ERK	Quinase regulada por sinal extra celular
FAO	Food and Agriculture Organization
FAK	Kinase de Adesão Focal
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
GβI	proteína G beta subunidade-like
mTOR	Alvo da rapamicina
HCM	Hemoglobina corpuscular média
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
LA	Laranja de Acridina
LC3	Proteínas ligadas aos microtubules de cadeia leve 3 (Light Chain 3)
FN	Fibronectina
MEC	Matriz extracelular
Mtor	Mammalian target of rapamycin
NaF	Fluoreto de sódio
PBS	Phosphate buffer solution (Solução tampão fosfato)
PE	Ficoeritrina
PI	Iodeto de Propídeo
PI3K III	Phosphoinositide 3- Kinase
PKC	Proteína Kinase C
PMSF	Phenlmethylsulphonyl fluoride (Fluoreto de fenilmetilssulfonila)
PRAS40	Proteína que regula a insulina através da via de mTOR

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SBF	Soro Bovino Fetal
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida docecil sulfato de sódio
SMAC-DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspases
TBS	Tris buffered saline (Solução tampão fosfato)
TNF	Tumor Necrosis factor
TNF-α	Tumor necrosis factor alfa (Fator de necrose tumoral alfa)
VCM	Volume corpuscular médio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
1.0 Autofagia.....	23
1.1 Conceito.....	23
1.2 Como mTOR regula autofagia?.....	26
1.3 As vias de ativação e inibição de mTORC1.....	28
1.4 Sinalização Molecular da autofagia.....	29
1.5 Autofagia na célula-tronco hemopoética.....	32
1.5.1 Conceito de célula-tronco hemopoética (CTH).....	32
1.5.2 Microambiente e sinais moleculares para CTH.....	33
1.5.3 Como a autofagia participa no processo de auto renovação e diferenciação da CTH.....	35
1.5.4 A importância da proteína Atg7 na CTH.....	39
1.5.5 Autofagia e Transglutaminase 2	40
1.6 Autofagia e Desnutrição.....	41
1.6.1 Conceito de Desnutrição.....	41
1.6.2 Desnutrição e Hemopoese.....	42
1.6.3 A participação da autofagia na desnutrição.....	44
2. OBJETIVOS e JUSTIFICATIVA	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	45
3.1 Animais.....	45
3.1.2 C57BL/6J.....	45
3.1.3 TG2.....	45
3.1.4 CAG-CreER.....	45
3.2 Genotipagem.....	49
3.2.1 Concentrações do Tamoxifeno	51
3.2.2 Preparo das Rações.....	28
3.2.3 Indução a Desnutrição.....	54
3.2.4 Avaliação do estado nutricional dos animais.....	55
3.2.5 Obtenção das amostras biológicas.....	55
3.2.6 Determinação de proteínas totais e albumina	55
3.2.7 Hemograma e contagem de reticulócitos.....	55
3.2.8 Obtenção de células da medula óssea e mielograma.....	56
3.2.9 Separação das células Lin ⁻ por método imunomagnético.....	56

3.2.10 Separação das CTHs por cell sorting.....	57
3.2.11 Viabilidade Celular das CTHs e CTPH.....	58
3.2.12 Ensaio de ativação	59
3.2.13 Ensaio do ciclo celular.....	59
3.2.14 Extração de proteínas e Western Blotting.....	61
3.2.15 PCR.....	62
3.2.16 Avaliação da autofagia na CTH por microscopia de fluorescência.....	62
4.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
5.0 RESULTADOS	63
C57Bl/6J.....	
5.1 Determinação da concentração proteica de rações.....	63
5.2 Avaliação do estado nutricional.....	64
5.3 Avaliação hematológica.....	64
5.3.1 Eritrograma.....	65
5.3.2 Leucograma.....	65
5.3.3 Desnutrição afeta a celularidade óssea.....	67
5.3.4 Avaliação da proteína Akt total e fosforilada na sinalização autofágica em células-tronco progenitoras hemopoéticas Lin ⁻	68
5.3.5 Avaliação da proteína mTOR e seus complexos na sinalização autofágica em células-tronco progenitoras hemopoéticas Lin ⁻	69
5.3.6 Avaliação da proteína Atg7, Bcl-2 e LC3 na sinalização autofágica em células-tronco progenitoras hemopoéticas Lin ⁻	70
5.3.7 Análise da expressão gênica da autofagia em células-tronco progenitoras hemopoéticas Lin ⁻	71
5.3.8 Quantificação da CTH e CTPH por citometria de fluxo.....	72
5.3.9 Avaliação dos processos apoptóticos e necróticos na CTH e CTPH por citometria de fluxo.....	74
5.3.10 Avaliação da autofagia na CTH por microscopia de fluorescência.....	76
6.0 RESULTADOS CAG CRE ATG7.....	78
6.1 Genotipagem.....	78
6.2 Avaliação da proteína Atg7 por Western Blotting.....	79
6.3 Avaliação do estado nutricional.....	80

6.4 Celularidade da medula óssea.....	81
6.5 Quantificação da CTH e CTPH por citometria de fluxo.....	84
6.6 Morte Celular na CTH.....	85
6.7 Avaliação do ciclo celular.....	86
7.0 RESULTADOS TG2.....	87
7.1 Celularidade da medula óssea.....	87
7.2 Western Blotting das proteínas envolvidas na autofagia.....	88
7.3 Quantificação da CTH e CTPH por citometria de fluxo.....	89
7.4 Morte Celular na TG2.....	90
7.5 Avaliação de LC3 e p62.....	91
7.6 Avaliação de ERk e Ki67.....	92
8.0 DISCUSSÃO.....	93
9.0 Conclusão.....	100
10 .Anexos (Certificado Comitê de Ética).....	101
Ficha do aluno.....	102
CVLattes.....	104
11. REFERENCIAS.....	117

1. INTRODUÇÃO

1.0 Autofagia

1.1 Conceito

A autofagia (auto- próprio + fagia- comer/alimentar-se) é um processo catabólico utilizado pelo organismo para manter o equilíbrio entre a síntese, a degradação e reciclagem de componentes celulares, desempenhando assim um papel importante no crescimento, desenvolvimento e homeostase celular (MORGAN-BATHKE, 2013).

A caracterização da via autofágica foi inicialmente realizada em leveduras, sendo identificados em torno de 30 genes ATGs (THUMM *et al.*,1994). Experimentos realizados em hepatócitos de mamíferos demonstrou a presença de mais 8 genes que regulam as ATGs, desde a etapa da formação até a maturação dos autofagossomos (LIPPAI *et al.*,2014). Estes estudos demonstraram a importância dos níveis de nutrientes, status de energia e regulação hormonal como principais reguladores da autofagia. Além disso, estresse, por exemplo a hipóxia e acumulação de espécies reativas de oxigênio (EROS) também pode induzir autofagia

Até o momento, existem três tipos descritos ou conhecidos de autofagia: a autofagia mediada por chaperonas, a microautofagia e a macroautofagia. Na autofagia mediada por chaperonas, proteínas citoplasmáticas que possuem chaperonas ligadas são entregues aos lisossomos para degradação (LOOS, 2013). Chaperonas são as proteínas do retículo endoplasmático rugoso responsável pelo dobramento correto das proteínas celulares (MASSEY, 2004). Na microautofagia, ocorre o englobamento de componentes celulares diretamente pelos lisossomos das células, por invaginação, protusão e/ou septação da membrana do lisossomo, e em seguida, ocorre a degradação destes componentes celulares (DAY, 2010). Portanto, a microautofagia é considerada como autofagia não seletiva ou seletiva direta de material citoplasmático pela membrana lisossomal, ou seja, não há necessidade da formação do fagóforo.

A macroautofagia é mais bem caracterizada e altamente a mais conservada entre os três tipos e é responsável por mais de 90% da autofagia celular. A via de sinalização é também a melhor caracterizada neste processo, principalmente no metabolismo e morte celular (LOOS, 2013). O processo autofágico é induzível por: privação de nutrientes, hipóxia e toxinas, para auto-digerir proteínas e organelas, a célula passa por um processo de nucleação, através da formação de uma estrutura inicial, de membrana dupla e lipídica chamada de fagóforo, a qual depende de um complexo multi-proteico, envolvendo as proteínas Beclin-1 e PI3K e regulada pela proteína mTOR, ou seja, autofagia canônica. A

partir disto, inicia-se o processo de envolvimento de componentes celulares citoplasmáticos como: proteínas e organelas (MIZUSHIMA, 2007). As proteínas PI3K III (fosfatidilinositol 3-quinase classe III), conhecida também como Vps34, UVRAG (gene resistente associado à irradiação ultravioleta), BCL2 (B cell CLL/lymphoma 2), BIF-1 (Bax-interacting fator 1), Beclin-1, Ambra 1 (autofagia / Beclin 1 regulador 1), VMP1 e ICP34 (figura 1) participam da nucleação/iniciação do processo autofágico, ou seja, da formação do fagóforo (ZHOU et al., 2016 e WARD et al., 2016).

O fagóforo pode ser oriundo de diversas organelas, tais como: membrana plasmática, mitocôndria, complexo de Golgi, retículo endoplasmático (RE) e sítios de contato entre o retículo endoplasmático e mitocôndrias (HAYASHI-NISHINO *et al.*, 2009; YLA-ANTTILA *et al.*, 2009; RAVIKUMAR *et al.*, 2010; HAILEY *et al.*, 2010 LAMB *et al.*, 2013; HAMASAKI *et al.*, 2013; GE *et al.*, 2013). O retículo endoplasmático atua como uma rede de distribuição de substâncias no interior da célula. Se o microambiente do RE é bloqueado, a autofagia é ativada pelas vias de EIF2AK3 (fator de iniciação da tradução eucariótica 2-alfa cinase 3) e ATF⁶ (fator de transcrição 6). Uma vez ativada, há um estímulo intenso, para melhorar a acumulação e agregação de proteínas deformadas. Portanto, o estresse no RE é também um potente indutor de autofagia (SHI *et al.*, 2015).

Após ativação do processo autofágico, o fagóforo é alongado e impulsionado por duas reações de ubiquitinação. Além disso, a maturação dos autofagossomos envolve a encapsulação do alongamento do fagóforo e posterior fusão com diferentes compartimentos endossomais. Ou seja, a “entrega” do autofagossomo para a degradação necessita de uma fusão entre autofagossomos e lisossomos (QI *et al.*, 2014).

O processo de fusão é dependente da família de proteínas, denominadas **SNAREs** (*soluble NSF attachment receptor*), cuja função é gerar especificidade no tráfego vesicular e na catálise do processo de fusão. Muitas vesículas transportadoras só se formam se um tipo específico de proteína Rab e SNARE estiverem acopladas à sua membrana, permitindo assim, a fusão correta da vesícula (UNGAR *et al.*, 2003). Portanto, as SNAREs contribuem na formação do autofagolissomo, e após este processo, ocorre a degradação e reciclagem de proteínas e organelas (HALE *et al.*, 2013) (figura 1).

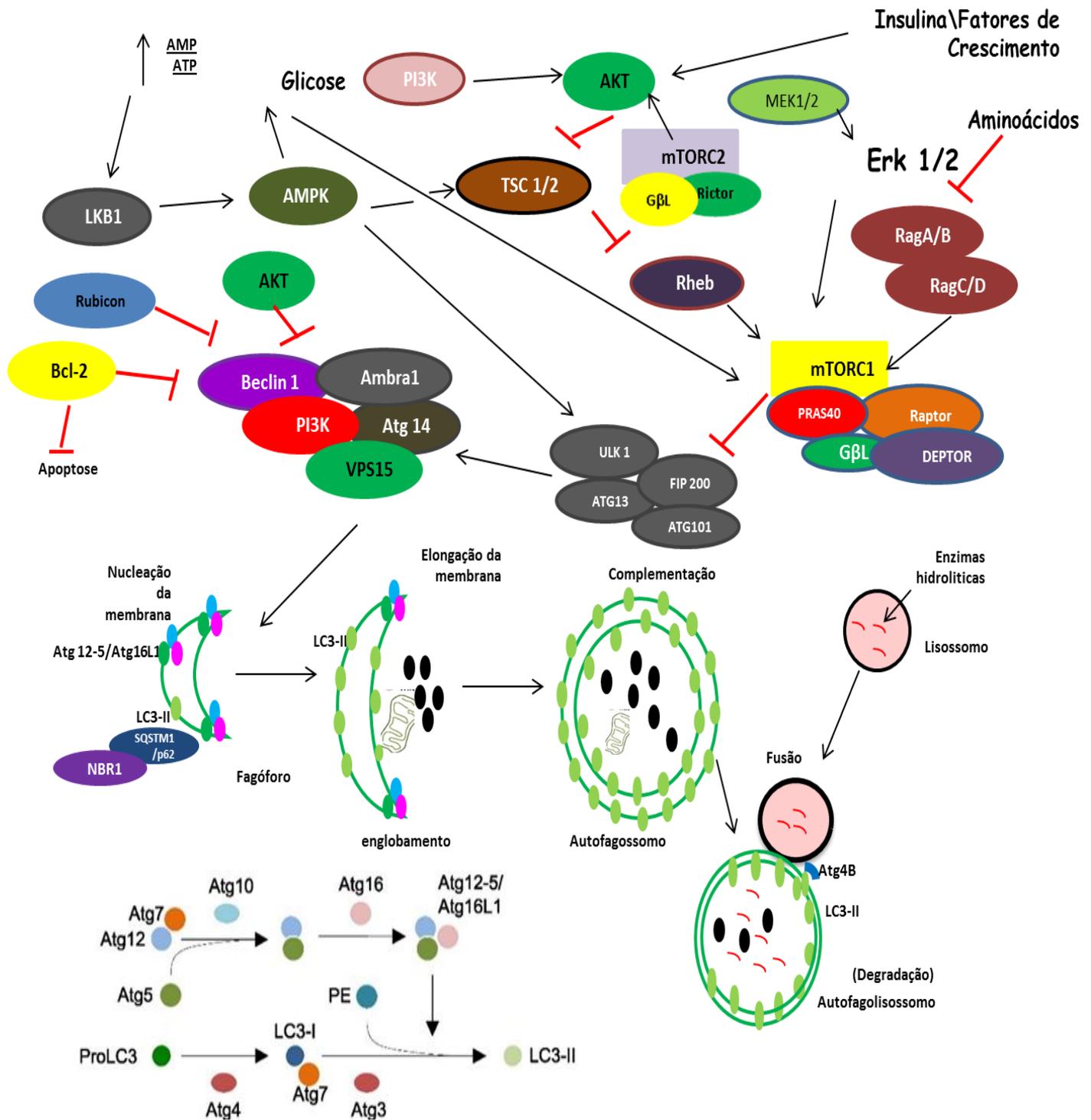


Figura 1: A via de sinalização autofágica: Privação de fatores de crescimento, aminoácidos e ATP ativam autofagia através das vias de sinalizações mTOR e AMPK, que regulam a biogênese dos autofagossomos. A macroautofagia é ativada via mTOR independente. O sistema de conjugação (retângulo) promove a formação da proteína LC3-II na membrana autofagossomal (fagóforo) e após o englobamento dos componentes celulares, forma-se o autofagossomo. A fusão entre autofagossomos e lisossomos formam os autofagolisossomos. Os componentes celulares são degradados nos autofagolisossomos por enzimas hidrolíticas presentes nos lisossomos, e ocorrendo portanto, a degradação desses componentes dentro do citoplasma.

1.2 Como mTOR regula autofagia?

A atividade autofágica é controlada por numerosos sinais intra e extracelulares que avaliam o estado metabólico ou energético de uma forma direta ou indireta. Três situações principais podem regular o metabolismo celular

- Estado energético;
- Formação de metabólitos (através do fluxo autofágico);
- Integração complexa de processos com atividade autofágica consumindo ATP.

Esses conjuntos de processos controlam o metabolismo celular, que por sua vez, define se a célula entra em um processo de morte ou de sobrevivência.

As proteínas PKA (proteína cinase, dependente de cAMP), AMPK (proteína cinase ativada por AMP) e mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos) regulam o processo molecular da autofagia (BLACKSTONE *et al.*,2011), sendo que a síntese e degradação de proteínas são controladas por mTOR.

Dados da literatura demonstram que mTOR é ativado por fatores de crescimento e nutrientes como carboidratos e aminoácidos e que atua como um “sensor” para equilibrar a disponibilidade de nutrientes e crescimento celular (KIHARA, 2001), ou seja, se as células estiverem desprovidas de nutrientes, mTOR não consegue inibir a autofagia e, caso estes nutrientes não sejam fornecidos em até 48 horas de privação total,ativará a via de sinalização da apoptose.Além de inibir autofagia, mTOR participa da regulação do crescimento e da proliferação celular.

Podemos verificar que TOR quinase forma dois complexos distintos (figura 1) denominados TOR complexo 1 (TORC1) e TOR complexo II (TORC2). O complexo mTORC1 é constituído por Raptor (*regulatory-associated protein of mTOR*), mLST8 (*GβL*), Tti1/Tel2, DEPTOR (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) e PRAS40 (*proline-rich Akt substrate 40 kDa*),e estimula o crescimento celular, aumenta a síntese e participa na degradação de proteínas, inibe autofagia e pode ser ativado por fatores de crescimento e aminoácidos(KAIZUKA *et al.*,2010).

Já, o complexo MTORC2 é formado pelas proteínas: mTOR, Rictor, mSin1,PRR5 e mLST8 (*GβL*), que participa da sobrevivência celular e organização do citoesqueleto sendo regulado principalmente, por fatores de crescimento (TSUKASA, 2011). Os complexos mTORC1 e mTORC2 diferem em sua localização e na regulação, mas ambos são induzidos pela privação de nutrientes, estresse e redução da concentração de fatores de crescimento (TAN *et al.*,2016).

No complexo mTORC1, a proteína Raptor funciona como “scaffold protein” (KIM *et al.*,2002 e HARA *et al.*,2002 e TAN *et al.*,2016) ou seja, uma proteína cuja função principal é trazer outras proteínas em conjunto para que elas interajam. Já, a proteína PRAS40 atua como uma proteína de ligação que inibe a sinalização de mTORC1 nas células (SANCAK *et al.*,2007 e TAN *et al.*,2016). A estimulação da insulina, fosforila a via Akt ,logo PRAS40 suprime a fosforilação de mTORC1. Portanto, a insulina ativa mTORC1 através da regulação de RHEB, (“ativador” de mTORC1), e PRAS40, funciona como “inibidor de mTORC1”.

Sob condições ricas em nutrientes, mTORC1 participa do crescimento celular e suprime a autofagia. Já, em uma condição pobre em nutrientes, mTORC1 é inibido e a autofagia é induzida para fornecer fonte de energia para as células (KIM *et al.*,2002).

mTORC1 é um componente “chave” na autofagia. Quando as células estão privadas de aminoácidos (aa). HARA *et al.*,2016 demonstrou que ao retirar aa da cultura, a sinalização de mTORC1 é inativada em células de linhagem celular. Os aminoácidos (aa): leucina, arginina e glutamina, demonstram maior potência na ativação de mTORC1 (HAN *et al.*,2012; DURAN *et al.*,2012 e LORIN *et al.*,2013 e JEWELL *et al.*,2015) e que a regulação dos aa no mTORC1 é independente da via PI3K / Akt e TSC (HARA *et al.*,1998 e WANG *et al.*,1998), sugerindo que haja outro mecanismo de sensor alternativo em mTORC1. Conforme figura 1, os aa ativam mTORC1 através da regulação de Rag A/B e Rag C/D, portanto, são considerados como “ativadores” de mTORC1.

Conforme podemos observar na figura 1, mTORC1 participa na autofagia, inibindo a fosforilação do complexo ULK (Atg1), Atg13, Atg101 e FIP200 (GANLEY *et al.*,2009; HOSOKAWA *et al.*,2009; JUNG *et al.*,2009; KIM *et al.*,2011, NAZIO *et al.*,2013 e WARD *et al.*,2016). Além disso, a estabilidade e a atividade da proteína ULK1, também é inibida pela fosforilação e inibição de AMBRA1, através de mTORC1 (NAZIO *et al.*,2013). ULK1 regula a proteína Vps34 ou PIK3 que forma complexos moleculares com várias proteínas presentes na autofagia, incluindo Beclin1 e Atg14L, que desempenham papel importante na nucleação da autofagia (FUNDERBURK *et al.*,2010).

Dados da literatura demonstraram que a fosforilação de Beclin1 e ULK1 ativa Vps34, portanto, a inibição através de mTORC1, inibe a fosforilação de ULK1, corroborando para inibição da atividade de Vps34 na autofagia (JABER *et al.*,2012 e RUSSEL *et al.*, 2013). Além disso, mTORC1 ao fosforilar Atg14L inibe a atividade de Vps34 (YUAN *et al.*,2013). A inibição induzida por mTORC1 no complexo Vps34, age como um “freio” na ativação da autofagia e além de atuar nos principais componentes deste processo e ainda participa da

inibição de TFEB (fator de transcrição EB), regulando, portanto, a família Atgs para ativação da autofagia (SETTEMBRE *et al.*,2011 e 2012).

1.3 As vias de ativação e inibição de mTORC1

As células do nosso organismo recebem continuamente estímulos externos ou internos (insulina, fatores de crescimento e aminoácidos). Dentre os fatores de crescimento devemos destacar o IGF (Fator de crescimento semelhante à insulina 1) e a insulina que se ligam aos seus respectivos receptores celulares e permitem a ativação da via de sinalização PI3K/Akt. (LIPPAI *et al.*,2014).

Akt (*serine-threonine Kinase*), conhecida também como PKB (proteína quinase B), é uma proteína que possui 3 tipos de isoformas conhecidas como: Akt 1, Akt 2 e Akt 3. Todas isoformas são homólogas e possuem funções parecidas, porém, são ativadas de formas distintas (Chao *et al.*,2001),sendo Akt 1 e Akt 2 são as mais conhecidas e estudadas. Akt 1 está altamente expressa na maioria dos tecidos (JEFFREY *et al.*2015), inclusive testículo e timo (Chao *et al.*,2001), já, Akt 2 está presente no tecido adiposo e muscular (JEFFREY *et al.*2015). JUNTILLA *et al.*,2010 demonstraram que as proteínas Akt1 e Akt2 são expressas em células-tronco hemopoéticas (JUNTILLA *et al.*,2010).

No processo autofágico, a proteína Akt fosforilada, inibe o complexo TSC1 /2 (*tuberous sclerosis protein*), levando ao aumento de Rheb e, ativando, portanto, mTORC1 (figura 1) (INOKI *et al.*,2002; TEE *et al.*,2003 e WANG *et al.*,2008 e TAN *et. al.*,2016).Assim, Akt contribui para ativação do complexo mTORC1 para inibir autofagia em condições adequadas (ricas) em nutrientes, participando da ativação do complexo Ulk1 e bloqueando a interação de Ulk1 e AMPK (SHANG *et al.*,2011). Distintamente, mTORC2 influencia no metabolismo e sobrevivência celular por fosforilar Akt, na serina S473, permitindo que haja ativação de Akt por PDK1 (SENGUPTA *et al.*,2013 e TAN *et. al.*,2016)

Akt também fosforila PRAS40 e dissocia PRAS40 de Raptor, levando à ativação de mTORC1 (VOLKERS *et al.*,2013). Akt também fosforila e inibe a síntese de GSK 3 α / β (glicogênio-quinase), um inibidor da ativação de mTORC1 (INOKI *et al.*,2006). Dados da literatura demonstraram que Wnt inibe GSK3 da fosforilação por TSC2, independente da regulação de β -catenina e, portanto, estimula a via de mTORC1 (INOKI *et al.*,2006). Além disso, Akt inibe diretamente o complexo Vps34 PELA fosforilação de Beclin1 (WANG *et al.*,2012). Deste modo, Akt contribui na ativação de mTORC1 inibindo a autofagia.

Além da via PI3K/Akt/mTOR, a proteína ERK (*extracellular signal-regulated Kinases*), participa da inibição de TSC1/2 ATIVANDO Raptor (figura 2) e portanto também ativa mTORC1 (MA *et al.*,2005 ;CARRIERE *et al.*,2011). A proteína RSK1 (*Downstream* de ERK, p90 ribossômico S6 quinase 1) também inibe TSC 1/2 e ativa Raptor para ativar mTORC1 (LEE *et al.*,2007 e DHRINGA *et al.*,2013).

Além disso, a proteína IKK β , (*inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*) fosforila e inibe TSC1, ativando assim mTORC1 (figura 2) (TAN *et al.*,2016). IKK α também participa da ativação de mTORC1(DAN *et al.*,2014), portanto, há uma interação entre as vias de sinalização de mTORC1 e NF-kB (DHRINGA *et al.*,2013).

A inibição de mTORC1 é controlado pela proteína AMPK (*AMP-actived protein quinase*), (Figura 2) que funciona como um “sensor” para controlar os níveis de energia celular, modulando as vias metabólicas da autofagia e afetando dois importantes complexos de sinalização: a inibição de mTOR e a fosforilação direta por Ulk1(KIM, 2011), que por sua vez fosforila Atg13 e RB1CC1 / FIP200 (HARA *et al.*,2008) ativando portanto, a etapa de nucleação da autofagia.

AMPK é ativada por depleção de ATP decorrente do aumento de ADP e AMP, jejum ou baixas concentrações de glicose (MATSUI, 2008). O papel de AMPK na modulação da autofagia acontece PELA fosforilação direta da AMPK na proteína Raptor (MELEY,2006). Esta fosforilação é essencial para inibir a formação do complexo mTOR com Raptor e, portanto, a autofagia é disparada na célula. Ao mesmo tempo, ocorre a parada do ciclo celular ocasionado pelo estresse energético, sugerindo que a proteína Raptor participa da relação do estado energético da célula e o prosseguimento no ciclo celular pela mesma (MATSUI,2008).

1.4 Sinalização molecular da autofagia

Após estímulo como por exemplo, privação de nutrientes, há inibição de mTORC1, e, portanto, inibição da fosforilação do complexo (Ulk1, Atg101, Atg13 e FIP200), contribuindo para inibição do complexo (Beclin1, Atg14L, Vps34 e p150) (ZHOU *et al.*,2016).

Didaticamente podemos descrever o processo autofágico como tendo 4 etapas: a formação do fagóforo (nucleação e alongação), a complementação, a maturação e a degradação. Pela fosforilação das proteínas Atg13 e FIP200, inicia-se a etapa de nucleação e alongação do fagóforo (Figura 1).

A etapa de nucleação é regulada pelo complexo PtdIns3K que contribui na fosforilação de PI (fosfatidilinositol) para PI3P (fosfatidilinositol 3-fosfato). PI3P recruta

complexos proteicos e lipídicos para expandir a membrana do fagóforo. O PtdIns3K interage com o complexo PI3K ou Vps34 e Beclin-1, que possuem funções distintas. Já as proteínas UVRAG / Bif1 e ATG14 são encontrados no complexo Beclin-1 de uma forma específica (ZHOU *et al.*,2016).

Beclin1 tem um papel importante na iniciação da autofagia. Vários estudos apontam evidências de que Beclin1 é um substrato da caspase 3 que, quando ativada, há a clivagem de Beclin1 em dois sítios potenciais: TDVD e DQLD. Com a clivagem, Beclin1 perde sua capacidade de promover autofagia. O mecanismo da participação do fragmento C-Beclin1 no dano mitocondrial ainda requer mais pesquisas (WIRAWAN *et al.*,2010). Beclin 1 além de participar da iniciação do processo autofágico, também interage com a proteína Bcl-2. A família de proteínas Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) suprime autofagia, bloqueando a interação de Beclin-1 com o complexo de PI3K, inibindo, portanto, a formação do autofagossomos (ROMANOV *et al.*,2012).

Ainda na etapa de nucleação e alongação do fagóforo, os complexos ULK1/2 e Vps34 recrutam dois sistemas de conjugação de proteínas, principalmente na expansão da membrana do autofagossomo (Figura 1): sistema Atg5- Atg12-Atg16 e sistema LC3-fosfatidiletanolamina (PE) (ROMANOV *et al.*,2012). Atg12 é inicialmente ativada em uma reação à base de ATP com Atg7 (enzima E1-like) e, em seguida, conjugada com Atg5 por Atg10. Atg12 é uma proteína ubiquitina-like que pode conjugar-se covalentemente com Atg3 e Atg5, regulando dessa maneira apoptose e autofagia, respectivamente. Estudos recentes revelaram que a forma livre de Atg12 pode funcionar como um potente fator apoptogênico, em resposta a estímulos de morte de células diferentes e que Atg12 pode interagir com o anti-apoptótico Bcl-2, regulando assim a ativação de Bax e a permeabilização da membrana exterior (MOMP) (RUBINSTEIN *et al.*,2011).

Em seguida Atg16, se torna covalentemente ligado ao conjugado Atg12-Atg5, formando um complexo trimérico Atg12-Atg5-ATG16L1, que atua na formação da membrana. Quando o alongamento for concluído, os componentes do complexo se dissociam do autofagossomo e retorna para o citoplasma (LAMARK, 2009, ZHOU *et al.*,2015).

MAP1LC3 (*Mammalian Associated Protein Light Chain 3*) é modificada na segunda via de conjugação. A proteína LC3 foi descrita como uma subunidade (a cadeia leve 3 e das proteínas associadas à microtúbulos 1 A e 2 A (MAP1LC3) (CHEN, 2011)).

Existem 3 isoformas da proteína LC3 (LC3A, LC3B e LC3C) que são modificadas por processos pós-traducionais durante a ativação autofágica. A proteína Atg4B cliva 22 resíduos no C-terminal 22 do precursor LC3, produzindo LC3-I (citossólica) e quando o

processo autofágico é ativado, LC3 I, é clivado e tem uma lipidação com fosfatidiletanolamina por um sistema que envolve as proteínas Atg 7 e Atg 3, sendo então convertidas a LC3-II, e, portanto incorporada seletivamente na membrana do autofagossomo, com a ajuda do adaptador p62 /SQSTM1 via LIR (C-terminal ubiquitin-binding domain and LC3-interacting region) (CHEN *et al.*,2011 e ZHOU *et al.*,2016).

SQSTM1 (Sequestosome 1) é uma “scaffold protein”, constitutivamente expressa e entregue para autofagia, para degradação seletiva (etapa de degradação). A fusão com o lisossomo contribui com a degradação das proteínas presentes na autofagia, juntamente com o LC3-II associado a membrana interna dos autofagossomos,. Já a LC3-II presente na membrana externa do autofagossomo dissocia-se e é reaproveitada na reciclagem (PANKIV *et al.*,2007 e ZHOU *et al.*,2016). É importante ressaltar que não há presença do LC3 II no autofagolissomo, pois o mesmo é degradado pelo ambiente ácido e pelas enzimas lisossomais (TANIDA *et al.*,2008).

Este processo macroautofágico é não seletivo, entretanto, algumas organelas específicas só poderiam ser englobadas pelo autofagossomo através do reconhecimento das proteínas SQSTM 1/p62 durante o processo seletivo da autofagia (LAMARK, 2009).

Estudos recentes sugerem que o LC3 pode servir como um meio para facilitar ativação da apoptose através da caspase 8, uma vez que, o acúmulo de p62 e LC3 leva a agregação e auto-ativação de caspase-8, resultando em apoptose (YOUNG, TAKAHASHI, KHAN, 2012).Dados da literatura demonstram que, o envolvimento do Atg7 no LC3 é importante no processo autofágico, pois a proteína Atg7 é essencial para a formação do autofagossomo (ZHANG, 2009), participando do processo de auto-renovação da célula-tronco hemopoética e da diferenciação de progenitores, principalmente na linhagem granulocítica (JUN-LIN, 2013).

Outros dados relatam que o Atg 7 modula a proteína p53, controlando seu papel no ciclo celular. Portanto, se a célula tiver o Atg 7 deletado, o ciclo celular não terá progressão (LEE, 2012). A proteína p53 participa do reparo do DNA, na parada do ciclo celular, senescência e modulação da autofagia, portanto p53 ativado, acarreta em ativação de AMPK e inibição do mTOR, disparando o processo autofágico (LAM,2007).

Um processo autofágico progressivo sob determinado ambiente e/ou tecido, é prejudicial e pode substituir a apoptose no processo de indução de morte celular. Portanto, é importante diferenciar autofagia e as adaptações “citoprotetoras” celulares, e também se esse processo autofágico “citoprotetor” se transforma em autofagia “citotóxica” (DENTON *et al.*,2012 e SHEN *et al.*,2011).

1.5 Autofagia na célula-tronco hemopoética

1.5.1 Conceito de célula-tronco hemopoética (CTH)

A homeostase do sistema sanguíneo é sustentada pelas células-tronco hemopoéticas (CTHs) e células-tronco progenitoras (CTPHs), que são encontradas principalmente dentro de um microambiente ou nicho da medula óssea (MO). As CTHs encontram-se no topo da "hierarquia hemopoética" devido à sua capacidade de diferenciação multipotente e capacidade de autorrenovação.

As CTHs de origem mesodérmica, possuem a capacidade de multi-potência e auto-renovação. Multi-potência é a capacidade de se diferenciar em todas as células sanguíneas funcionais. Auto-renovação é a capacidade que a CTH dá origem a CTHs filhas idênticas sem diferenciação. Como as células sanguíneas maduras são predominantemente de curta duração, CTH fornece continuamente progenitores mais diferenciados, mantendo a manutenção destas células ao longo da vida, equilibrando precisamente auto-renovação e diferenciação (SEITA, 2010).

A purificação e caracterização das CTHs na medula óssea de camundongos, pode ser feita, utilizando-se técnicas de citometria de fluxo com "sorting" ou por método imunomagnético, sendo identificadas e isoladas, por citometria de fluxo e demonstram um fenótipo de Thy-1^{low} (CD90), Lin⁻ (marcadores de linhagem⁻) e Sca1⁺ (*stem cell antigen -1*) e c-kit⁺ (*receptor tyrosine kinase protein*) e representam aproximadamente 0,05% das células de MO de camundongos adultos (SPANGRUDE *et al.*,1988 e WEISSMAN *et al.*,2010 e CAO *et al.*,2014).

As células-tronco hemopoéticas podem ser classificadas em três tipos: células-tronco "long-term" (LT-CTH), células-tronco hemopoéticas "short-term" (ST-CTH) e célula-tronco progenitora hemopoética (CTPH).

AS CTH *long term* (LT) possuem um grau de auto-renovação superior e, podem manter o sistema hemopoético a longo prazo em camundongo irradiado letalmente, as CTHs *short term* (ST) possuem capacidade mais limitada de auto-renovação, ou seja, a reconstituição no tecido hemopoético acontece por um curto período de tempo, e podem repovoar as populações de células linfóides e mielóides por algumas semanas. A célula-tronco progenitora hemopoética (CTPH), uma população de células que perdeu a

capacidade de auto-renovação da CTH (MORRISON *et al.*,1994; CHALLEN *et al.*,2009;WEISSMAN *et al.*,2010) .

Conforme figura 2, as CTHs inicialmente dão origem ao progenitor multipotente (célula-tronco progenitora hemopoética-CTPH), que já não possuem a capacidade de auto-renovação (CHRISTENSEN, 2001). Acredita-se que a hemopoese é suportada pela as CTPHS, que proliferam e diferenciam-se em células sanguíneas maduras CTPH (figura 3) se comprometem para progenitores oligopotentes sendo eles, o progenitor linfóide (PL) (SERWOLD, 2001) e o progenitor mielóide (PM) (AKASHI, 2000 e WEISSMAN *et al.*,2010). Esses progenitores oligopotentes dão origem a todas as células efetoras do sistema hemopoético. Os progenitores mielóides se diferenciam para progenitores megacariocíticos e eritrócitos (PEM) e também progenitores granulócíticos e macrófagos (PGM) (PRONK *et.al.*,2007) , já o PL se diferenciam para células T, B e NK(*natural killer*).

1.5.2 Microambiente e sinais moleculares para célula-tronco hemopoética.

O nicho das células-tronco consiste de uma matriz celular, de uma matriz extracelular e fatores ambientais solúveis em locais específicos. Os componentes que contribuem para o nicho das células-tronco podem ser classificados em: (i) fatores solúveis secretados pelas células-tronco ou células de nicho, presente nos meios de cultura ou em torno do tecido, (ii) da MEC ou uma célula de substrato, (iii) interação célula-célula para indução de sinais celulares. (ZHANG *et.al.* 2011).

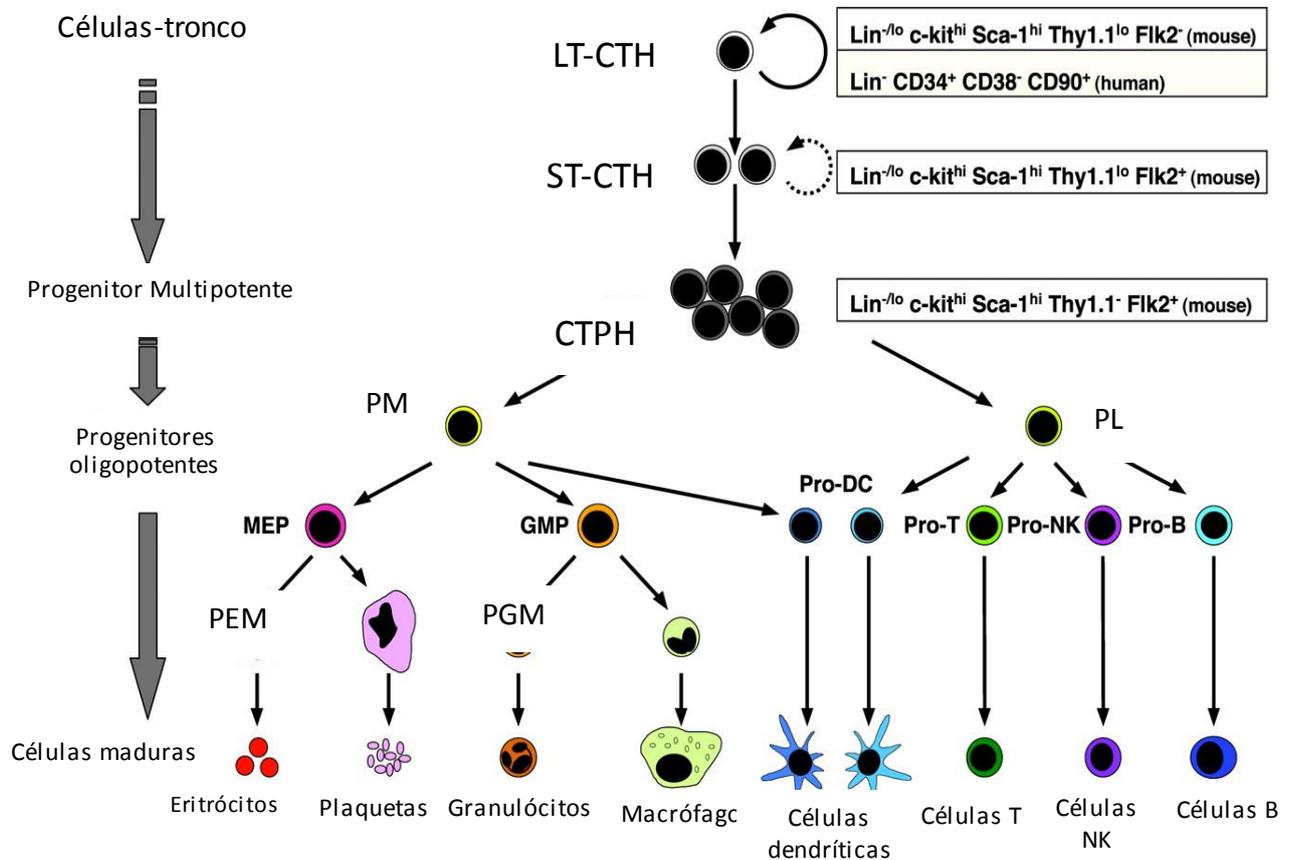


Figura 2: CTH é definida como uma célula que possui a capacidade de auto-renovação e potencial de dar origem a todas as células do sistema hemopoético (multi-potência). Durante a diferenciação, uma CTH perde sua capacidade de auto-renovação, perdendo, portanto o potencial da sua linhagem, uma vez que obriga a torna-se uma célula funcional madura de uma determinada linhagem. No sistema de camundongos, temos as populações de CTH (LT) e (ST) e CTPH, que por sua vez se compromete para progenitores PM e PL. CTH: célula-tronco hematopoética LT: CTH long term; ST: célula-tronco hematopoética short-term; CTPH: célula –tronco progenitora hematopoética; PL progenitor linfóide; PM: progenitor mielóide; PEM: progenitor megacariocítico/eritrocítico; PGM: progenitor de granulócito/macrófago; Pro-DC: células dendríticas; Pro- NK: natural Killer; Pro-T: linhagem de células T; Pro-B: linhagem de células B. **Fonte modificada:** (PASSEGUÉ *et al.*,2003).

O microambiente celular e molecular regula a função das CTHs na medula óssea (WILSON, 2006). Isso inclui o controle do equilíbrio entre a divisão, auto-renovação, quiescência, bem como a decisão das linhagens celulares. Os sinais derivados do nicho regulam a função da CTH em conjunto com mecanismos autônomos das células, sendo essa interação de CTH com nicho, uma união estável, dinâmica e flexível. (EHNINGER *et al.*,2011). Nichos não são apenas essenciais para o controle da função da CTH durante a homeostase, mas também são fundamentais em resposta ao estresse. (LANDER *et*

al.,2012). Estresse na medula óssea pode ser induzido por hemorragia, perda de células devido a substâncias tóxicas, inclusive agentes quimioterápicos, radioterapia, infecções e neoplasias. Além disso, infecções bacterianas ou virais e as respostas inflamatórias têm um efeito significativo na CTH e, portanto susceptíveis também aos seus nichos (TRUMPP *et.al.*,2010).

Durante a homeostase uma pequena população de CTH é mantida em estado de quiescência (dormência), por exemplo, em resposta ao estresse, os sinais do nicho ativam estas células de modo que elas possam estar envolvidas no processo de reparação após uma lesão ou dano (WILSON *et al.*,2008 e KING *et al.*, 2011). CTHs em quiescência e/ou ativadas são preferencialmente encontradas na região trabecular dos ossos longos. No entanto, existe um grande debate sobre a localização mais detalhada das CTHs dentro da medula, que contém tanto na região endosteal perto dos osteoblastos (nicho endosteal ,CTH em quiescência e/ou em auto-renovação) ou em um nicho vascular (CTH em proliferação/diferenciação), localizada em torno de pequenos vasos sanguíneos sinusoidais associados com vários elementos do estroma (PARK *et.al.*,2012).

Durante os últimos anos têm sido proposto, um número cada vez maior de tipos celulares que regulam a função da CTH. Estas incluem osteoblastos, osteoclastos, macrófagos, células-tronco mesenquimais (CTMs), e, finalmente, as células endoteliais associadas com receptor de leptina expressos em células estromais. As células osteoblásticas foram as primeiras células identificadas como um componente do nicho da CTH (EHNINGER *et.al.*,2011).

Portanto, vários tipos de células cooperam para sinalização, controle, destino, função e manutenção da CTH, contribuindo, assim, para a formação do complexo CTH-nicho. Estes pares de sinais x receptores, sendo eles: SCF/KIT; CXCL12/CXCR4, TGF- β /TGF β RII, Ang-1/Tie2 e trombopoietina/MPL contribuem para “fine tuning”, (um fino ajuste) sobre as CTHs (WILSON *et.al.*,2006; YAMASAKI *et al.*,2011).

1.5.3. Como a autofagia participa no processo de auto renovação e diferenciação da CTH?

O processo de auto-renovação e diferenciação da CTH ocorre sob rigoroso controle,para que se mantenha o remodelamento celular, envolvendo grande quantidade de proteínas, degradação lisossomal de organelas danificadas e “turnover” de macromoléculas, que são essenciais para preservar, a pluripotência das células-tronco de longa duração

(*long term*) durante os longos períodos de quiescência. (PHADWAL, 2013). Esse processo é controlado pela integridade das proteínas e organelas intracelulares e, caso as mesmas estejam danificadas, ocorre a remodelação destes componentes estruturais.

A autofagia participa na manutenção e auto-renovação das células-tronco e participa no equilíbrio da quiescência, auto-renovação e diferenciação em condições fisiológicas ou sob condições de estresse (VESSONI, 2012). A remoção rápida e eficiente dos fatores de transcrição, enzimas e moléculas de adesão pode ser eficientemente realizada por autofagia, sendo esta uma grande vantagem tanto para renovação e como para a diferenciação (LUM, 2005). Por exemplo, mitofagia (autofagia das mitocôndrias) é essencial para preservar a '*stemness*' ou pluripotência das células-tronco embrionárias *in vitro* em culturas de longo prazo, resistindo a danos genéticos e / ou mitocondriais (TODD, 2010).

As CTHs são as mais estudada das células-tronco no organismo, devido ao acesso relativamente fácil para sua obtenção, quer da medula óssea, quer do sangue, associado ao fato de que o sistema hemopoético é razoavelmente bem conhecido, ocorrendo de forma hierárquica em que um pequeno número de células-tronco "*long term*", originam as diferentes linhagens hemopoéticas (COLLER, 2006; FRANKEL, 2011). Existem muitos estudos que investigaram autofagia em CTHs, mas pelo menos um deles tem indicado que a autofagia é altamente ativa em CTHs de humanos.(ref) Em CTH de camundongos, a autofagia é induzida após a retirada de citocinas *ex vivo* e *in vivo* em uma restrição calórica, através da transcrição de FOXO 3 (SALEMI *et al.*, 2012; WARR *et al.*, 2013).

A família de fatores de transcrição FOXO (do inglês *forkhead box O*), é responsável por regular o ciclo celular, promover reparo do DNA, regular a diferenciação celular, ativar apoptose e proteger as células quiescentes do estresse oxidativo (OCHOCKI e SIMON, 2013 e TOWER, 2012). O grupo FOXO é formado por quatro membros que são FOXO1, FOXO3A, FOXO4 e FOXO6 que são ativados em resposta ao estresse oxidativo (LI *et al.*, 2011). As proteínas FOXO são inativadas pela fosforilação através das vias PI3K-Akt. A ativação da via PI3K-Akt resulta na exclusão da proteína FOXO do núcleo da célula, afetando, portanto, a diminuição da quiescência e da auto renovação das CTHs e,consequentemente, aumento da diferenciação e elevação dos níveis de EROS (WEISS e ITO, 2014).

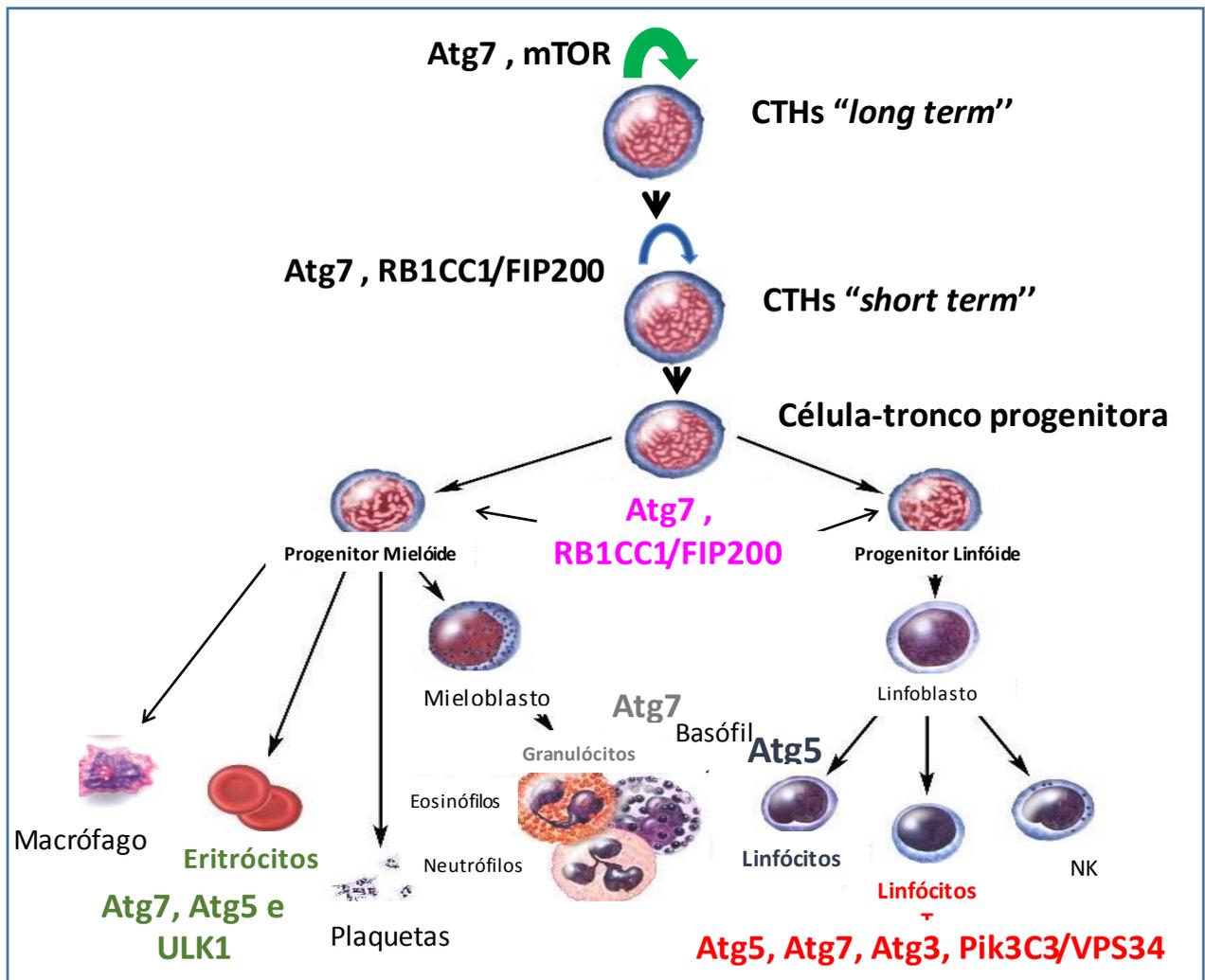


Figura 3: A autofagia em "stemness", ou seja, uma propriedade de um determinado gene ou genes cuja expressão pode ocorrer tanto no potencial de auto-renovação ou o potencial para diferenciação de multilinhagens da CTH. Em seta verde, CTH "long term", em seta azul, CTH "short term", e célula-tronco progenitora multipotente. Logo após esse processo começa a diferenciação em diferentes células sanguíneas; entre elas: eritrócitos, plaquetas, granulócitos e linfócitos T, B e NK. A autofagia desempenha um papel importante na auto-renovação e quiescência de CTHs e também na diferenciação, pluripotência e remodelação das células sanguíneas.. **Fonte modificada:** JUN-LIN, 2013

As células-tronco permanecem por longos períodos de tempo na fase G_0 do ciclo celular (quiescentes) a espera de sinalizações para reentrar no ciclo celular e auto-renovar-se ou diferenciar-se em células progenitoras (COLLER, 2006). A autofagia, presumivelmente, desempenha um papel significativo na eliminação de macromoléculas danificadas, o que pode causar a perda de quiescência (FRANKEL, 2011), sendo que essa regulação da quiescência ocorre através da via PtdIns3K-mTOR.

No processo de diferenciação e auto-renovação da CTH é necessário um grande controle do "turnover proteico" e da digestão lisossomal de organelas (ZENG, 2008) e a autofagia, como um processo catabólico, controla "turnover" das proteínas via regulação mTOR e possibilita a detecção de alterações no meio ambiente (hormônios, citocinas e

concentração de aminoácidos) possibilitando a "remodelação" das células-tronco, ou seja, a proteína mTOR participa da manutenção da CTH e sua ativação depende de fatores de crescimento e nutrientes, tais como: carboidratos e aminoácidos.

No sistema hemopoético, mTORC1 (figura 3), desempenha dupla função na manutenção da CTH. CHEN *et al.*, 2008, demonstraram que a deleção de TSC1 em CTHs leva à perda da quiescência através do aumento da biogênese mitocondrial e produção de EROS (espécies reativas de oxigênio). Além disso, a hiper-ativação de mTOR em CTHs por citocinas inflamatórias ocasiona alterações na hematopoese (CHEN *et al.*, 2010). Já, em modelo murino *knockout* para mTOR e Raptor, demonstrou-se alterações na hematopoese e diminuição da capacidade das CTHs em repovoar o tecido medular (KALAITZIDIS *et al.*, 2012), ou seja, mTOR precisa atuar nas CTHs em níveis específicos, portanto precisa ter um equilíbrio entre a ativação e inibição.

As proteínas Akt e mTORC1 interferem nas respostas metabólicas das CTHs quando em situações de privação de nutrientes, fatores de crescimento e baixos níveis de oxigênio. A ativação do Akt favorece o metabolismo celular através da absorção de glicose e também no metabolismo oxidativo mitocondrial. Assim, a sinalização de Akt é regulada positivamente (*up regulation*) na biogênese mitocondrial e a sinalização de mTORC1 é regulada negativamente (*down regulation*) por hipóxia (CALAUTTI, 2013).

Além dos sensores de nutrientes, é importante ressaltar sobre os sensores de energia, que também participam na manutenção das CTHs, como: AMPK e LKB1 (Figura 2). AMPK atua como um "sensor" controlando os níveis de energia celular, modulando as vias metabólicas da autofagia e afetando dois importantes complexos de sinalização: a inibição de mTOR e a fosforilação direta por Ulk1, contribuindo para inibição da autofagia (KIM, 2011).

AMPK também é ativada por depleção de ATP, decorrente do aumento da ADP e AMP, privação de nutrientes ou baixas concentrações de glicose (MATSUI, 2008). Existem duas unidades catalíticas da AMPK: PrKaa1 e PrKaa2 que são altamente expressas em CTHs, porém NAKADA *et al.*, 2010, demonstrou, em modelo murino *knockout* para essas duas unidades, que as CTHs foram capazes de repovoar o tecido medular em camundongos irradiados, ou seja, a proteína AMPK não possui uma função específica nas CTHs.

Já a proteína LKB1, possui a função de manter os níveis de energia celular (razão ATP/AMP) e ativar a fosforilação da AMPK, quando há diminuição na proporção de ATP/AMP celular (SHAW, 2004). Quando LKB1 é deletado em CTHs murinas, há aumento da morte celular e também da proteína LC3-II em células da medula óssea, do timo e do

baço (GURUMURTHY,2010). Embora os níveis de LC3-II não tivessem sido avaliados na presença de inibidores lisossomais, o tratamento com cloroquina, um inibidor autofágico, acelerou a morte celular de CTHs nos camundongos *knockouts* para LKB1, sugerindo que a autofagia ajuda a resgatar CTHs na ausência de LKB1.

Dados da literatura demonstram, que além da autofagia, os miRNAs também regulam a proliferação, sobrevivência e diferenciação da CTH (O'CONNELL et al.,2008). Tem sido demonstrado que o miR-17, 20, 93 e 106 são expressos abundantemente em camundongos e células progenitoras hemopoéticas humanas e sua expressão diminui durante a diferenciação mielóide (MEENHUIS,2011).

1.5.4 A importância da proteína Atg 7 na CTH

A proteína Atg7 participa no processo de auto-renovação da CTH (Figura 3) e diferenciação dos progenitores mielóide e linfóide (JUN-LIN, 2013).

Estudos demonstraram que a diferenciação das CTHs e manutenção das linhagens hemopoéticas são afetadas pela perda de autofagia. Estudos em camundongos com *Atg5*^{-/-} no fígado fetal, resultaram em redução da população de linfócitos T, devido à apoptose de células T CD8⁺ e uma incapacidade de proliferação quando induzida por TCR (receptor de células T), sugerindo, um papel importante da autofagia na sobrevivência e função celular de linfócitos T. Estes camundongos também demonstraram redução do número de timócitos e linfócitos B, sugerindo a importância do *Atg5* na proliferação homeostática de linfócitos (PUA,2007). Do mesmo modo, PHADWAL *et al.*, 2012, demonstraram que a ausência de *Atg7* no sistema hemopoético, levou a um defeito na remoção de mitocôndrias em eritroblastos, e os animais apresentaram anemia grave e progressiva (MORTENSEN,2011).

Além disso, foi demonstrado que *Atg7* tem um papel não redundante na função de diferenciação das células-tronco hemopoéticas e na proliferação mielóide (MORTENSEN, 2011). Em ensaios clonais, células-tronco de camundongos *Atg7*^{-/-} foram capazes de formar colônias de progenitores, mas não de CTH, sugerindo um defeito na auto-renovação. Camundongos irradiados depletados de células: Lin⁻ Sca⁺ c-kit⁺⁺, (LSK), receberam, população de progenitores celulares, obtidos de camundongos *Vav-Atg7*^{-/-}, porém morreram em poucas semanas, logo após o transplante, não havendo repovoamento adequado que sugere que a autofagia é indispensável para a função normal de CTH (LIU, 2010). Os camundongos *Atg5*^{-/-}, tiveram redução significativa de progenitores linfóides na medula óssea (MO) e linfopenia. Embora os camundongos *Vav-Atg7*^{-/-} demonstrassem uma expansão inicial total do compartimento LSK, a população de verdadeiras CTHs (LSK,

CD150,⁺ CD48⁻) foi significativamente reduzida. Esses camundongos desenvolveram mieloproliferação e faleceram de insuficiência medular ao final de 12 semanas, concluindo-se que a autofagia é essencial para a auto-renovação, proliferação e bom funcionamento das CTHs (LIU,2010).

1.5.5 Autofagia e transglutaminase 2

A Transglutaminase 2 (TG2) é uma proteína de múltiplas funções que é regulada positivamente pelo cálcio (Ca^{2+}) e negativamente pela GTP (guanossina 5' trifosfato) (ECKERT et al.,2014).

A atividade da TG2 é regulada pelo Ca^{2+} que permite a exposição do sítio catalítico e induz TG2 a catalisar e promover a reticulação da MEC (matriz extracelular) e estabilidade da mesma, também pode interagir com a fibronectina e colágeno, permitindo a adesão da célula à MEC, via integrinas. Essa adesão permite a posição e regulação da migração celular, portanto, a TG2 é uma proteína “chave” para preservar a polaridade celular, angiogênese, remodelação óssea e regulação da proliferação celular (BAEK et al.,2001).

A TG2 possui 2 isoformas (TG2-L) que participa na sobrevivência celular e (TG2-S) que tem como função pró-apoptótica, ambas isoformas funcionam como splicing alternativo e exercem diferentes efeitos sobre a sobrevivência e diferenciação celular dependendo do estímulo(ECKERT et al.,2014).

A proteína TG2 pode ser localizada em diversas organelas, tais como: núcleo, mitocôndria e retículo endoplasmático rugoso, sob condições fisiológicas,mas não é uma localização estável,uma vez que diferentes localizações ou diferentes quantidades de TG2 podem ser observadas dependendo do estímulo de estresse ou atividade celular, particularmente, a TG2 pode ser encontrada em grandes quantidades em células endoteliais, fibroblastos,macrófagos e monócitos. Não há dados na literatura demonstrando a importância e ou participação da TG2 na célula-tronco hemopoética (BUDILLON *et al.*,2013)

TG2 pode ter como função efetora nas modificações que controlam a expressão gênica, processos de condensação cromossômica e doenças, também pode influenciar a proliferação de células cancerígenas pela ativação de vias de sobrevivência ou pela inibição da apoptose e autofagia (HUANG *et al.*,2014)

Dados da literatura demonstram envolvimento da TG2 em doenças degenerativas como Doença de Huntington, Doença de Parkinson e insuficiência cardíacas. Autofagia possui função importante na patogênese de todas essas doenças descritas acima, sugerindo, portanto a participação da TG2 na “self-digestion”.

Estudos em camundongos TG2-/- são afetados e desenvolvem isquemia devido a redução da atividade mitocondrial (12). Outros estudos demonstram que a TG2 é necessária nos últimos estágios do processo autofágico, ou seja, na maturação do autofagossomo (D'ELETTO *et al.*,2009).

1.6 Autofagia e Desnutrição

1.6.1 Conceito de Desnutrição

A desnutrição afeta, mundialmente, 815 milhões de indivíduos sendo considerada, ainda hoje, como um problema de saúde pública (WHO, 2017), sendo que 489 milhões de pessoas vivem em países afetados por conflitos. A desnutrição esta associada ao aumento da morbidade e mortalidade dos indivíduos e é considerada a segunda causa de morte em crianças que possuem menos de cinco anos (122 milhões) em países que se encontram em desenvolvimento e ou países em conflitos (FAO, 2017).

A desnutrição é definida como um desequilíbrio entre a oferta de nutrientes e de energia e a demanda necessária para a manutenção da homeostase do organismo (WHO, 2013). Embora o termo defina tanto a falta (subnutrição) quanto o excesso de nutrientes, geralmente é utilizado para indicar carência proteica ou proteica energética, mas também pode estar associada à carência de micronutrientes (vitaminas e/ou minerais). A quantidade e o tipo de macro e/ou micronutrientes necessárias para o adequado equilíbrio metabólico são determinados pela idade, massa corpórea, nível de atividade física e condição fisiológica do indivíduo (FAO, 2015).

A desnutrição poder ser encontrada em crianças hospitalizadas (CARVALHO-SALEMI *et al.*,2018),idosos hospitalizados (SHARMA *et al.*,2017), pacientes com paralisia cerebral que apresentam desnutrição grave (MELUNOVIC *et al.*,2017), pacientes com presença de cirrose hepática, sendo que estes indivíduos apresentaram uma maior progressão da doença, quando os mesmos estavam desnutridos (LI *et al.*,2017) ,crianças com desnutrição grave com comprometimento na função cardíaca (OBONYO *et al.*,2017), pacientes hospitalizados com doença de Parkinson (SHIFDAR *et al.*,2016) e pacientes desnutridos com doenças inflamatórias intestinais (MOLNAR *et al.*,2016). A desnutrição contribui significativamente para o resultado adverso dessas condições, assim como as intervenções farmacológicas que afetam a estimulação do apetite nesses pacientes hospitalizados, com a presença de efeitos colaterais consideráveis. Portanto, a terapia nutricional é importante para combater a nutrição inadequada, encontrada nesses pacientes (SCHUTZ *et al.*,2014).

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

Estas síndromes podem cursar com retardo no crescimento, alterações psico-motoras e alterações morfológicas e funcionais acentuadas em diversos órgãos e sistemas do corpo como coração, pulmões, trato gastrointestinal, fígado, rins e sistemas endócrinos e imunológicos (De ANGELIS, 1986; AUGUSTO, 1995; ROBBINS *et al.*, 2010).

A restrição proteica e proteico-energética modificam as respostas fisiológicas do organismo, predispondo o indivíduo a processos inflamatório/infecciosos em decorrência do comprometimento de processos celulares como proliferação, diferenciação e morte celular. A desnutrição pode afetar, diferentemente, distintos tecidos. A elevada e constante necessidade de proteínas por parte do tecido hemopoético faz com que seja comum o encontro de alterações hematológicas como anemia e leucopenia, linfopenia e neutropenia, refletindo o comprometimento dos órgãos linfo-hemopoéticos em condições de desnutrição (BORELLI *et al.*, 2009; OZKALE & SIPAHI, 2014).

A restrição protéica modifica as respostas fisiológicas podendo induzir lesão celular. Contudo, existem diferenças na extensão e no tipo da lesão: tecidos que exibem elevados “turnover” de proteínas e nutrientes, como o sistema hemopoético, são primeiramente afetados em relação aos que apresentam baixo “turnover” (BORELLI, 2004). Portanto, mecanismos envolvidos com a proliferação, diferenciação e morte celular podem alterar-se na desnutrição, afetando diferentemente os distintos tecidos do organismo (DEO *et al.*, 1975; WATERLOW, 1996).

1.6.2 Desnutrição e Hemopoese

O tecido hemopoético como todos os outros tecidos que apresentam alta taxa de renovação e proliferação celular, requer uma variedade de nutrientes e pode ser alterado por deficiência nutricional (BORELLI, 2004; BORELLI *et al.*, 2009; XAVIER *et al.*, 2007). A produção de células sanguíneas depende de um microambiente hemopoético adequado, estrutura organizada que regula a fisiologia da célula tronco hemopoética (BORELLI *et al.*, 2004; COWLING & DEXTER, 1995; McKENNA & COTTER, 1997).

A hemopoese ocorre em regiões histo-anatômicas específicas denominadas de microambientes, que regulam a fisiologia da CTH e de células progenitoras que permitem a formação das diferentes linhagens sanguíneas. (BORELLI, *et al.*,2004; EVANS *et al.*, 1991).

Este microambiente é constituído por células sanguíneas em diferentes estágios de maturação, células estromais (células reticulares, macrófagos, fibroblastos, adipócitos), por uma matriz extracelular (MEC), formada principalmente por fibronectina (FN), laminina (LN), colágeno, proteoglicanos (PG), ácido hialurônico e por substâncias solúveis (BRACH e HERMANN, 1991; MAYANI *et al.*, 1992; ABOUD e LICHTMAN, 2001), apresentando-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica que, além de fornecer o parênquima de sustentação para as células hemopoéticas, permite um “ambiente bioquímico” fundamental para a proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (BORELLI *et al.*, 2004 ;MAYANI *et al.*,1992; OPAS, 1994; ABOUD e LICHTMAN, 2001).

A implantação da CTH é dependente de migração intramedular seguida de retenção seletiva em nichos endosteais específicos (NILSSON, 2001), sendo que a interação das células primitivas com o estroma depende da presença de proteoglicanos (PG) na MEC secretados pelas células estromais (MAYANI, 1992). Proteoglicanos associados à membrana celular podem interagir com outros componentes da MEC como FN, constituindo um sistema de regulação da proliferação celular (TAVASSOLI e MINGUELL, 1991).

Mais recentemente, a partir da caracterização imuno-histoquímica e ultra-estrutural dessas alterações evidenciou-se aumento na deposição de FN na medula óssea esternal de animais desnutridos especialmente em sítios endosteais/paratrabeculares (regiões de fixação de células tronco hemopoética) e aumento na deposição de LN, particularmente em regiões perisinusais (XAVIER *et al.*,2007). Tais alterações podem modificar a co-localização de uma série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de crescimento e diferenciação de células hemopoéticas (BORELLI *et al.*, 1995, 2001, 2007 e 2009; KLEIN, 1995; VITURI, 2000). Os mecanismos que levam a estas alterações ainda não foram elucidados, mas, considerando que as moléculas da MEC estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação, diferenciação e migração das células hemopoéticas exercendo desta forma controle sobre a hemopoese medular, estas alterações podem ser significativas para a fisiologia do tecido (BORELLI, *et al.*, 1995; VITURI, *et al.*, 2000; XAVIER, *et al.*, 2007).

Dados da literatura apontam que nos indivíduos desnutridos, há diminuição de componentes da MEC no fígado, porém, a relação proteica/tecido não apresentou diferença significativa, sugerindo que a causa tenha sido a infiltração gordurosa com esteatose hepática. (AXELLSON *et al.*,1990). Outros trabalhos relataram que há presença de

mineralização óssea na desnutrição, inferindo que a mesma leva à síntese de proteoglicanos (PG) de peso molecular mais elevado acarretando inibição da calcificação (TAVASSOLI e MINGUELL, 1991).

Estudos no nosso laboratório tem demonstrado na desnutrição proteica, hipoplasia de medula óssea (MO) de camundongos (BORELLI *et al.*, 1995, 2001, 2007) com evidências histológicas de alteração da MEC e comprometimento da célula-tronco hemopoética, com diminuição e/ou perda de proliferação celular afetando a granulopoese (BORELLI *et al.*, 2009), o qual contribuiu para a leucopenia encontrada (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995), linfocitopenia (AUGUSTO, 1995; BORELLI *et al.*, 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI *et al.*, 1995; 2007 BARON, 1997), encontrou-se também alterações na proporção de proteínas, especialmente de fibronectina, trombospondina e laminina na MEC situação que poderia estar contribuindo para a hipoplasia observada na medula óssea (BORELLI *et al.*, 2009; XAVIER *et al.*, 2007).

Outros dados que contribuíram para a hipoplasia medular foram à redução significativa do número de célula-tronco/progenitora hemopoética (CTPH) em camundongos desnutridos e aumento destas células na quiescência (NAKAJIMA *et al.*, 2014). Há também redução da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular e aumento da expressão de proteínas inibitórias p21 e p27 (NAKAJIMA *et al.*, 2014).

1.6.3 A participação da autofagia na desnutrição

Desequilíbrios nutricionais como desnutrição ou privação de nutrientes, podem ativar a autofagia, processo catabólico regulado pela via de sinalização de PI3K/Akt/mTOR. Evidenciamos alterações nas proteínas Akt e mTOR que contribuíram para o aumento da expressão autofágica na medula óssea (BELTRAN, 2013).

A autofagia pode ser estimulada por desequilíbrios nutricionais e metabólicos, como por exemplo: privação de nutrientes ou jejum prolongado. Quando o fornecimento de nutrientes se torna insuficiente, a autofagia é ativada. Exemplo clássico desse processo é o que ocorre no fígado de mamíferos, que degrada proteínas através da autofagia a fim de produzir aminoácidos para gliconeogênese (RABINOWITZ, 2010).

No entanto, mesmo sob condições adequadas de nutrientes, a autofagia é necessária a fim de permitir que as células removam estruturas celulares defeituosas. Há poucos trabalhos relatando sobre a interação desnutrição-autofagia. Yan, 2012 demonstrou através da privação do aminoácido leucina, que a proteína específica para autofagossomo (Atg14) é removida pelo citosol em um meio rico de nutrientes e sua expressão na presença

de um meio privado de nutrientes é inibido. Já KANG *et al.*, 2008, utilizaram *C. elegans* como modelo de estudo e evidenciaram que durante a restrição alimentar, níveis fisiológicos de autofagia, promove a sobrevivência de *C. elegans*, mas quando estes níveis são insuficientes ou em excesso, o mesmo direciona-se para o mecanismo de pró-morte. Embora o processo de autofagia seja vital para manter a sobrevivência das células, ela em excesso levaria a um tipo de morte celular autofágico programado, visto que autofagia também tem fatores pré-apoptóticos (Fan e Zong, 2012).

Autofagia em nosso modelo de desnutrição proteica poderia ser inicialmente um mecanismo de sobrevivência, observamos uma relevante expressão autofágica nas células totais de medula óssea (BELTRAN, 2013) e com base nas alterações encontradas nas CTHs, avaliaremos estas células em modelo *Knockout* para o gene *Atg7* frente a desnutrição proteica para concluirmos se autofagia é benéfica ou não para a medula óssea.

2. OBJETIVO E JUSTIFICATIVA

Em virtude do exposto e considerando os resultados anteriores de nosso grupo evidenciando que a desnutrição proteica leva a comprometimento da hemopoese, alterações no ciclo celular das células-tronco progenitoras e hipoplasia medular com pancitopenia periférica, que poderia ser decorrente do aumento da atividade autofágica, nos propomos, neste projeto, avaliar a participação da autofagia na CTH e CTPH em camundongos C57BL/6J e camundongos knockout para o gene *Atg7* submetidos à desnutrição proteica e camundongos TG2 submetidos à privação de nutrientes por 24 horas (*starvation*).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

3.1.2 C57BL/6J

Foram utilizados camundongos C57BL/6J, machos, 2 a 3 meses de idade, oriundos de colônias do biotério de Produção e Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA 337).

3.1.3 TG2

Para obter camundongos TG2^{-/-} expressando GFP-LC3 (TG2^{-/-} GFP-LC3) foram utilizados cruzamentos de C57Bl/6 TG2^{-/-} com C57Bl/6 GFP-LC3. Os camundongos TG2^{+/+} e TG2^{-/-} GFP-LC3 machos, dois meses de idade. No delineamento experimental separamos os camundongos em 4 grupos, conforme abaixo:

- 1) TG2^{-/-} (KO) sem privação, considerado como **KO time 0**
- 2) TG2^{-/-} (KO) com privação, considerado como **KO starvation**
- 3) TG2^{+/+} (WT) sem privação, considerado como **WT time 0**
- 4) TG2^{+/+} (WT) com privação, considerado como **WT starvation**

Todos os camundongos foram oriundos de colônias do biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Medicina da Universidade de Roma, Itália. E aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da Universidade de Roma, "Tor Vergata", Itália.

3.1.4 CAG-CreER

Foram utilizados camundongos CAG-CreER (TgCAGGCreER JAX, nº004682), sendo CRE a recombinase viral capaz de quebrar sequenciais lox, sob o controle do CAG e ER o receptor de tamoxifeno (TAM) e Atg7^{flox} (KOMATSU et al.2005), que tem o gene Atg 7 flanqueado por sequenciais lox, ou seja, irá induzir a migração nuclear de complexos CreER, o que possibilita que as células destes camundongos respondam ao tamoxifeno. Tamoxifeno possui afinidade com o receptor de estrógeno. Além disso, os camundongos são YFP/YFP (JAX, nº 006148), ou seja, foi construído um cassete PGK-neo floxeado e um gene de proteína fluorescente amarelo EYFP (Enhanced Yellow Fluorescent Protein Gene) que foi inserido no locus Gt (Rosa/26 Sor) através de recombinação homóloga. O cassete neo floxeado contém uma sequência de parada Tpa que impede a transcrição do EYFP, conforme figura 5. A expressão de EYFP é bloqueada por *upstream* de sequenciais loxP, portanto quando cruzados com camundongos Cre recombinase, a sequência de parada do gene alvo (Atg7) é eliminada no tecido de interesse e a expressão de EYFP é observada.

Os cruzamentos destes camundongos foram: CAG Cre-ERTM x Atg 7^{flox/flox} para se obter camundongos CAG Cre-ERTM Atg 7^{flox/flox} conforme (figura 4). Os camundongos CAG Cre-ERTM Atg 7^{flox/flox} foram cruzados com camundongos EYFP para se obter camundongos CAG Cre-ERTM Atg 7^{flox/flox}.YFP/YFP. Em seguida, realizamos cruzamentos entre camundongos CAG Cre-ERTM Atg 7^{flox/flox}.YFP/YFP x CAG Cre-ERTM Atg 7^{flox/flox}.YFP/YFP. Os camundongos CAG Cre-ERTM Atg 7^{flox/flox}.YFP/YFP deverão ser tratados com tamoxifeno para que ocorresse a deleção do gene Atg7 (figura 4 e 5). Os camundongos CAG Cre-ERTM Atg 7^{flox/flox}

flox/flox YFP/YFP, machos e fêmeas, 2 a 3 meses de idade, foram separados em 8 grupos, conforme esquema abaixo e figura 6.

Os camundongos foram oriundos de colônias do biotério de Produção e Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA 337) e pela CIBio- Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Grupo	Camundongo	Tratamento TAM	Dieta
1	WT Cre-	Sem	Controle
2	WT Cre-	Sem	Desnutrido
3	WT Cre-	Com	Controle
4	WT Cre-	Com	Desnutrido
5	WT(Cre+)	Sem	Controle
6	WT (Cre+)	Sem	Desnutrido
7	KO (Cre+)	Com	Controle
8	KO (Cre+)	Com	Desnutrido

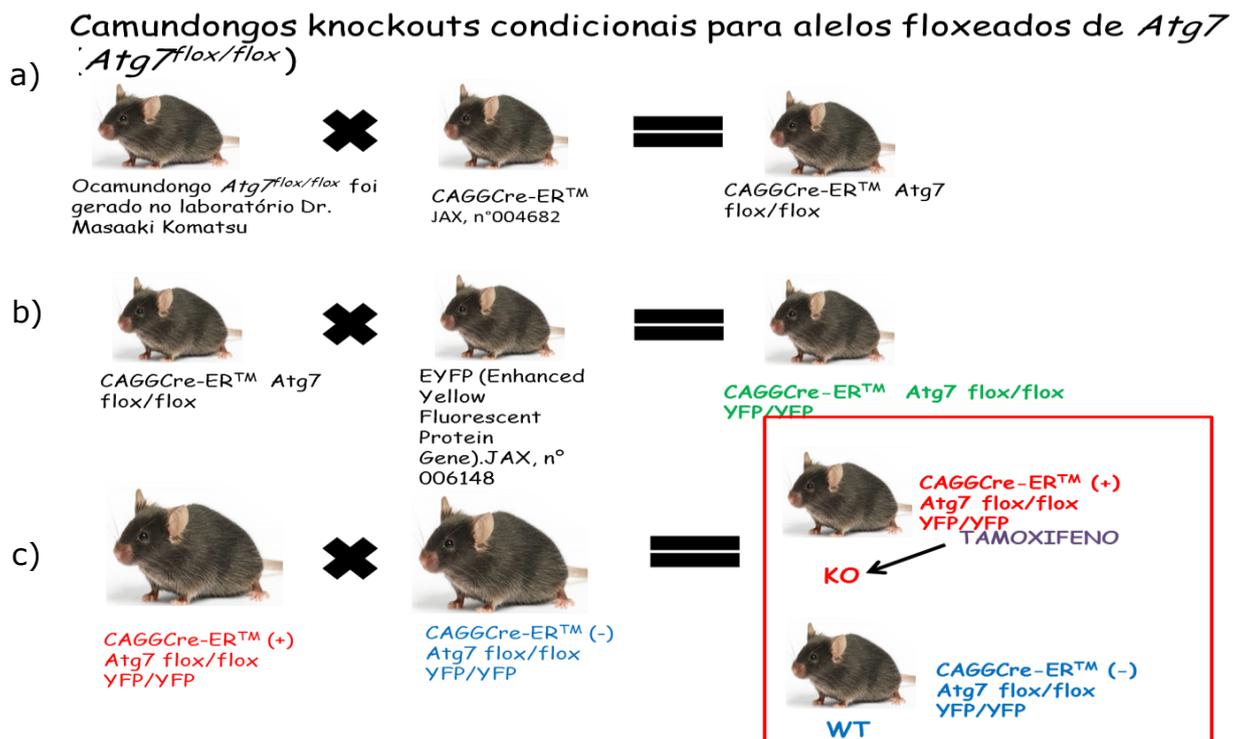


Figura 4- Esquema de cruzamentos dos camundongos. a) Cruzamento de CAG Cre-ERTM x *Atg7^{flox/flox}* para se obter camundongos CAG Cre-ERTM *Atg7^{flox/flox}*. b) camundongos CAG Cre-ERTM *Atg7^{flox/flox}* foram cruzados com camundongos EYFP para se obter camundongos CAG Cre-ERTM *Atg7^{flox/flox}* YFP/YFP. c) Cruzamentos entre camundongos CAG Cre-ERTM +/-, *Atg7^{flox/flox}* YFP/YFP x CAG Cre-ERTM +/-, *Atg7^{flox/flox}* YFP/YFP

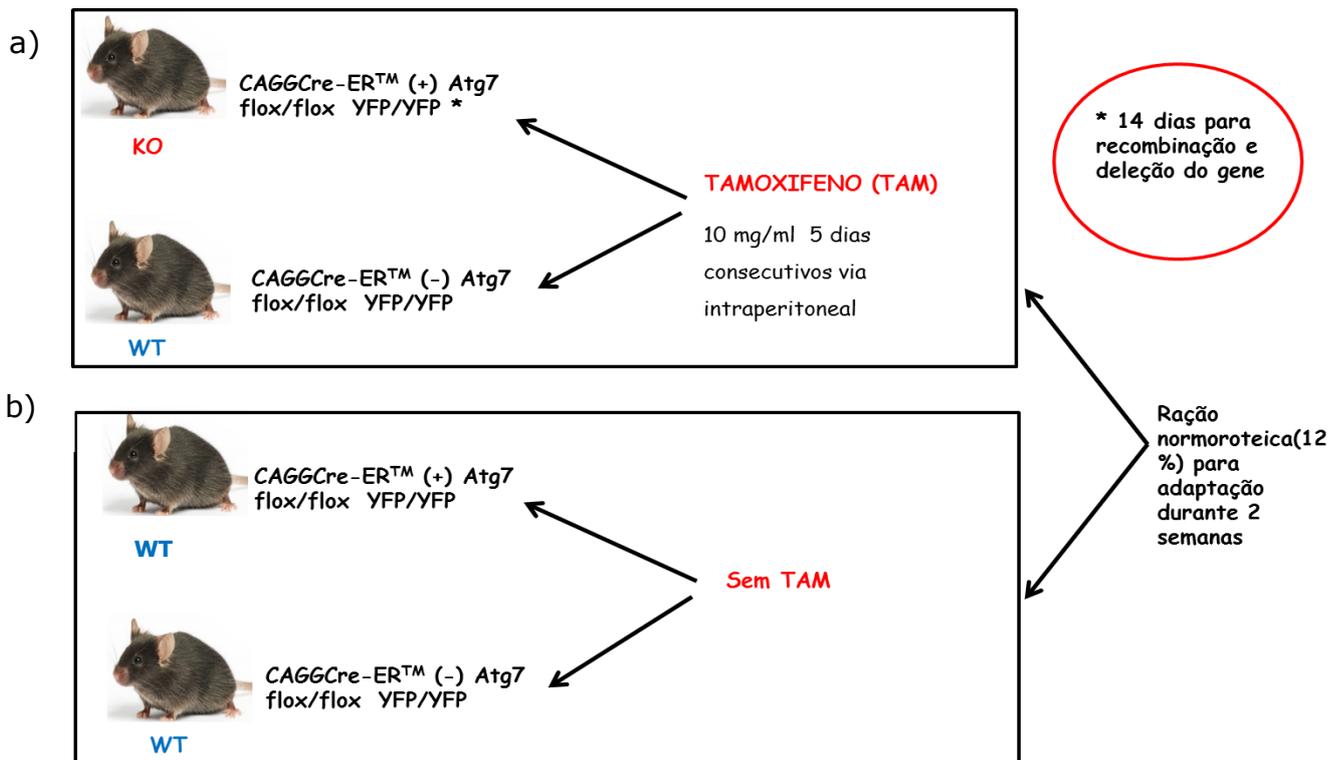


Figura 5- Esquemade tratamento do tamoxifeno nos camundongos CAG CRE a) Camundongos CAG CRE+ e CAG CRE- receberam Tamoxifeno (TAM) por 5 dias consecutivos, via intraperitoneal para recombinação e deleção do gene ATG7 b) Camundongos CAG CRE+ e CAG CRE-, que não receberam tratamento TAM. Ambos os grupos receberam ração normoproteica por 2 semanas para adaptação.

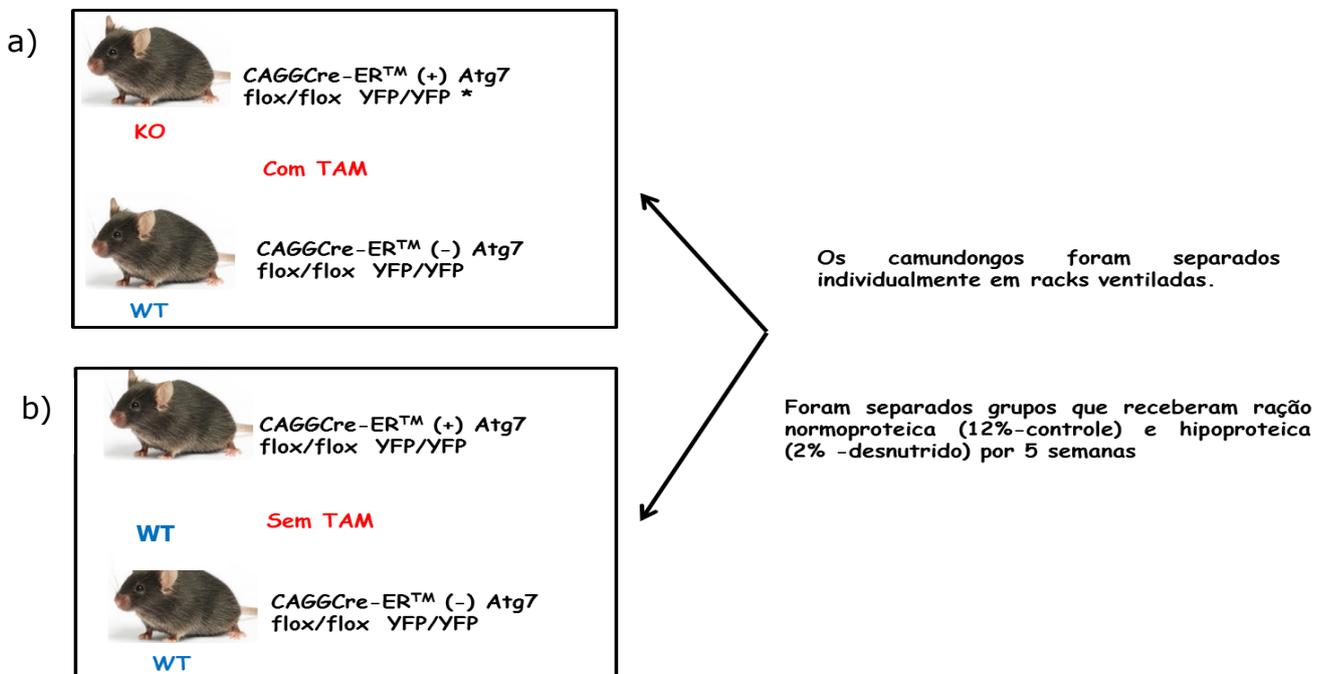


Figura 6- Esquemade separação dos grupos e submissão da desnutrição nos camundongos CAG CRE a) Camundongos que receberam TAM, sendo o grupo CAG CRE+ (KO) e CAG CRE - (WT) b) Camundongos CAG CRE+ e CAG CRE-, não receberam TAM, portanto são camundongos WT. Ambos os grupos receberam ração normoproteica e hipoproteica por 5 semanas

3.2 Genotipagem

O material utilizado para extração do DNA foi um fragmento de 1 cm da ponta da cauda dos animais após 21 dias do nascimento. Uma vez cortadas, individualmente tratadas, e sob condições estéreis, para evitar qualquer contaminação ambiente e entre as amostras, as mesmas foram submetidas à extração do material genético – DNA – pelo método fenol clorofórmio. Assim, após serem picotadas em placas de Petri de 30 mm, as caudas foram postas em microtubos devidamente identificados, sob uma solução de tampão de lise (Tris 50 mM + NaCl 100 mM + EDTA 5 mM + SDS 1,5%) e, proteinase K (1,5 mg/ml). As amostras ficaram em temperatura de 56°C, *overnight* no Thermomixer™ (Eppendorf™ Thermomixer™), rotação de 700 rpm. Após este processo, as amostras foram centrifugadas a 15.000 rpm por 10 min, temperatura 4°C; o sobrenadante coletado e adicionados em microtubos contendo clorofórmio. Após 10 minutos em banho-maria, sob agitação e posterior centrifugação, o sobrenadante foi transferido para microtubos limpos e nestes adicionados propanol 2 ou álcool isopropílico. Após uma rápida agitação dos microtubos em vórtex, o DNA precipitou, sendo visível a olho nú. O conteúdo líquido foi vagarosamente desprezado, tendo o cuidado para não desprezar junto o DNA precipitado. Assim, foi adicionado aos microtubos álcool a 70%, centrifugados por 5 minutos a 800 rpm. Uma vez desprezado o álcool a 70% dos tubos, esperou-se a evaporação do resíduo alcóoliconos tubos e, adicionou-se aos mesmos 100 µl de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM pH 7,5). As amostras permaneceram no banho-maria a seco, sem agitação, por 10 a 20 minutos a 95°C, a fim de dissolver o DNA precipitado no solvente aquoso. As amostras foram devidamente identificadas e então armazenadas a -20°C. A quantificação das amostras foi realizada utilizando-se um espectrofotômetro NanoDrop1000®, ThermoScientific. Os valores de absorbância em 260 nm e em 280 nm (A_{260}/A_{280}) foram em torno de >1,8, indicando que as amostras não estavam contaminadas com proteínas ou solventes orgânicos como fenol.

Para a amplificação das amostras pelo método do PCR (polymerase chain reaction), utilizamos os seguintes reagentes: tampão PCR 10X, 50 mM MgCl₂, DNTPs (adenina, guanina, citocina e timina), *primers forward* e *reverse* (tabela 2) para Cre, Atg7 e YFP, Taq polimerase e água DEPEC (Uniscience®), para um volume final de 10 µl. Uma vez preparado o mix do PCR, foram adicionados as amostras (2 µl) o que corresponde a 50 µg de DNA. As amostras foram amplificadas no equipamento StepOnePlus™ PCR RT System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), programado para uma desnaturação inicial de 94°C- 3 min, (94°C 30 seg, 56°C 30 seg e 72°C 1 min), 35 ciclos de repetição e 72°C 1 min e 4°C hold para os camundongos CAG CRE, já os camundongos TG2 foi utilizado uma

desnaturação inicial de 94°C 5 min, (94°C 30 seg ,+55°C 30 seg e 72°C 1 min), 40 ciclos de repetição e 72°C 5 min e 4°C hold . Foi adicionado, ainda, na amplificação amostra contendo o DNA de controle negativo - C57Bl/6 selvagem – e da solução denominada de branco, solução esta que contém todos os reagentes do mix do PCR com exceção das amostras contendo o DNA (para verificação de contaminação durante o processo). O produto da amplificação foi então submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% {tampão TAE (Tris-Acetato-EDTA, pH=8,0) + agarose}, produzindo bandas visíveis à luz ultravioleta devido ao acréscimo de 3µl de gel *red*. Para a eletroforese foi utilizado marcador de peso molecular de 100 pb (pares de bases) e, o produto amplificado do CAG Cre positivo (Tg+) possui peso molecular 380 bp e o Cre wt (selvagem) , não possui produto amplificado, Atg7 flox/flox possui peso molecular 426 bp e Atg7 wt possui 653bp, já o YFP/YFP possui peso molecular 320 pb e YFP wt possui 600 pb, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 1: Sequência dos primers dos camundongos TG2

Primers	Sequência 5'--> 3'	Resultado
TG2 null	TCCTGACCTGAGTCCTCGTC	300
TG2 WT (<i>wild type</i>)	TACTCCAGCTTCTCGTTCTG	140
TG2HET (heterozigoto)	ACGAGACTAGTGAGACGTGC	100
GFP-LC3 null	ATAACTTGCTGGCCTTTCCACT-	350
GFP-LC3 WT (<i>wild type</i>)	CGGGCCATTTACCGTAAGTTAT	250
GFP-LC3 HET (<i>heterozigoto</i>)	GCAGCTCATTGCTGTTCTCAA	250

Tabela 2: Sequência dos primers Cre ,Atg7 e YFP dos camundongos CAG-CreER

Primers	Sequência 5'--> 3'	Resultado
CRE For	ACGACCAAGTGACAGCAATG	380 pb
CRE Rev	CCATCGCTCGACCAGTTTAG	380 pb
ATG7 wt (<i>wild type</i>)	CCACTGGCCCAT CAGTGGCATG	653 pb
ATG7 HET (heterozigoto)	ATAATGTATGCTATACGAAGTTAT	426 e 653
ATG7 Flox or null	CATCTTGTAGCA CCTGCTGACCTGG	426 pb
YFP (TM ROSA1) wt (<i>wild type</i>)	GGAGCGGGAGAAATGGATATG	600 pb
YFP (TM ROSA2) HET (heterozigoto)	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	320 e 600 pb
YFP (TM YFP1) mutant	AAGACCGCGAAGAGTTTGTC	320 pb

3.2.1 Concentrações do Tamoxifeno (TAM) para deleção do gene *Atg 7*

Conforme literatura; INDRA *et al.*,1999, os camundongos receberam concentrações de 0,01-1mg de Tamoxifeno (4-hydroxy-tamoxifen –Sigma-Aldrich) via intra-peritoneal por dia 5 dias consecutivos. LEPPER *et al.*,2012 propõe a utilizar, para cada 40 g de peso corpóreo do camundongo, utilizar 1,5 mg-3,0 mg de TAM podendo ser a administração ocorrer 1 vez ou mais dias consecutivos ,ou seja, o Cre-ER t2 expressa diferentes níveis de Cre em diferentes tipos de células e em diferentes doses de tamoxifeno. Portanto, provavelmente será necessário padronizar este esquema de administração do tamoxifeno, por exemplo, uma única dose com concentração reduzida de tamoxifeno pode ser ideal para uma determinada linhagem celular, ou contrário, várias injeções intraperitoneais são necessárias para inativar os alelos condicionais, ou seja, a deleção do gene *Atg7*. Após padronização foi utilizada concentração de 10 mg/ml de TAM dissolvido em óleo de girassol, a cada 25 g de peso corpóreo ,via intraperitoneal por 5 dias consecutivos.

3.2.2 Preparo das rações

As rações utilizadas para a realização deste projeto foram preparadas de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição para camundongos recém - desmamados (AIN93G modificada) e adultos (AIN93M modificada) (REEVES *et al.*, 1993; REEVES, 1997). Foram preparadas **ração de crescimento**, contendo 17% de proteína, segundo a AIN93G modificada (tabela 3), **ração controle ou normoprotéica** contendo 12% de proteína e **ração hipoprotéica** contendo 2% de proteína, segundo a AIN93M modificada (Tabela 4) (BORELLI *et al.*, 2007).

As rações foram preparadas em nosso laboratório na forma, de granulado, e conservadas a 4°C até o momento do uso. Ambas as rações controle e hipoprotéica, são isocalóricas e diferem apenas no conteúdo proteico. A fonte de proteína utilizada foi a caseína (LABYNTH). Entretanto, como aproximadamente 80% do fósforo advém da caseína, e com menor quantidade da caseína na ração hipoprotéica a quantidade de fósforo disponível é menor, sendo, portanto, necessário corrigir-se a concentração de fósforo na mistura salínica da ração de crescimento e hipoprotéica. No caso da ração de crescimento também foi realizada a correção do fósforo em função da maior concentração de caseína. A concentração proteica da caseína e das rações foi determinada pelo método micro-Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 1985) (tabela 5 e 6) e foram realizadas no laboratório de Bioquímica da Nutrição (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), pela Sra. Ivanir Pires e sob a responsabilidade do Prof. Dr. Júlio Tirapegui.

Tabela 3: Composição da ração de crescimento (AIN93G modificada)

Constituintes	Ração de crescimento
Proteínas (%)	17
Mistura salinica (g)	175
Mistura vitaminica (g)	50
Fibra alimentar (celulose) (g)	250
Óleo de soja (g)	350
Sacarose (g)	500
L-cistina (g)	15
Bitartarato de Colina (g)	12
Tert-butilhidroquinona (mg)	0,07
Amido de milho q.s.p. (g)	5000

Tabela 4: Composição das Rações utilizadas

Constituintes	Ração controle	Ração hipoprotéica
	Ração I	Ração II
Proteínas (%)	12	2
Mistura salínica (g)	175	175
Mistura vitamínica (g)	50	50
Fibra (g)	250	250
Óleo de Milho (g)	400	400
Sacarose (g)	500	500
Metionina (g)	7,5	7,5
Colina (g)	12,5	12,5
Tert-butilhidroquinona (mg)	0,04	0,04
Amido de milho q.s.p. (g)	5000	5000

Dietas isocalóricas de 3601,0 kcal/kg de ração. g = grama

¹ As rações foram preparadas de acordo com as recomendações de 1993 do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos (REEVES, 1993).

TABELA 5: COMPOSIÇÃO DA MISTURA SALÍNICA

<i>Composição da mistura salínica</i>	<i>Ração controle (g/Kg de Mix)</i>	<i>Ração hipoprotéica (g/Kg de Mix)</i>
Carbonato de cálcio anidro	357,00	357,00
Fosfato de potássio monobásico	258,75	262,45
Cloreto de sódio	74,00	74,00
Citrato de potássio	12,87	12,87
Sulfato de potássio	46,60	46,60
Óxido de magnésio	24,00	24,00
Citrato férrico	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65
Carbonato de manganês	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30
Iodato de potássio	0,01	0,01
Selenato de sódio anidro	0,01025	0,01025
Paramobilidato de amônio 4 H ₂ O	0,00795	0,00795
Meta-silicato de sódio 9 H ₂ O	1,45	1,45
Sulfato de potássio e crômio	0,275	0,275
Cloreto de lítio	0,0174	0,0174
Ácido bórico	0,0815	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066	0,0066
Sacarose	216,186	225,36

TABELA 6: COMPOSIÇÃO DA MISTURA VITAMÍNICA

Composição da mistura vitamínica	Rações controle e desnutrida g/Kg de mix
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-HCl	0,70
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,60
Ácido fólico	0,20
D-biotina	0,02
Vitamina B-12	2,50
Vitamina E	15,00
Vitamina A	0,80
Vitamina D ₃	0,25
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,655

3.2.3 Indução à desnutrição ou privação

Após o desmame, os animais C57Bl/6J e CAG CRE (conforme figura 5) receberam ração de crescimento até completar 2 meses de idade e, após este período, os animais foram previamente pesados e alocados em gaioleiros individuais (BORELLI *et al.*, 2007), sendo mantidos sob temperatura ambiente de 22 a 25 °C, ciclo de luz claro-escuro de 12 hs (luzes acesas às 7:00 hs da manhã), umidade de 55 ± 10% e pesados a cada 48 hs. Durante o período de adaptação às condições do gaioleiro (cerca de duas semanas) todos os animais receberam ração controle contendo 12% de proteínas, para em seguida, serem separados em dois grupos: **nutrido ou controle (C)**, que continuaram a ser alimentados com ração controle; e **desnutrido (D)**, que receberam ração hipoprotéica, contendo 2% de proteínas (Du *et al.*, 2000, BORELLI *et al.*, 2007). Ambos os grupos de animais tiveram livre acesso à água e às rações. Aproximadamente após 5 semanas, período transcorrido até que os animais do grupo desnutrido perderem entre 20 a 25 % de peso corpóreo, os animais de ambos os grupos foram anestesiados para obtenção das amostras biológicas e, posteriormente eutanaziados com excesso de anestésico e deslocamento cervical. Já os animais TG2 receberam ração comercial e foram submetidos a jejum de 24 horas (privação).

3.2.4 Avaliação do estado nutricional dos animais dos camundongos C57Bl/6J e CAG CRE

A avaliação do estado nutricional dos animais foi baseada na análise pelo peso corporal, consumo de ração e de água e na avaliação dos seguintes parâmetros: concentração de proteínas totais, albumina sérica e hemograma. Foi considerada a perda de peso corporal de cerca de 20% a 25% dos animais desnutridos como referencial para a realização dos ensaios.

3.2.5 Obtenção das amostras biológicas dos camundongos C57Bl/6J e CAG CRE

As amostras sanguíneas foram obtidas por meio de punção do plexo axilar, em camundongos previamente anestesiados com 10mg/Kg de peso de cloridrato de xilazina (Rompum[®], Bayer) e 100mg/Kg de peso de cloridrato de cetamida (Ketamina[®], Cristália). As amostras de soro foram utilizadas para as dosagens de proteínas totais e albumina sérica e amostras sanguíneas coletadas com o anticoagulante EDTA 10% foram utilizadas para a realização do hemograma e contagem de reticulócitos.

3.2.6 Determinação de proteínas totais e albumina séricas dos camundongos C57Bl/6J e CAG CRE

As amostras de sangue foram obtidas de acordo com o item 3.2.5. Após a coleta, as amostras foram imediatamente centrifugadas (2000xg durante 20 minutos, a 4°C). O soro foi separado e congelado em *freezer* a -40°C, onde permaneceu até a realização da análise. A concentração de proteínas totais séricas foi determinada pelo método do Biureto (GORNAL *et al.*, 1949) e a dosagem de albumina sérica foi avaliada pelo método do Verde de Bromo Cresol (DOUMAS, 1971), sendo utilizado "kits" comerciais da Labtest[®]. As amostras foram processadas em duplicata e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro (EL800 Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instrumentals, Inc), em 540nm.

3.2.7 Hemograma e contagem de reticulócitos dos camundongos C57Bl/6J

As amostras de sangue foram obtidas por meio de punção do plexo axilar dos camundongos previamente anestesiados, utilizando-se EDTA 10% como anticoagulante. Estas amostras foram utilizadas para a determinação do volume hematócrito, dosagem de hemoglobina, contagem global de hemácias e leucócitos em contador automático ABX

VET®, HORIBA. Também foram realizadas, extensões sanguíneas, posteriormente coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) e analisadas ao microscópio óptico para a contagem diferencial de leucócitos circulantes e análise morfológica. Os reticulócitos foram determinados em extensão sanguínea preparada em até 30 minutos após a coleta, corada pela coloração supra vital com Novo Azul de Metileno (BRECHER, 1949), utilizando-se, para análise, microscopia óptica convencional.

3.2.8 Obtenção de células da medula óssea e mielograma C57Bl/6J, CAG CRE e TG2.

Para a realização do mielograma foram coletadas as células da medula óssea (MO) por meio de lavagem da cavidade medular de ambos os fêmures e tíbias dos animais com meio de cultura Iscove's (Sigma® Chemical Company, USA), após o corte das epífises. O lavado obtido foi utilizado para a realização da contagem de células em câmara de Neubauer e para a realização de lâminas, obtidas após citocentrifugação e posteriormente coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947).

3.2.9 Separação das células Lin⁻ (linhagem negativas) por método imunomagnético dos camundongos C57Bl/6J

As células-tronco/progenitoras hemopoéticas foram obtidas por depleção negativa utilizando método imunomagnético (Lineage cell depletion Kit, Milteny Biotec®). Após coleta das células da MO as hemácias foram lisadas com tampão de lise (NH₄Cl 150mM, NaHCO₃ 10mM e EDTA 0,1mM, pH 7,4) e as células nucleadas foram marcadas com um coquetel de anticorpos primário {anticorpos monoclonais biotina-conjugado, anti-CD5, CD45R (B220), CD11b, Anti-Gr-1 (Ly-6G/C) e Ter-119}, seguido da marcação com anticorpo secundário marcado com "microbeads" anti-biotina. As células foram lavadas e a suspensão celular marcada foi passada por uma coluna de separação tipo LS MACS Columns (Milteny Biotec®), previamente tratada com PBS, pH 7,2, mantida em campo magnético, e, apenas sob ação da gravidade, recolheu-se o eluente. A coluna foi lavada três vezes com PBS pH 7,2, recolhendo-se o eluente de todas as lavagens. Na suspensão assim obtida estão contidas as células hemopoéticas Lin⁻ (linhagem negativas) A contagem e a viabilidade celular foram avaliadas por azul de tripan 1% em hemocitômetro de Neubauer.

3.2.10 Avaliação das células-tronco hemopoéticas (CTH) e células-tronco progenitoras, por citometria de fluxo nos camundongos C57Bl/6J, CAG CRE e TG2.

Após a obtenção das células conforme descrito no item 3.2.8, as células totais da medula óssea foram marcadas com anticorpos conforme o descrito na tabela 7. Todos os anticorpos são da empresa BD Biosciences, exceto o Lin⁻ (Biotin-antibody Cocktail) e anticorpo secundário (anti-biotin) da empresa Miltenyi Biotec®. A suspensão foi incubada por 20 minutos, em temperatura de 20-25 °C. Após esse período, foi adicionado 1 mL de PBS Azida BSA pH 7,2 e realizada a separação das LSK (lin negativas, Sca-1 positivas) por *cell sorting* utilizando o equipamento FACS ARIA III® (Becton-Dickson, EUA). Este citômetro possui 6 lasers (633, 561, 488, 445, 405 e 375 nm), foi utilizado nozzle de 85 microns para separação da LSK e método de 4- purity, alcançando 99% de pureza no *sorting* destas células. Já para avaliação da CTH e CTPH dos camundongos TG2 foi utilizado o citometro FACS CANTO II (4 lasers) .Também foi realizado o FMO (controles de calibração) das amostras,sendo adquiridos 300.000 eventos. Todas as amostras foram analisadas pelo *software* FLOWJO v.10®

Tabela 7: Anticorpos utilizados no experimento para avaliação de CTH e CTPH por citometria de fluxo.

Anticorpo	Clone	Fluorocromo	Diluição
Cocktail (Lin): (anti CD-5; Ter-119; Gr-1(Ly-6G/C); CD45R (B220) e CD11b + anticorpo secundário (anti-biotin)	Bio3-18E7.2;mouse IgG1 Bio3-18 E7	APC	1:100 e 1:200
Anti Sca-1	E-D7	Pecy-7	1: 100
Anti-c- <i>kit</i>	2B8	Percp-Cy5.5	1: 100
Anti CD 90.1	OX-7	APC-Cy7	1: 100

3.2.11 Viabilidade Celular da CTH e CTPH

Conforme item 3.2.10, avaliamos a viabilidade celular da CTH e CTPH nos camundongos C57BL/6J e c-Kit nos camundongos TG2 e CAG CRE empregando-se a marcação de Anexina-V conjugada conforme tabela 8, 9 e 10 a qual se liga à fosfatidilserina que é externalizada durante o processo de morte por apoptose. Também utilizamos a marcação com 7AAD, que se intercala entre bases do DNA de células com a membrana rompida, característica da morte celular por necrose. No ensaio de apoptose para os camundongos TG2, utilizamos staurosporine 2 μ M por 2 horas à 37 $^{\circ}$ graus.

Na marcação com anexina-V e 7AAD, utilizamos 3x10⁶ células da medula óssea que foram ressuspensas em solução tampão de Anexina (NaCl 140 mM; NaH₂PO₄ 2,6 mM; Na₂HPO₄ 10 mM ; CaCl₂ 2,5 mM; HEPES 10 mM, pH=7,4). À suspensão de células foram adicionados 5 μ L de anexina-V e 25 μ g/mL de 7AAD e 0,1 μ g/mL de cada anticorpo conforme tabela 10. Em seguida, as células foram incubadas por 20 min., protegidas da luz e a temperatura ambiente. Posteriormente, a suspensão celular foi avaliada no citômetro de fluxo FACS ARIA III[®] (Becton-Dickson, EUA). As células inviáveis, por apoptose ou necrose, e as células viáveis, foram expressas em porcentagem. Foram adquiridos 300.000 eventos. Todas as amostras foram analisadas pelo software FLOWJO v.10[®]

Tabela 8: Anticorpos utilizados no experimento para viabilidade celular de CTH e CTPH por cell sorting utilizados nos camundongos C57BL/6J

Anticorpo	Clone	Fluorocromo
Cocktail (Lin): (anti CD-5; Ter-119;Gr-1(Ly-6G/C); CD45R (B220) e CD11b + anticorpo secundário (anti-biotin)	Bio3-18E7.2;mouse IgG1 Bio3-18 E7	APC
Anti Sca-1	E-D7	PE
Anti-c-kit	2B8	Percp-Cy5.5
Anti CD 90.1	OX-7	APC-Cy7
Anexina V	DX2	FITC
7AAD	xx	PECY7

Tabela 9: Anticorpos utilizados no experimento para viabilidade celular de CTH e CTPH por cell sorting utilizados nos camundongos CAG CRE AT7 flox

Anticorpo	Clone	Fluorocromo
Cocktail (Lin): (anti CD-5; Ter-119;Gr-1(Ly-6G/C); CD45R (B220) e CD11b + anticorpo secundário (anti-biotin)	Bio3-18E7.2;mouse IgG1 Bio3-18 E7	APC
Anti-c-kit	2B8	Percp-Cy5.5
Anexina V	DX2	PE
7AAD	xx	PECY7
YFP		FITC

Tabela 10: Anticorpos utilizados no experimento para viabilidade celular de CTH e CTPH por cell sorting utilizados nos camundongos TG2

Anticorpo	Clone	Fluorocromo
Cocktail (Lin): (anti CD-5; Ter-119;Gr-1(Ly-6G/C); CD45R (B220) e CD11b + anticorpo secundário (anti-biotin)	Bio3-18E7.2;mouse IgG1 Bio3-18 E7	APC
Anti-c-kit	2B8	Percp-Cy5.5
Anexina V	DX2	PE
GFP-LC3		FITC

3.2.12 Ensaio de ativação das vias de sinalização na CTH e CTPH por citometria de fluxo nos camundongos TG2.

As células da medula óssea foram extraídas, conforme **item 3.2.9** e 3×10^6 células por amostra foram separadas e ressuspensas em PBS. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% durante 30 minutos, lavadas com glicina 0,1M e então, permeabilizadas com Triton X-100, na concentração de 0,001% durante 15 minutos, para a proteína nuclear ERK e para o ensaio de proliferação Ki67, já para as proteínas citosólicas LC3 e p62, as amostras foram permeabilizadas com Saponina 0,01% por 15 minutos. Depois as amostras foram lavadas e, subsequentemente, as células foram marcadas com o anticorpo primário anti-ERK (1:100), anti-Ki67 (1:50), anti-LC3(1:100) e anti-p62 (1:100) durante 4h, após este período, incubar com anticorpo secundário anti-IgG *rabbit*, conjugado com Alexa Fluor700 (4ug/ml) por 40 minutos. Em todas as amostras foram adicionados anticorpos para avaliar a população de CTH e CTPH conforme descrito no item 3.2.10. A análise foi realizada na população de CTH e CTPH. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS CANTO II, 300.000 eventos totais foram adquiridos e todas as amostras foram analisadas pelo software FLOWJO v.10[®]

3.2.13 Ensaio do ciclo celular na CTH e CTPH nos camundongos CAG CRE ATG7.

As células da medula óssea foram extraídas, conforme **item 3.2.9** e 3×10^6 células por amostra foram separadas e ressuspensas em PBS. Em seguida, as células foram fixadas com etanol 70% durante 15 minutos. Depois as amostras foram lavadas e, subsequentemente, as células foram marcadas com 0,1mg/ml de 7-AAD com 2,5 ul de Rnase por 30 minutos na temperatura de 37^o graus. Após incubação, as amostras foram ressuspensas em PBS. Em todas as amostras foram adicionados anticorpos para avaliar a população de CTH e CTPH conforme descrito no item 3.2.10. A análise foi realizada na população de CTH e CTPH. As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo FACS CANTO II, 300.000 eventos totais foram adquiridos e todas as amostras foram analisadas pelo software FLOWJO v.10[®]

3.2.14 Extração de proteínas e Western Blotting nos camundongos C57BL/6J, CAG CRE e TG2.

No grupo C57BL/6J, utilizamos o método de separação das células Lin⁻ conforme descrito no item 3.2.9, avaliamos as proteínas mTOR, Rictor, Raptor, Gβ1, Akt, Bcl-2, Atg7, p62 e LC3, bem como p-mTOR s2448, p-mTOR s2481 e p-Akt s472 / 473 das CTPH de camundongos do grupo controle e desnutrido. Já para os camundongos CAG CRE ATG7, avaliamos as proteínas ATG7 e LC3 e para os camundongos TG2, avaliamos as proteínas TG2, LC3, p62, ERK, p-MEK, p21, p27 e p53. As células de todos os grupos foram lavadas três vezes com PBS estéril (pH 7,4) e lisadas com tampão de Ripa® (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EUA) utilizando um *cocktail* inibidor de proteases e fosfatases (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, 15 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e diluído em tampão de Laemmli 5x concentrado e denaturado em temperatura de 100°C por 5 min. A quantificação de proteínas totais foi realizada através do *kit* (Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, EUA). 30 µg por poço foram separadas em gel de 7% de SDS-poliacrilamida (mini-gel) e transferidas em membrana de PVDF (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) em sistema semi-seco (Amersham® GE), exceto para a proteína LC3 quando utilizamos gel gradiente (gel pre-cast 4-20% mini-protean® TGX TM BioRad Laboratories, Inc., EUA) e transferidas em membrana de PVDF (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA) em sistema de transferência úmida (BioRad Laboratories, Inc. EUA). Logo após o processo de transferência, a membrana foi bloqueada com 5% de leite desnatado durante 1 hora e, em seguida, lavou-se três vezes com TBST por 10 min. Todos os anticorpos utilizados foram da empresa Cell Signaling Tecnologia, MA, EUA, utilizamos a diluição 1:1000 do anticorpo primário (incubados *overnight*). Logo após este período, lavamos a membrana três vezes com TBST e incubamos por 1h com anticorpo secundário conjugado com peroxidase { BD Pharmingen, NJ, EUA, diluição(1: 2000)}. Após este processo as membranas foram lavadas três vezes com TBST, durante 10 minutos e em seguida foram reveladas pelo *kit* ECL (Amersham ECL Ocidental TMA Advance Blotting Detection, Piscataway, NJ, EUA). As membranas foram quantificadas pelo sistema digital de detecção (ImageQuant™ 400 versão 1.0.0, Amersham Biosciences, Pittsburg, PA, EUA). Os resultados foram normalizados utilizando-se a intensidade da β-actina (1: 40.000 anti- β actina, CellSignaling Tecnologia, MA, EUA) e expressa em unidades arbitrárias (UA).

3.2.15 PCR camundongos C57Bl/6J

Após a separação das células Lin⁻, conforme descrito no item 3.2.9, realizamos a extração do RNA total através do *Kit* Mini RNAspin RNA isolation® (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro NanoDrop1000® (Thermo Scientific) a 260 e 280 nm. O RNA total foi transcrito de modo reverso em cDNA usando transcrição reversa High Capacity cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Para a amplificação de amostras de cDNA utilizamos o TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), empregando os *primers* mTORC1 (Mm0044968_m1) mTORC2 (Mm 01219960_m1), AKT1 (Mm 01331626_m1) AKT2 (Mm 02026778_g1), Rictor (Mm 01307318_m1), RAPTOR (Mm 00712676_m1), BECLIN (Mm 01265461_m1), BCL2 (Mm 00477631_m1), Map1LC3A (Mm 00458725_g1), Map1LC3B (Mm 00782868_sh) ,GβL (Mm 01299633_m1) e ATG7(Mm00512209-m1). 18S (Mm03928990-g1) foi utilizado como controle da amostra. Todos os genes acima são da empresa Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA. As amplificações foram realizadas utilizando o equipamento StepOnePlus™ PCR RT System (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) . Utilizamos o método $\Delta\Delta C_t$ para quantificação do mRNA

3.2.16 Avaliação da autofagia na CTH por microscopia de fluorescência em C57BL6J

Realizamos a separação da CTH por *cell sorting* conforme descrito no item 3.2.10, as células foram centrifugadas por 5 min, 400xg, temperatura 20-25°C. Adicionamos, à suspensão celular, 2 μ L de Cyto-ID™ Green {(Cyto-ID™ Autophagy Detection *KitKit* (Enzo Life))} e 1 μ L de Hoeschet 33342, sendo a suspensão incubada por 30 minutos em temperatura de 37°C , ao abrigo da luz. As células foram lavadas em 100 μ L de Tampão 1X Cyto-ID™ Autophagy Detection*kit* (Enzo Life), e foram citocentrifugadas a 700 rpm por 5 min. em lâminas e analisadas em microscópio de fluorescência (Eclipse i80®-NIKON). Utilizamos o filtro FITC para detectar a presença do sinal autofágico (vacúolos na região perinuclear da célula ou pelo citoplasma) e utilizamos o filtro DAPI para visualização do núcleo. A população de Cyto-ID™ Green são vesículas co-localizadas com LC3, marcador específico encontrado no autofagossomo.

4.0 Análise Estatística

Todos os resultados foram submetidos ao teste de distribuição Gaussiana seguido do teste “t” e 1way ANOVA. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O *software* utilizado para análise foio GraphPad Prism 5.

5.0. RESULTADOS C57BL/6J

5.1 Determinação da concentração proteica das rações

A determinação da concentração proteica das rações controle e hipoprotéica consumidas pelos animais foram realizadas pelo método de micro-Kjedahlrer. A ração controle apresentou $12,65 \pm 0,60\%$ ($n=3$) enquanto a ração hipoproteica apresentou $2,35 \pm 0,43\%$ *** ($n=3$) de proteína. *** $p < 0,001$ quando comparado a ração hipoprotéica a ração controle).

5.2 Avaliação do estado nutricional

O peso corpóreo e o consumo de ração de cada animal foram monitorados a cada 48 horas, verificando-se que ambos os grupos ingeriram a mesma quantidade de ração (figura 7A). No entanto, o consumo de proteína do grupo desnutrido foi significativamente menor em relação ao grupo controle, uma vez que a ração hipoproteica oferecida ao grupo desnutrido possui apenas 2% de proteína (figura 7B). Verificou-se que os animais do grupo desnutrido apresentaram perda significativa do peso corporal em relação ao grupo controle, cerca de $-22,15 \pm 1,51$ (média \pm desvio padrão), enquanto que os animais do grupo controle tiveram ganho de peso de $10,39 \pm 1,60$ (média \pm desvio padrão), durante o período do ensaio (figuras 8A e 8B).As concentrações séricas ou plasmática (veja figura) de proteínas totais e a albumina dos animais do grupo desnutrido foram significativamente menores em relação à dos animais do grupo controle (figuras 9A e 9B).

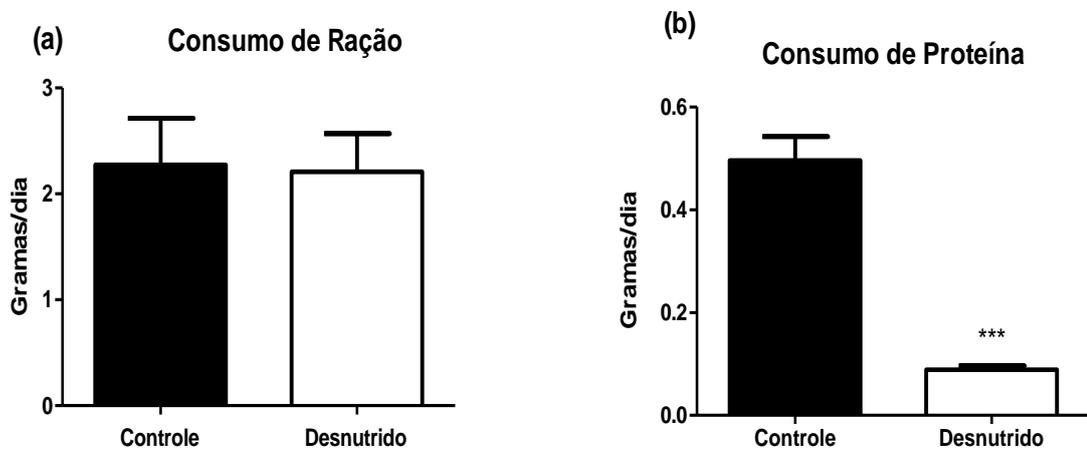


Figura 7: Valores do consumo de ração e proteína (a): Consumo de ração (g/dia) dos animais do grupo controle **(b):** Consumo de proteína (g/dia) dos animais do grupo controle (n=10) e do grupo desnutrido (n=10). Os resultados estão expressos por média \pm desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *** p < 0, 001 quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

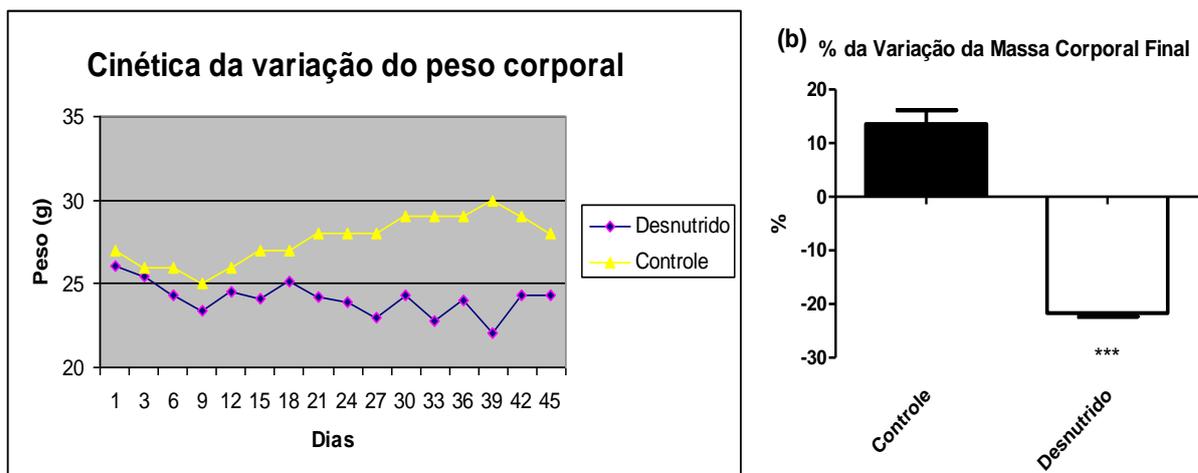


Figura 8: Cinética da variação do peso corporal e % da massa corporal final (a): Variação do peso corporal durante o período de 5 semanas de indução à desnutrição de animais do grupo controle (n=10) e de animais do grupo desnutrido (n=10). **(b):** Porcentagem da variação do peso corporal durante o período de 5 semanas de indução à desnutrição de animais do grupo controle (n=10) e de animais do grupo desnutrido (n=10). Os resultados estão expressos por média \pm desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *** p < 0, 001 quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

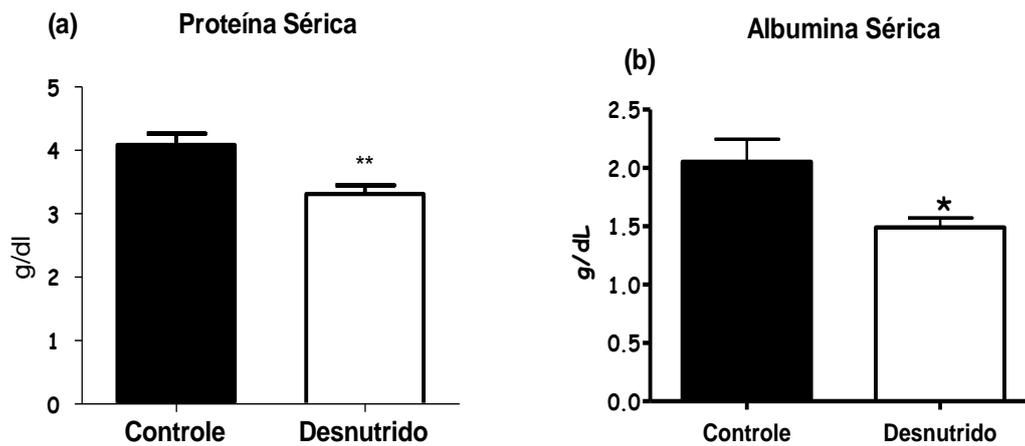


Figura 9: Valores das concentrações de proteína e albumina sérica (a): Concentração das proteínas totais (g/dL) e **(b):** Concentração da albumina sérica (g/dL), respectivamente dos animais do grupo controle (n=10) e de animais do grupo desnutrido (n=10). Os resultados estão expressos por média \pm desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. ** $p < 0,01$ quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

5.3 Desnutrição afeta os parâmetros hematológicos

5.3.1 Eritrograma

A avaliação do quadro eritrocitário revelou que os animais desnutridos apresentaram redução significativa nos parâmetros da série vermelha e reticulopenia quando comparada aos animais do grupo controle, caracterizando um quadro de anemia (Tabela 11).

5.3.2 Leucograma

Os animais do grupo desnutrido apresentaram leucopenia significativa quando comparado aos animais do grupo controle. Verificou-se linfocitopenia significativa nos animais do grupo desnutrido em relação ao grupo controle. O número absoluto de neutrófilos permaneceu inalterado tanto nos animais do grupo controle quanto nos animais do grupo desnutrido. Basófilos e eosinófilos foram raramente encontrados nos animais de ambos os grupos (Tabela 12).

Tabela 11: Parâmetros da série eritrocitária

Parâmetros	Grupo Controle (N=5)	Grupo Desnutrido (N=10)
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	8.502 \pm 0.179	6.684 \pm 0.813*
Hemoglobina (g/dL)	12.12 \pm 0.261	10.60 \pm 0.401 *
Volume Hematócrito (%)	37.82 \pm 0.817	28.70 \pm 0.443 ***
VCM (fL)	44.40 \pm 0.24	44.80 \pm 0.200
CHCM (%)	34,80 \pm 1,04	32,59 \pm 0,53
HCM (pg)	14.13 \pm 0.307	13.85 \pm 0.064
Reticulócitos (%)	4,13 \pm 0,28	3,17 \pm 0,12**

Tabela 11. Valores do número total de hemácias, concentração de hemoglobina, volume hematócrito dos animais do grupo controle (n=10) e animais do grupo desnutrido (n=10) dos parâmetros hematológicos da série eritróide. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. * p<0,05 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle. * p<0,05 *** p < 0, 001 quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle

Tabela 12: Resultados do número total de leucócitos e das diferentes populações leucocitárias (neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos)

Parâmetros	Grupo Controle	Grupo Desnutrido
Leucócitos ($/\text{mm}^3$)	1.498 \pm 0.210	0.980 \pm 0.080*
Neutrófilos Segmentados ($/\text{mm}^3$)	330,2 \pm 47,13	306,4 \pm 77,32
Linfócitos ($/\text{mm}^3$)	1.170 \pm 0.032	0.498 \pm 0.023 ***
Monócitos ($/\text{mm}^3$)	0.0125 \pm 0.000	0.0105 \pm 0.000

Tabela 12: Tabela dos valores referente ao leucograma. Valores do número total de leucócitos e de neutrófilos segmentados, linfócitos e monócitos expressos em células/ mm^3 , do sangue de animais dos grupos controle (n=11) e animais do grupo desnutrido (n=19). Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. * p<0,05 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle. * p<0,05 *** p < 0, 001 quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

5.4 Desnutrição afeta a celularidade óssea

O mielograma dos animais desnutridos revelou hipocelularidade medular em decorrência da redução significativa do número total de células da medula óssea quando comparados aos animais do grupo controle (figura 10). A análise diferencial demonstrou redução significativa em células de linhagem granulocítica eritróide e megacariocítica, com significativa redução da relação G/E (Tabela 13).

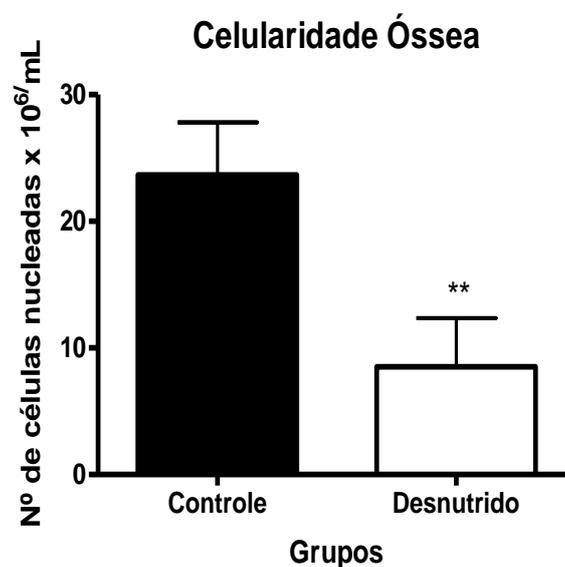


Figura 10: Celularidade óssea . Número total de células nucleadas da medula óssea dos animais do grupo controle (n=10) e dos animais do grupo desnutrido (n=13). Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. **p<0,01 quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle

Tabela 13: Análise diferencial das diferentes populações celulares

Celularidade óssea	Controle (n=10)	Desnutrido(n=10)
Mieloblastos	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1
Promielócitos/Mielócitos/Metamielócitos	0.9 ± 0.1	0.5 ± 0.1 *
Neutrófilos bastonetes	2.0 ± 0.1	1.5 ± 0.1 *
Neutrófilos segmentados	23.4 ± 0.6	18.4 ± 0.9*
Eosinófilos	0.4 ± 0.08	0.4 ± 0.07
Linfócitos	10.2 ± 1.0	7.9 ± 0.7 *
Macrofágos	0.08 ± 0.05	0.07 ± 0.04

Proeritroblastos/ Eritroblastos basófilo	0.9 ± 0.04	0.7 ± 0.06
Eritroblastos policromático	4.2 ± 0.42	2.8 ± 0.4*
Eritroblastos ortocromático	7.4 ± 1.5	5.1 ± 0.6*
Plasmócitos	0.10 ± 0.04	0.08 ± 0.11
Linhagem Megacariocítica	0.9 ± 0.60	0.5 ± 0.2 *
Relação Granulo/Eritróide	3.1 ± 0.20	2.1 ± 0.3*
Relação Linfóide/Eritróide	1.0 ± 0.19	1.2 ± 0.1
Relação Granulo/ Linfóide	0.78 ± 0.11	0.75 ± 0.08

Tabela 13: Análise diferencial das diferentes populações celulares presentes na medula óssea. Os resultados estão expressos por média ± desvio padrão. O número entre parênteses refere-se ao número total de animais utilizados no experimento. * ($p \leq 0,05^{**}$) indica a diferença significativa entre os grupos controle e o grupo desnutrido. Estatística utilizada: Teste t.

5.5 Desnutrição altera a fosforilação em células-tronco/progenitoras hemopoéticas Lin⁻

A quantidade de p-Akt ser 473 apresentou-se significativamente reduzida nas CTPHs no grupo desnutrido (Figura 11 B), não houve diferença significativa do Akt total (Figura 11 A) nas CTPH em animais desnutridos, em relação ao grupo controle.

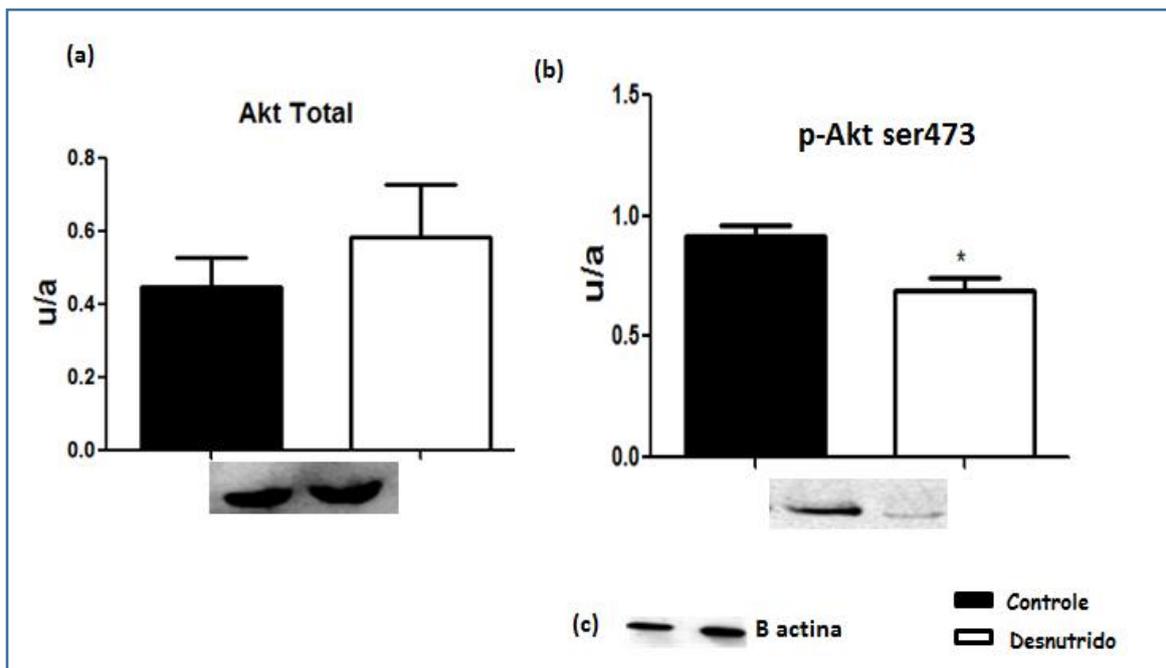


Figure 11. Efeito da desnutrição proteica nas proteínas envolvidas na sinalização autofágica em CTPHs de camundongos controle e desnutrido avaliados por Western Blotting. (a) Resultados da determinação de Akt total, (b) Akt fosforilada ser 473 (c) imagem das proteínas com seu respectivo controle β -actina pelo ImageQuant* ($p \leq 0,05$). ** $p < 0,01$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle. * indica a diferença significativa entre o grupo controle e no grupo desnutrido. No experimento foi utilizado ($n = 6$) para o grupo controle e ($n = 6$) para o grupo desnutrido. O número entre parênteses refere-se ao número total de animais utilizados.

5.6 Desnutrição altera a fosforilação de mTOR em células-tronco/progenitoras hemopoéticas Lin⁻

A quantidade de mTOR total e p-mTOR ser 2481 apresentou-se significativamente reduzida nas CTPHS do grupo desnutrido quando comparado aos animais do grupo controle (Figuras 12 A e B), Em relação a quantidade de p-mTOR Ser2448, Raptor, Rictor e Gβ1 (Figuras 12 C, D, E e F) não houve diferença significativa entre os grupos.

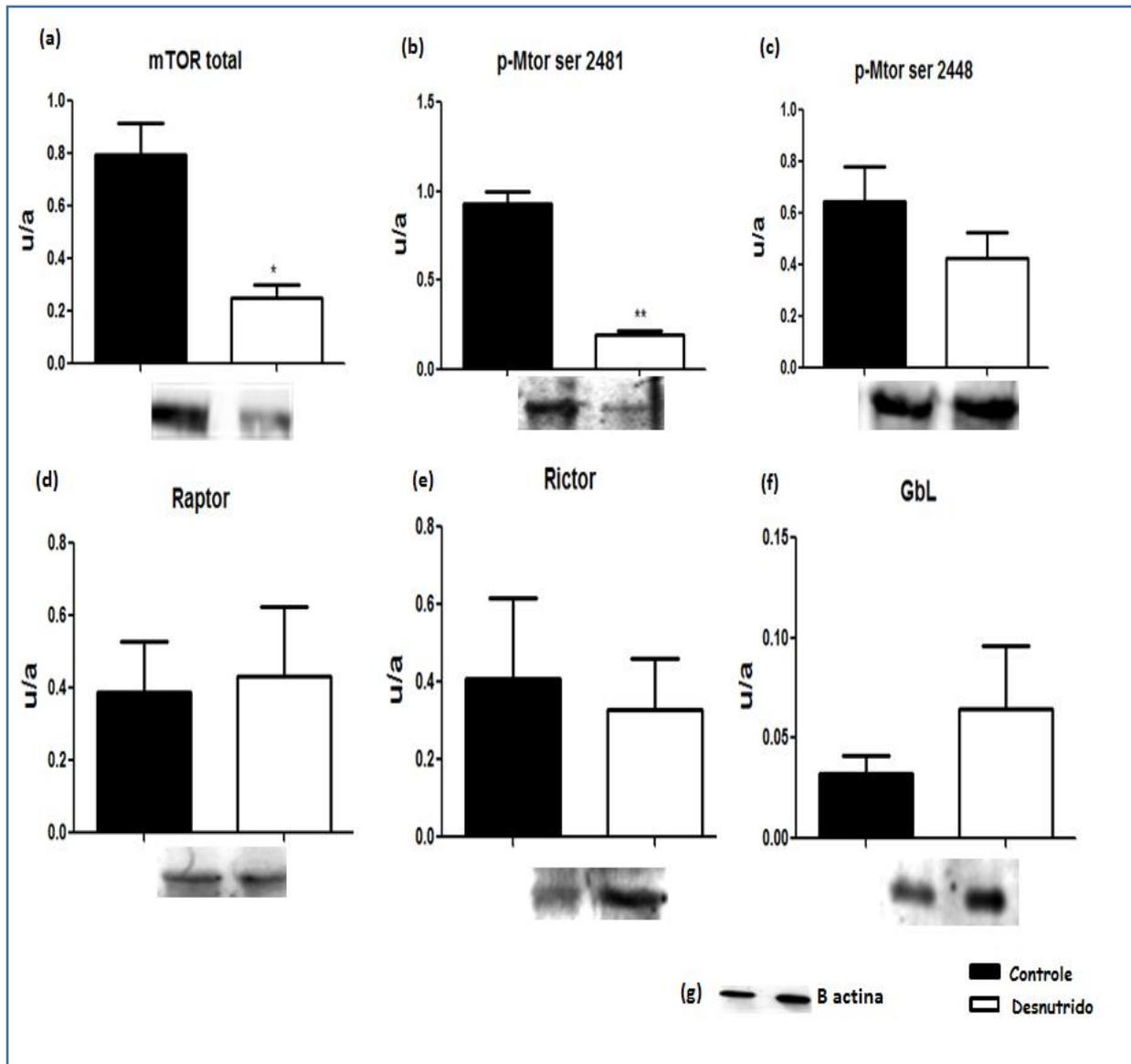


Figure 12. Efeito da desnutrição proteica nas proteínas envolvidas na sinalização autofágica em CTPHS de camundongos controle e desnutrido avaliados por Western Blotting. (a) Resultados da determinação de mTOR total, (b) Demonstra o resultado da porção fosforilada (p-mTOR ser 2481) (c) p-mtor ser 2448 (d) Determinação dos resultados de Raptor, (e) Rictor e (f) Gβ1 (g) imagem das proteínas com seu respectivo controle β-actina pelo ImageQuant* ($p \leq 0,05$). ** $p < 0,01$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle. * indica a diferença significativa entre o grupo controle e no grupo desnutrido. No experimento foi utilizado $n = 6$ para o grupo controle e $n = 6$ para o grupo desnutrido. n refere-se ao número total de animais utilizados no ensaio.

5.7 Desnutrição aumenta atividade autofágica em células-tronco/progenitoras hemopoéticas Lin⁻

Não houve diferença significativa das proteínas Atg7 e Bcl-2 (Figura 13 A e B) nas CTPHS em animais desnutridos, em relação ao grupo controle. Já a quantidade da proteína LC3 II apresentou-se significativamente aumentada nos animais desnutridos em relação aos animais controle (Figura 13 C).

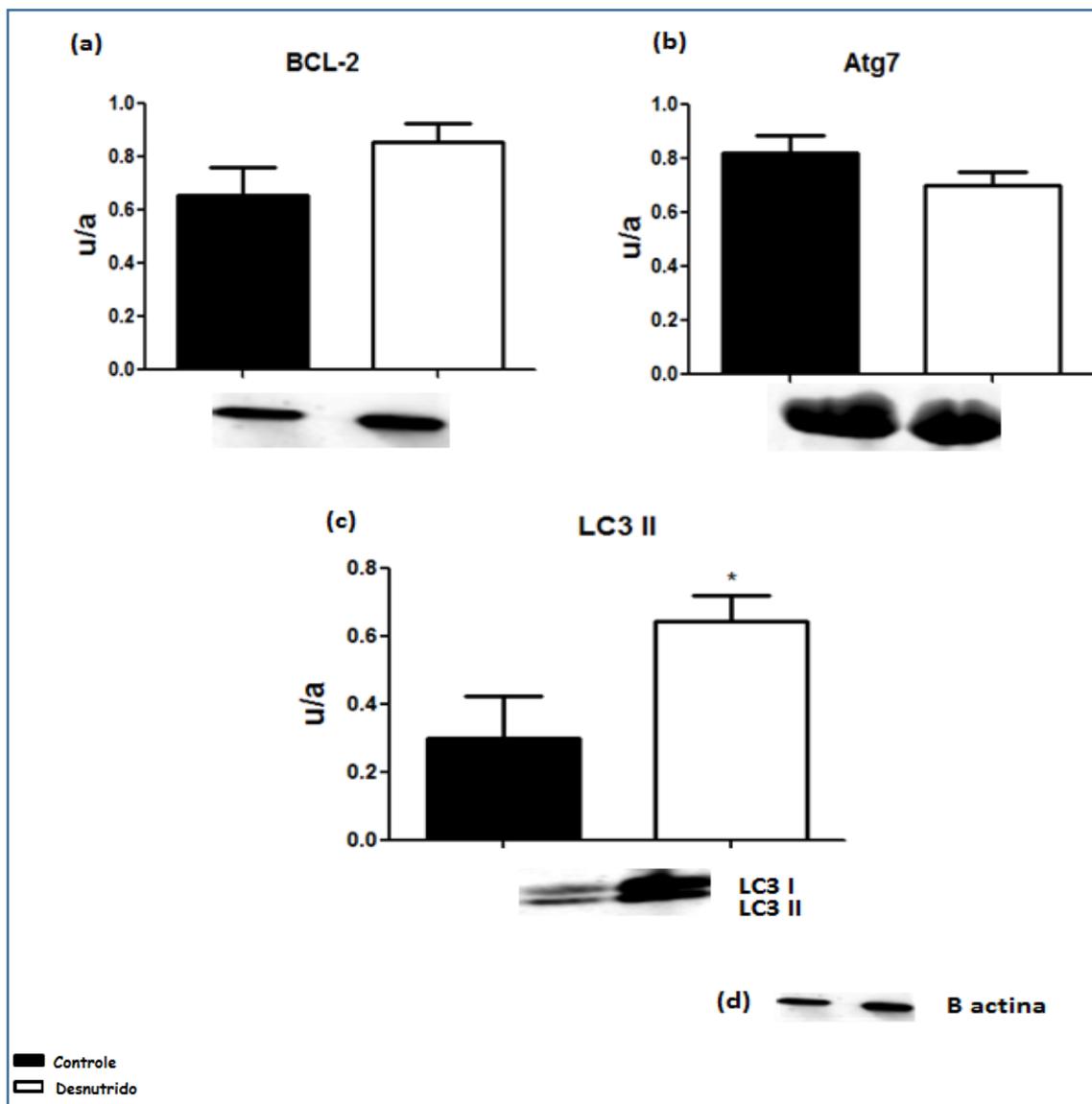


Figure 13. Efeito da desnutrição proteica nas proteínas envolvidas na sinalização autofágica em CTPHS de camundongos controle e desnutrido avaliados por Western Blotting .(a) Resultados da determinação de Bcl-2 .**(b)** Resultados da determinação de Atg7. **(c)** Resultados da determinação de LC3-II. **(d)** imagem das proteínas com seu respectivo controle β -actina pelo ImageQuant* ($p \leq 0,05$). * indica a diferença significativa entre o grupo controle e no grupo desnutrido. No experimento foi utilizado $n = 6$ para o grupo controle e $n = 6$ para o grupo desnutrido. n refere-se ao número total de animais utilizados no ensaio.

5.8 Análise da expressão gênica da autofagia em células-tronco/progenitoras hemopoéticas Lin⁻

O gene AKT 2 (figura 14 B) e GβL (figura 14 G) demonstrou diminuição da expressão de mRNA nos camundongos desnutridos quando comparado com o grupo controle, já o mRNA de AKT 1 (figura 14 A), mTOR 1 (TORC1) e mTOR 2 (TORC2) (figura 14 D), RICTOR (figura 14 E) RAPTOR (figura 14 F) e BECLIN (figura 14 H), BCL2 (figura 14 I) LC3 I (figura 14 J), LC3 II (figura 14 K) e Atg7 (figura 14 L) não demonstraram diferenças significativas entre os grupos controle e desnutrido.

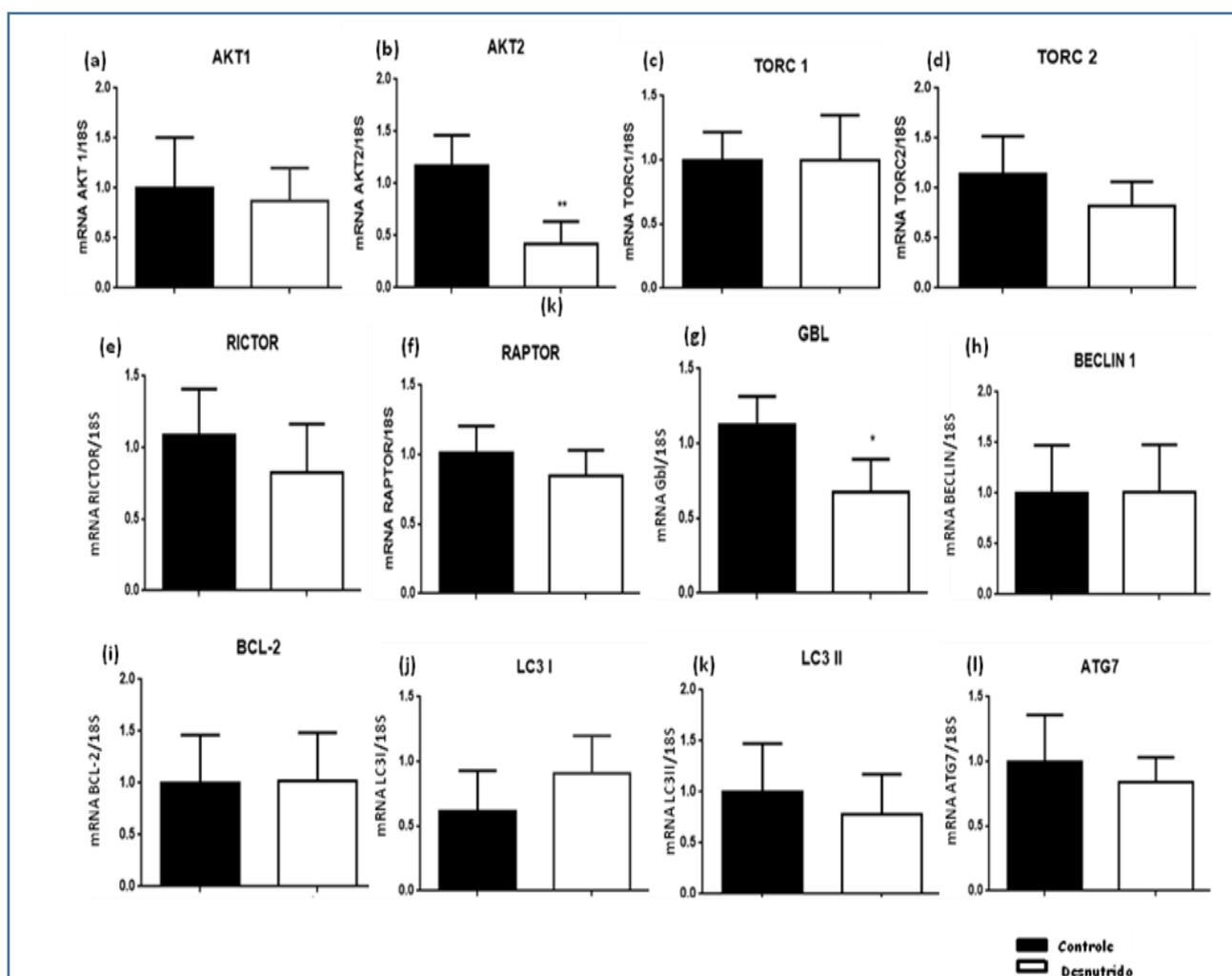


Figura 14. Efeito da desnutrição protéica na expressão gênica da autofagia. CTPHs do grupo de controle e desnutridos foi avaliada por RT-PCR. (figura a e b) demonstra os resultados da determinação de AKT1 e AKT2. **(figura c e d)** demonstra os resultados do mRNA de mTOR 1 (mTORC1) e mTOR 2 (TORC2). **(e)** Os resultados do mRNA de Rictor, **(f)** Raptor **(g)** GβL. **(h)** A determinação do mRNA de Beclin **(i)** Resultados do mRNA de Bcl2. **(Figura j e k)** Demonstra os resultados do mRNA de LC3 I e II. **(l)** Determinação do mRNA do Atg7. Para todos os genes foi utilizado 18 S como controle da amostra. * ($p \leq 0,05$) ** $p < 0,01$ quando comparado o grupo desnutrido com o grupo controle. * indica a diferença significativa entre o grupo controle e no grupo desnutrido. No experimento foi utilizado n = 6 para o grupo controle e n = 6 para o grupo desnutrido. n refere-se ao número total de animais utilizados no ensaio.

5.9 Desnutrição afeta a produção de CTH e CTPH

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com os anticorpos Lin⁻, CD90.1, Sca-1 e c-Kit para quantificação da CTH (Lin⁻, Sca-1+ e c-kit+) e CTPH (Lin⁻, c-kit+) do grupo desnutrido e controle. Durante a aquisição das células para a separação da LSK do camundongo controle, discriminamos os *doublets* (figura 15 A), em R1 selecionamos a população de linfócitos (figura 15 B), em R2 selecionamos a população de Lin⁻ e CD 90.1 (figura 15 C) e no R3 (figura 15 D), temos a população de CTH (Lin⁻, Sca-1+ e c-kit+) e no R4, figura 15 D, temos a população de CTPH (Lin⁻, c-kit+). Utilizamos a mesma estratégia de análise para as células dos camundongos desnutridos (figura 16). Observamos que houve diminuição significativa da população de CTH e CTPH em camundongos desnutridos em relação ao grupo controle (Figura 15 D e 16D), respectivamente (figura 17 A e 17 B).

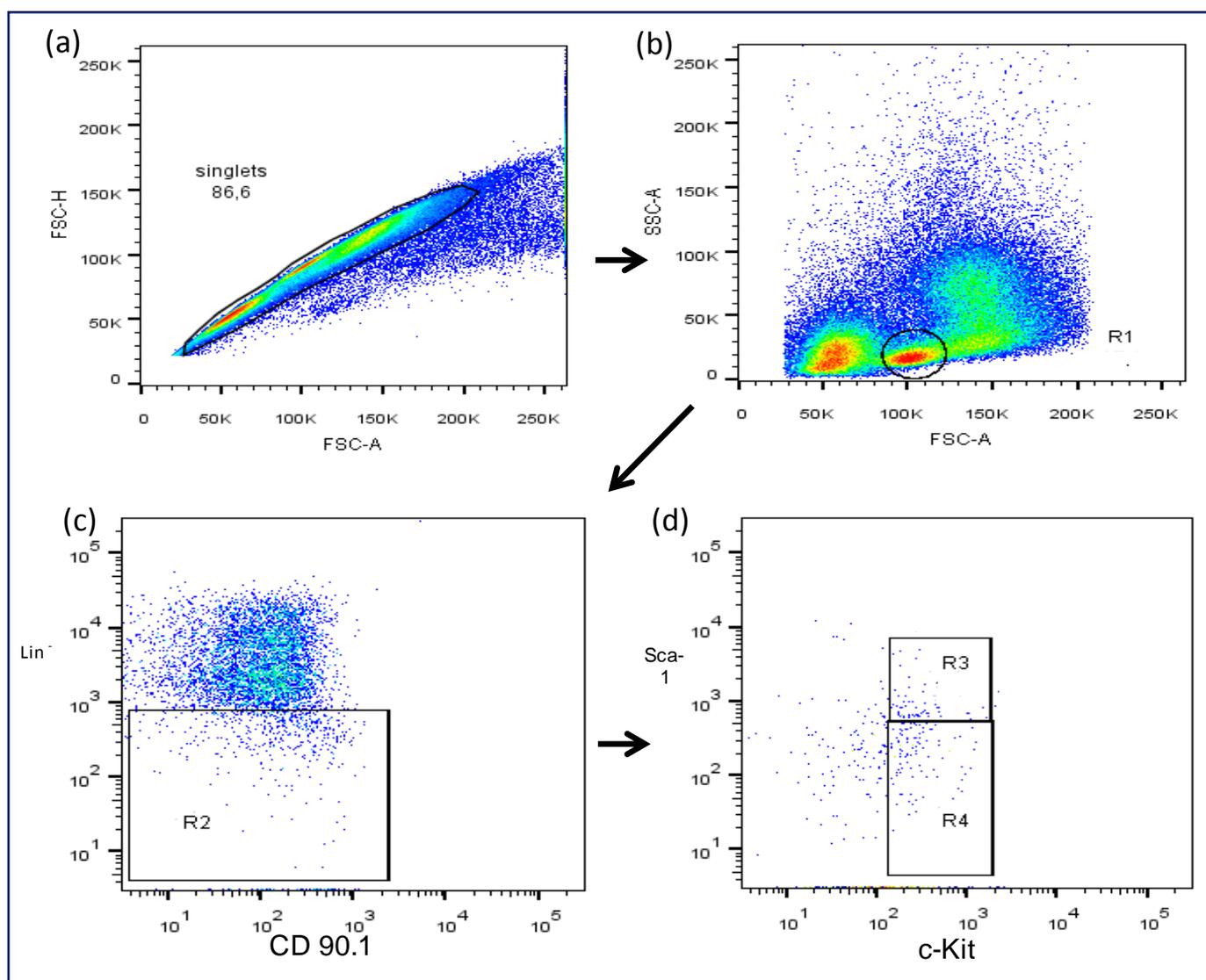


Figura15: Estratégia de análise para separação da CTH por cell sorting e quantificação das populações de CTH e CTPH do camundongo controle (a) Discriminação dos *doublets*, (b) R1, população de linfócitos (c) R2, população de Lin⁻ e CD90.1 (d) R3 população de LSK e R4 população de CTPH. Gráfico representativo de 1 único experimento R(região)

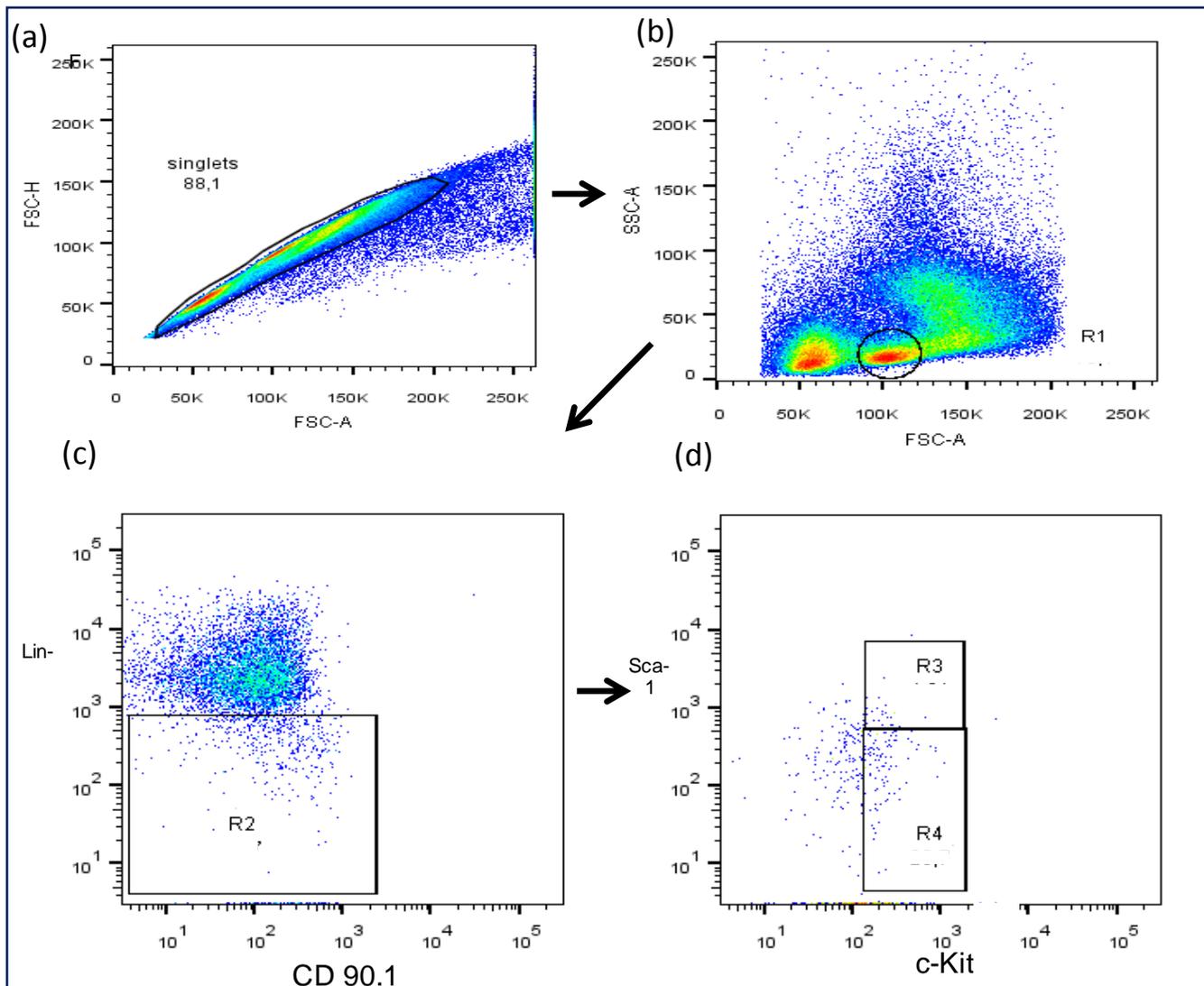


Figura 16: Estratégia de análise para separação da CTH por cell sorting e quantificação das populações de CTH e CTPH do camundongo desnutrido (a) Discriminação dos *doublers*, (b) R1, população de linfócitos (c) R2, população de Lin- e CD90.1 (d) R3 população de LSK e R4 população de CTPH. Gráfico representativo de 1 único experimento. R (region)

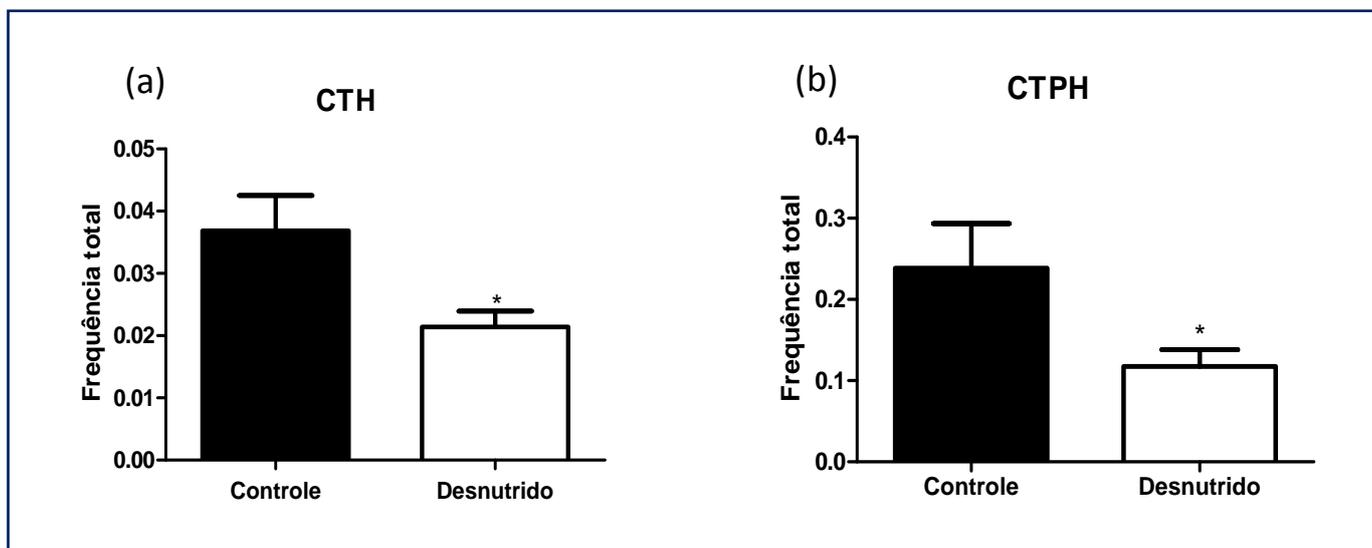


Figura 17: Efeito da desnutrição proteica na população de CTH e CTPH por citometria cell sorting (a) Quantificação de CTH (b) Quantificação de CTPH * ($p \leq 0,05$). * indica a diferença significativa entre o grupo controle e no grupo desnutrido. No experimento foi utilizado (n = 15) para o grupo controle e (n = 15) para o grupo desnutrido. O número entre parênteses refere-se ao número de animais utilizados. utilizados no ensaio.

5.10 Avaliação dos processos apoptóticos e necróticos da CTH e CTPH por citometria de fluxo

Conforme estratégia de análise mostrada nas figuras 15 e 16, células da medula óssea de ambos os grupos, foram marcadas com Anexina V e 7-AAD para avaliação dos processos apoptóticos e ou necróticos. Na figura 18A e 18B, podem ser visto os controles positivo e negativo do experimento. Conforme figuras 18C e D, não houve diferenças significativas entre os grupos na avaliação da CTH e também na houve diferenças entre os grupos na CTPH (Figura 18E e 18F), respectivamente figuras 19.

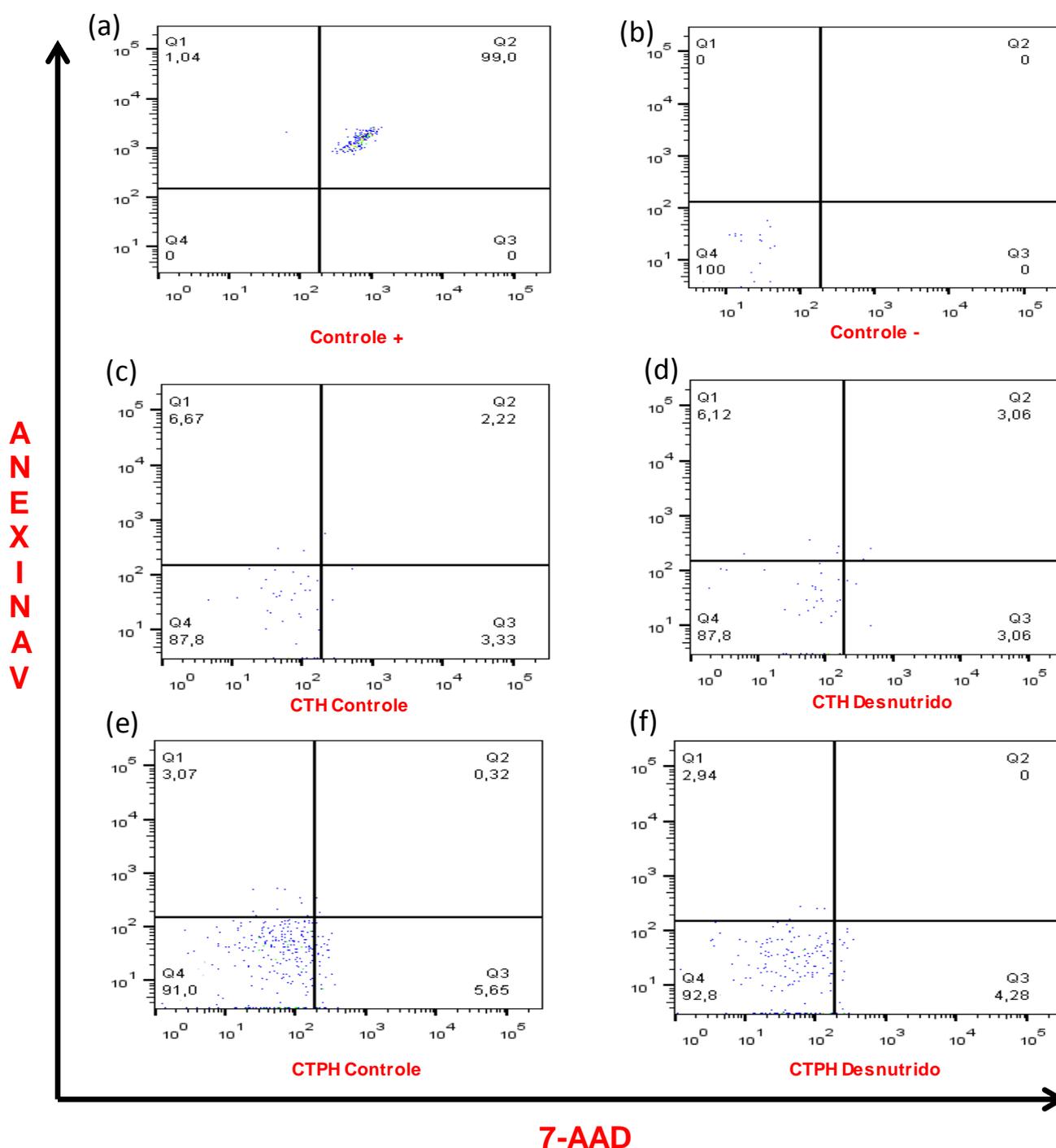


Figura 18: Avaliação da apoptose e necrose das populações de CTH e CTPH do camundongo controle e desnutrido (a) Controle positivo células estimuladas com 5 um de Camptotecina, (b) Controle Negativo (c) CTH controle (d) CTH desnutrido (e) CTPH controle e (f) CTPH desnutrido. Gráfico representativo de 1 único experimento. (Q1) células marcadas com Anexina V- células em apoptose inicial. (Q2) células duplamente marcadas com Anexina V e 7-AAD- células em apoptose tardia e necrose. (Q3) células marcadas com 7-AAD- células em necrose. (Q4) células viáveis.

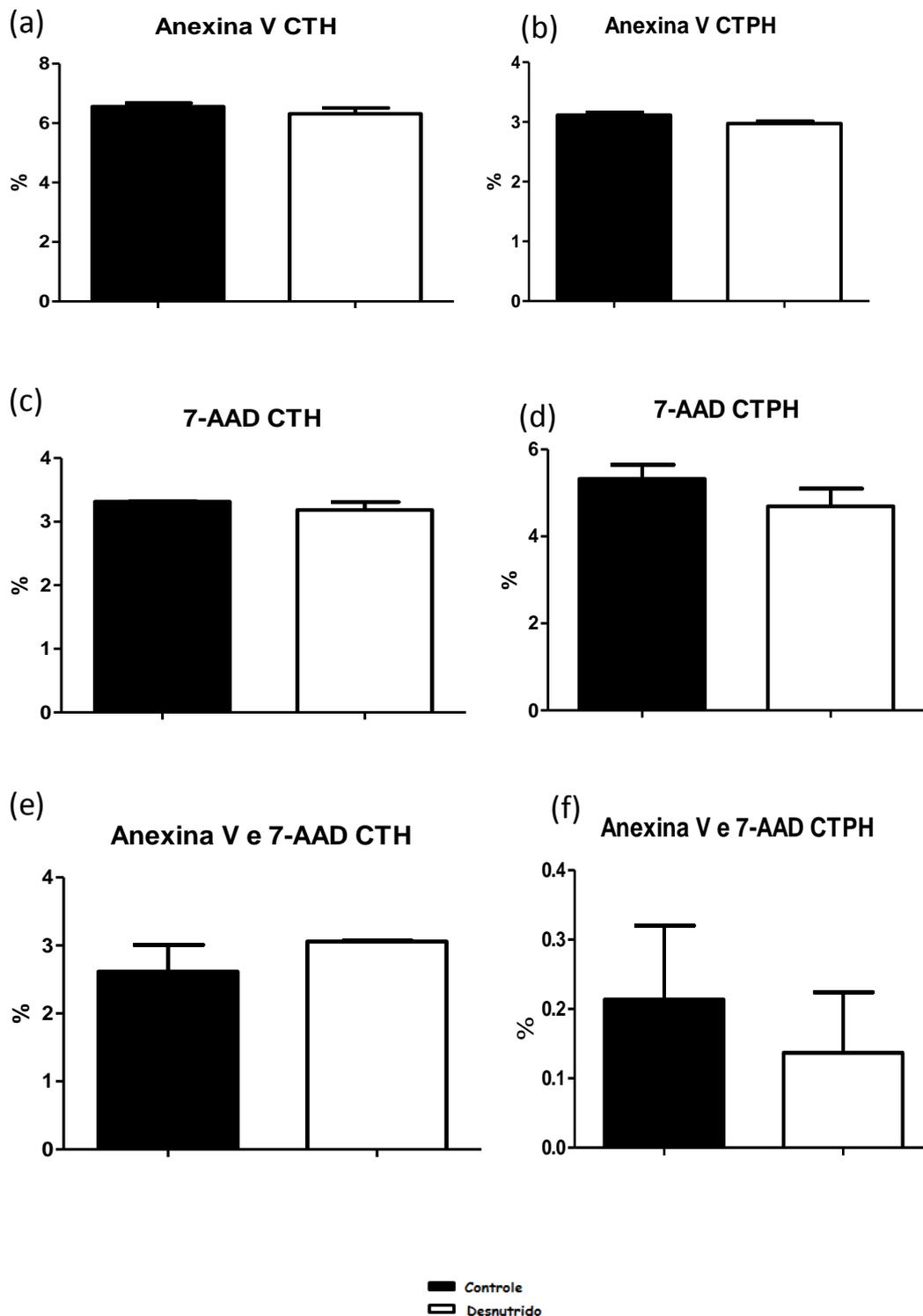


Figura 19: Avaliação da apoptose e necrose nas populações de CTH e CTPH por citometria (a) Avaliação da apoptose inicial da CTH (b) Avaliação da apoptose inicial da CTPH, (c) Avaliação da necrose da CTH, (d) Avaliação da necrose da CTPH, (e) Avaliação da apoptose tardia e necrose na CTH, (f) Avaliação da apoptose tardia e necrose na CTPH. No experimento foi utilizado (n = 5) para o grupo controle e (n = 5) para o grupo desnutrido. O número entre parênteses refere-se ao número total de animais utilizados no ensaio.

5.11 Avaliação de LC3 na CTH por microscopia de fluorescência

Conforme estratégia do *cell sorting* (figuras 15 e 16), CTH foi marcada com Cyto-ID™ Green Autophagy, para verificação da presença de autofagia. Utilizamos o filtro FITC para observar a presença do sinal autofágico (vacúolos na região perinuclear da célula ou pelo citoplasma) e utilizamos o filtro DAPI para visualização do núcleo. A população de Cyto-ID™ Green apresentam vesículas co-localizadas com LC3, marcador específico encontrado no autofagossomo.

Nas figuras (20 A ,B, C e D) observamos citoplasma e núcleo respectivamente, porém não detectamos a presença de vacúolos no grupo controle. Já nas figuras (21 A ,B, C, D) do animal desnutrido, observamos a presença de vacúolos autofágicos (seta vermelha) . Este experimento foi realizado somente para análise qualitativa.

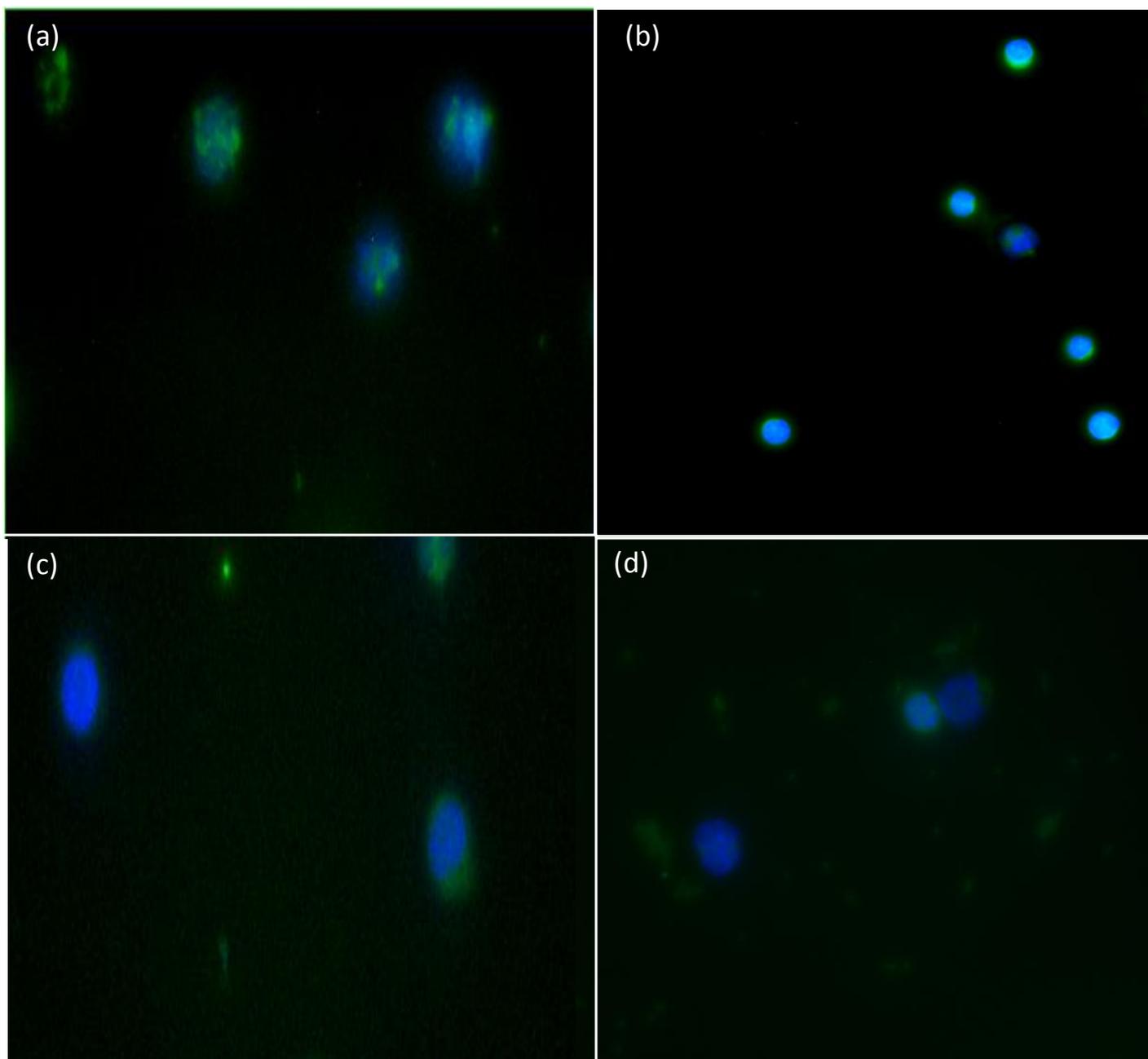


Figura 20: Avaliação da autofagia na CTH por microscopia de fluorescência (Figuras a,b,c e d) demonstram a análise da autofagia em camundongos controles. Em verde citoplasma e em azul o núcleo. No experimento foi utilizado (n = 5) para o grupo controle. O número entre parênteses refere-se ao número de animais utilizados. de animais utilizados no ensaio.

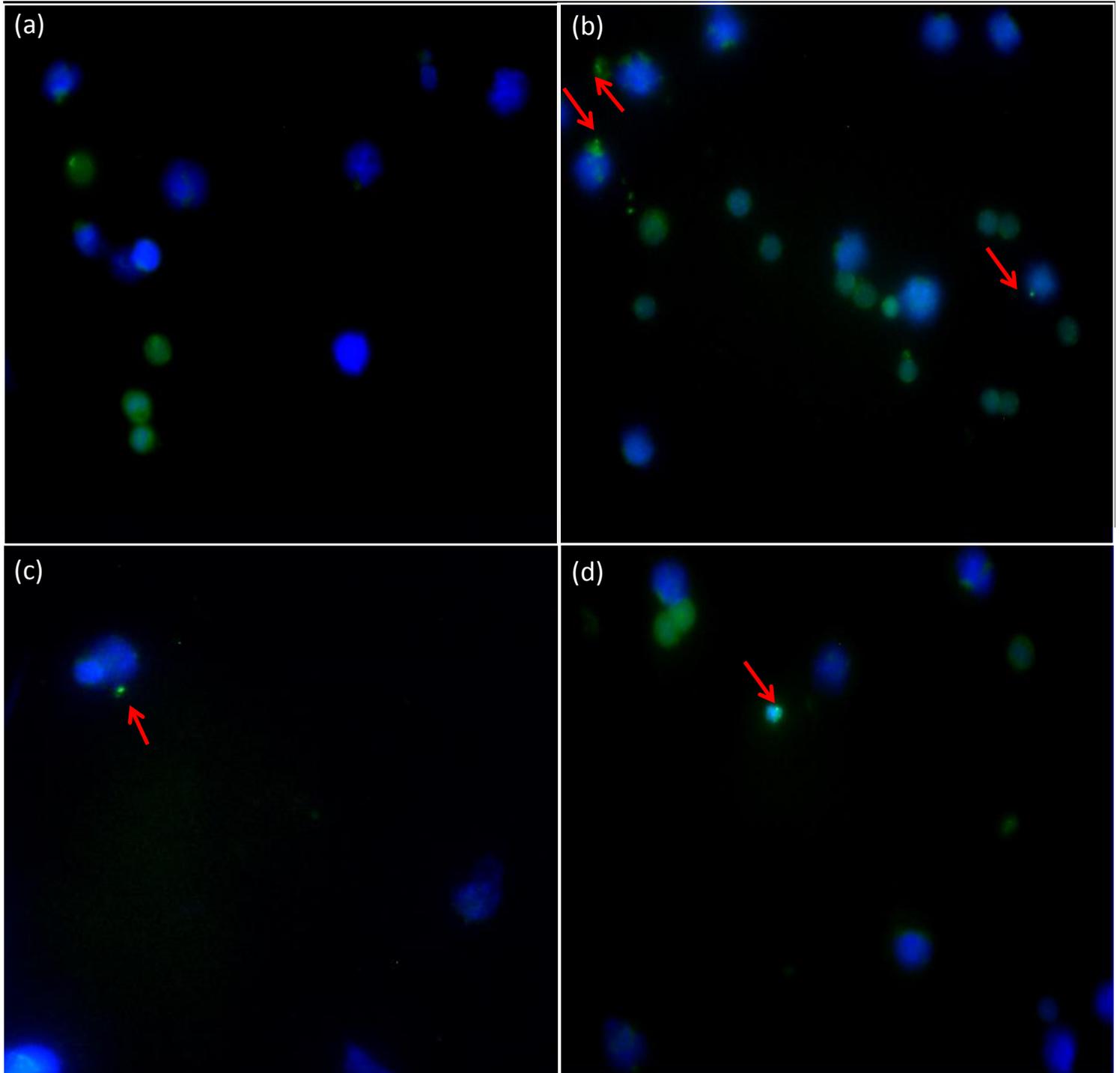


Figura 21: Avaliação da autofagia na CTH por microscopia de fluorescência (Figuras a,b,c e d) demonstram a análise da autofagia em camundongos desnutridos. Em verde citoplasma e em azul o núcleo. No experimento foi utilizado (n = 5) para o grupo d. O número entre parênteses refere-se ao número de animais utilizados. de animais utilizados no ensaio.

6.0 RESULTADOS CAGCRE ATG7 flox/flox

6.1 Genotipagem dos camundongos Cag Cre Atg7 flox/flox, yfp/yfp

Conforme descrito no item 3.2.2 realizamos a genotipagem dos camundongos CAG Cre Atg7 flox/flox. Conforme figura 22, setas vermelhas representam amostras Cag Cre+ e seta amarela Cag Cre – (não marca banda) e todas as amostras são Atg7 flox/flox e yfp/yfp.

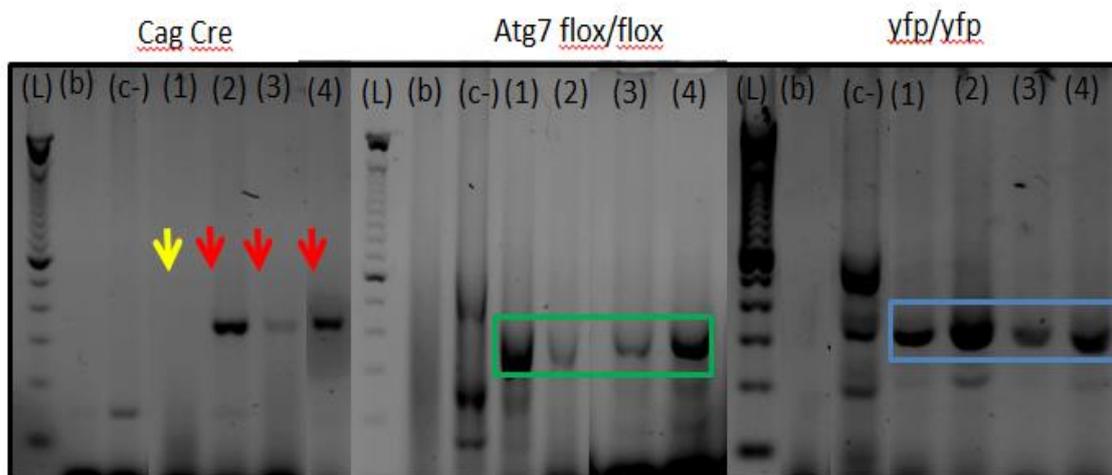


Figura 22. Genotipagem de camundongos CAG Cre Atg7 flox/flox. Observam-se as bandas obtidas da eletroforese dos produtos da PCR. As amostras 2,3 e 4 representam camundongos Cag Cre + (seta vermelha) e amostra 1 (seta amarela) Cag Cre – Todas as amostras de 1 a 4 são Atg7 flox/ flox(retângulo verde) e yfp/yfp (retângulo em azul) (L) Ladder 100 pb (Invitrogen).(b) Branco da amostra (C-) Controle negativo (camundongo selvagem) banda de 200 pb. Amostras de animais genotipados. n =1 Cre- e n=3 Cre+.

6.2 Expressão do Atg7 e LC3

Conforme descrito no item 3.2.14, realizamos o Western Blotting das proteínas Atg7 e LC3 nos camundongos CAG Cre Atg7 Flox nas células totais da óssea. Observamos na figura 23, que houve uma diminuição da expressão do Atg7, no grupo CAG Cre+ Atg7 flox/flox que receberam tamoxifeno por 5 dias consecutivos, após 14 dias de recombinação. Na figura 23, também podemos observar a diminuição da expressão da proteína LC3 I e II (proteína envolvida na formação do fagóforo e autofagossomo) no grupo Atg7 flox/flox.

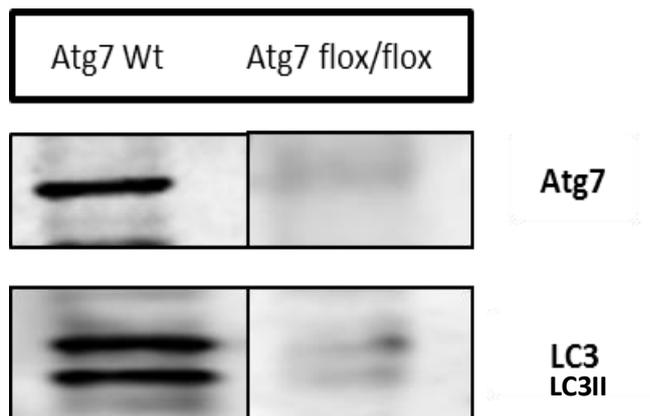


Figura 23. Expressão de ATG7 e LC3 nos camundongos CAG Cre Atg7 flox/flox. Resultado da determinação da expressão de Atg7 WT e ATG7 flox/flox em células totais de medula óssea.

6.3 Avaliação do estado nutricional

O peso corpóreo de cada grupo, conforme descrito no item 3.1.4 foi monitorado a cada 48 horas, verificando-se que ambos os grupos ingeriram a mesma quantidade de ração. No entanto, o consumo de proteína do grupo desnutrido foi significativamente menor em todos os grupos em relação ao grupo controle, uma vez que a ração hipoproteica oferecida ao grupo desnutrido possui apenas 2% de proteína. Verificou-se que os animais do grupo desnutrido Cre- sem TAM (figura 24 A) apresentaram perda significativa do peso corporal em relação ao grupo controle, cerca de $-20,16 \pm 1.82$ (média \pm desvio padrão) e grupo controle $+10,11 \pm 1.60$, enquanto que os animais do grupo Cre+ sem TAM (figura 24 B) apresentaram perda significativa do peso corporal em relação ao grupo controle, cerca de $-25,12 \pm 1.71$ (média \pm desvio padrão) e grupo controle $+10,08 \pm 1.42$. Já o grupo Wt Cre - com TAM (figura 24 C) apresentaram perda significativa do peso corporal em relação ao grupo controle, cerca de $-26,07 \pm 1.49$ (média \pm desvio padrão) e grupo controle $+15,11 \pm 1.34$, enquanto que os camundongos do grupo KO Cre+ com TAM (figura 24 D), apresentaram perda significativa do peso corporal em relação ao grupo controle, cerca de $-36,10 \pm 1.68$ (média \pm desvio padrão) e grupo controle $+15,07 \pm 1.09$. As concentrações séricas (figura 24) de proteínas totais e a albumina de todos os grupos, foram significativamente menores em todos os grupos desnutridos com relação aos grupos controles (figuras 24 E e 25F).

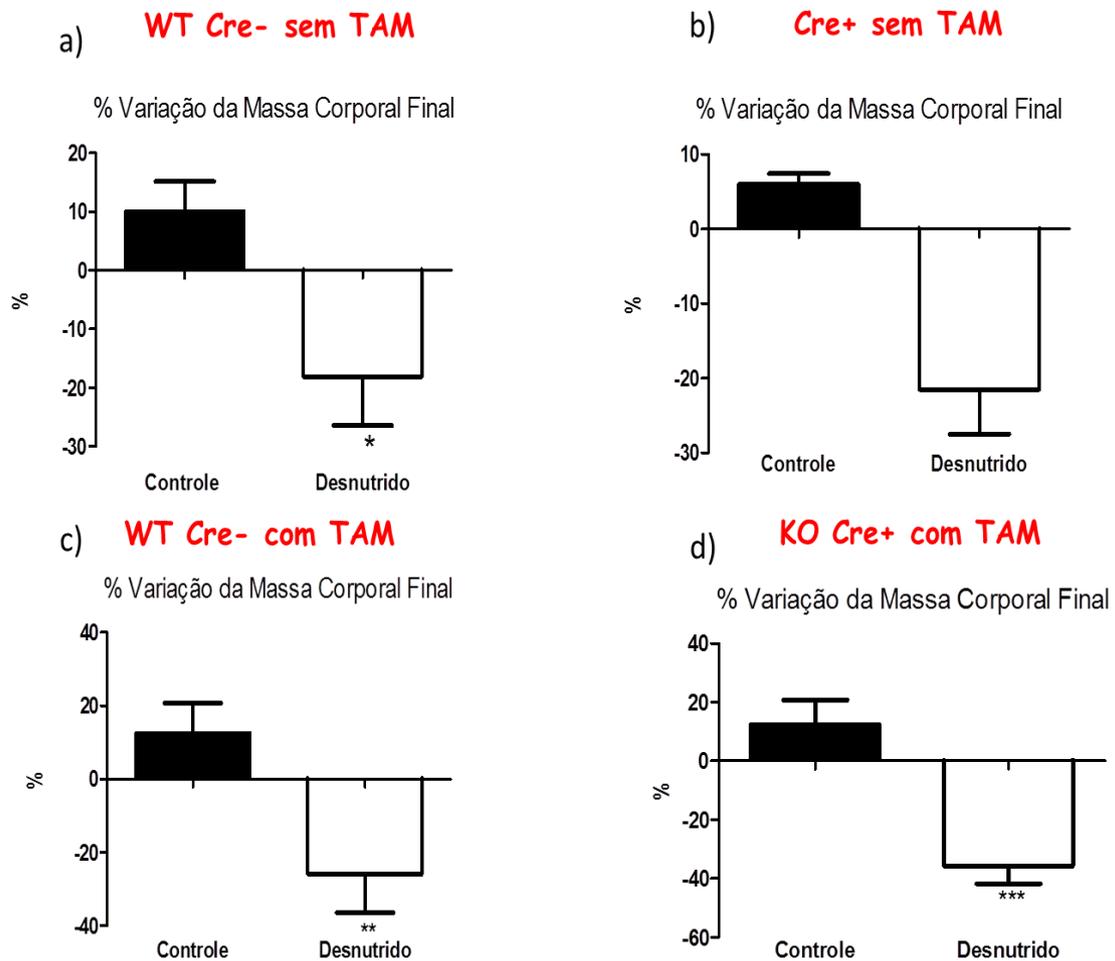


Figura 24: % Variação do peso corporal durante o período de 5 semanas de indução à desnutrição de todos os grupos (a): Variação do peso corporal do grupo WT Cre- sem TAM **(b):** Variação do peso corporal do grupo WT Cre+ sem TAM **(c):** Variação do peso corporal do grupo WT Cre- com TAM **(d):** Variação do peso corporal do grupo KO Cre++ com TAM ..Foi utilizado (n=10) grupo controle e de animais do grupo desnutrido (n=10). Os resultados estão expressos por média \pm desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *p<0,05, **p<0,01 *** p < 0, 001 quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

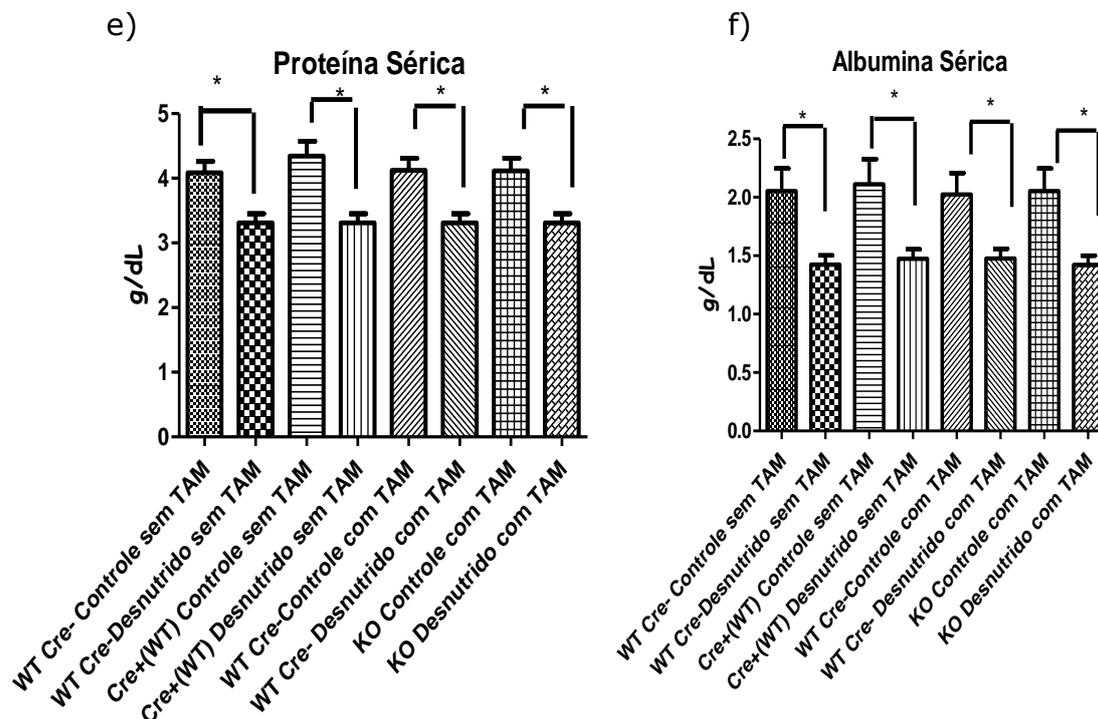


Figura 24: Valores das concentrações de proteína e albumina sérica (e): Concentração das proteínas totais (g/dL) e **(f):** Concentração da albumina sérica (g/dL), de todos os grupos. Foi utilizado n=10 para cada grupo. Os resultados estão expressos por média \pm desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle.

6.4 Celularidade da Medula óssea

A celularidade óssea é afetada no grupo Cre+ e Cre- desnutrido sem Tam, dados que correspondem aos resultados do modelo animal C57Bl/6J (figura 25 e figura 10). Observamos aumento da celularidade óssea no grupo Cre- Controle com TAM com relação ao grupo (Cre-) desnutrido com TAM, KO controle e KO desnutrido (figura 25). Portanto, células da medula óssea com ATG7 (autofagia ativa) que recebem ração controle possuem maior quantidade de células totais com relação ao grupo sem autofagia que recebe ração normoproteica e ou hipoproteica. A análise diferencial demonstrou em todos os grupos desnutridos baixa concentração de hemoglobina (Hb), exceto grupo KO com TAM, não houve diferenças significativas entre o grupo KO controle (tabela 14), entretanto, ao observamos no grupo KO desnutrido com TAM, houve aumento na quantidade de leucócitos.

Celularidade óssea

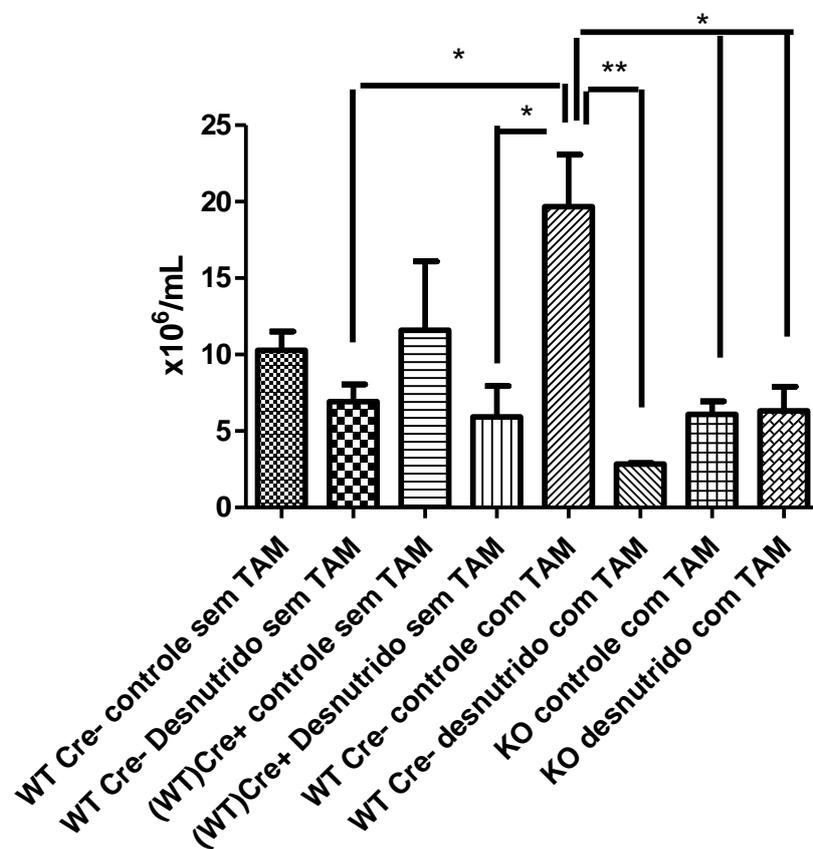


Figura 25: Celularidade óssea. Número total de células nucleadas da medula óssea de todos os grupos Foi utilizado n=10 para cada grupo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *p<0,05 e **p<0,01

Parâmetros	Eritograma									
	Macho					Macho				
	WT (Cre-) sem TAM		WT (Cre+) sem TAM		(WT)Cre- com TAM	WT (Cre-) sem TAM		WT (Cre+) sem TAM		(WT)Cre- com TAM
	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido	Controle	Desnutrido
Hemácias (x10 ⁶ /mm ³)	5.895 ± 0.587	4.180 ± 0.880	6.203 ± 0.305	5.156 ± 0.158 *	6.473 ± 0.292	7.425 ± 0.025	6.018 ± 0.331	6.258 ± 0.283	6.018 ± 0.331	6.258 ± 0.283
Volume Hematócrito (%)	23.90 ± 2.240	20.00 ± 0.600	24.77 ± 1.684	20.08 ± 0.322 *	26.37 ± 1.11	26.65 ± 0.150	23.75 ± 0.977	24.30 ± 1.360	23.75 ± 0.977	24.30 ± 1.360
Hb(g/dl)	8.533 ± 0.441	6.200 ± 0.702 *	8.267 ± 0.484	6.840 ± 0.120 *	9.567 ± 0.067	8.350 ± 0.150**	8.050 ± 0.328	7.825 ± 0.118	8.050 ± 0.328	7.825 ± 0.118
VCM(fl)	40.50 ± 0.645	40.50 ± 2.500	39.67 ± 0.882	39.20 ± 0.489	40.67 ± 0.333	38.50 ± 0.500*	40.25 ± 0.479	38.75 ± 0.629	40.25 ± 0.479	38.75 ± 0.629
HCM(pg)	13.60 ± 0.387	13.80 ± 0.436	13.33 ± 0.120	13.20 ± 0.234	14.23 ± 0.033	13.05 ± 0.050 ***	13.48 ± 0.221	13.13 ± 0.314	13.48 ± 0.221	13.13 ± 0.314
CHCM(%)	33.43 ± 0.487	34.33 ± 0.895	33.70 ± 0.251	33.98 ± 0.272	34.97 ± 0.233	34.15 ± 0.050	33.90 ± 0.273	33.95 ± 0.686	33.90 ± 0.273	33.95 ± 0.686
Reticulócitos										
Plaquetas (x10 ³ /mm ³)	320.3 ± 5.239	339.0 ± 34.00	317.4 ± 16.39	359.5 ± 6.68 *	482.5 ± 94.50	438.5 ± 11.50	461.0 ± 21.00	484.0 ± 77.6	461.0 ± 21.00	484.0 ± 77.6
Leucócitos (/mm ³)	1.075 ± 0.377	0.700 ± 0.252	1.333 ± 0.319	0.6200 ± 0.116*	0.7667 ± 0.145	0.7500 ± 0.050	0.700 ± 0.058	1.600 ± 0.252*	0.700 ± 0.058	1.600 ± 0.252*

Tabela 14. Valores do número total de hemácias, concentração de hemoglobina, volume hematócrito e leucócitos de todos os grupos CAG CRE. Foi utilizado n=6 em cada grupo. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. * p<0,05 ** p<0,01 *** p < 0, 001 quando comparado com o grupo controle. * p<0,05 *** p < 0, 001 quando comparado o grupo desnutrido ao grupo controle

6.5 A produção de CTH é afetada na ausência da autofagia submetida à desnutrição .

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com os anticorpos específicos para CTH, conforme item 3.2.10. Demonstramos aumento na produção da CTH no grupo WT (Cre+) e grupo KO controle com TAM com relação aos outros grupos (figura 26 A). Entretanto, a célula-tronco hemopoética com ausência da autofagia submetida à desnutrição proteica foi mais afetada (KO desnutrido com TAM) ao compararmos com o grupo deficiente para autofagia submetido a ração normoproteica (KO Control com TAM). Já na produção de CTPH, observamos diminuição na produção nos grupos WT (Cre-) sem TAM e WT (Cre+) submetidos à desnutrição. Na figura 26 B , podemos observar que houve aumento da produção de KO Desnutrido com TAM com relação ao grupo WT Cre+ sem TAM desnutrido.

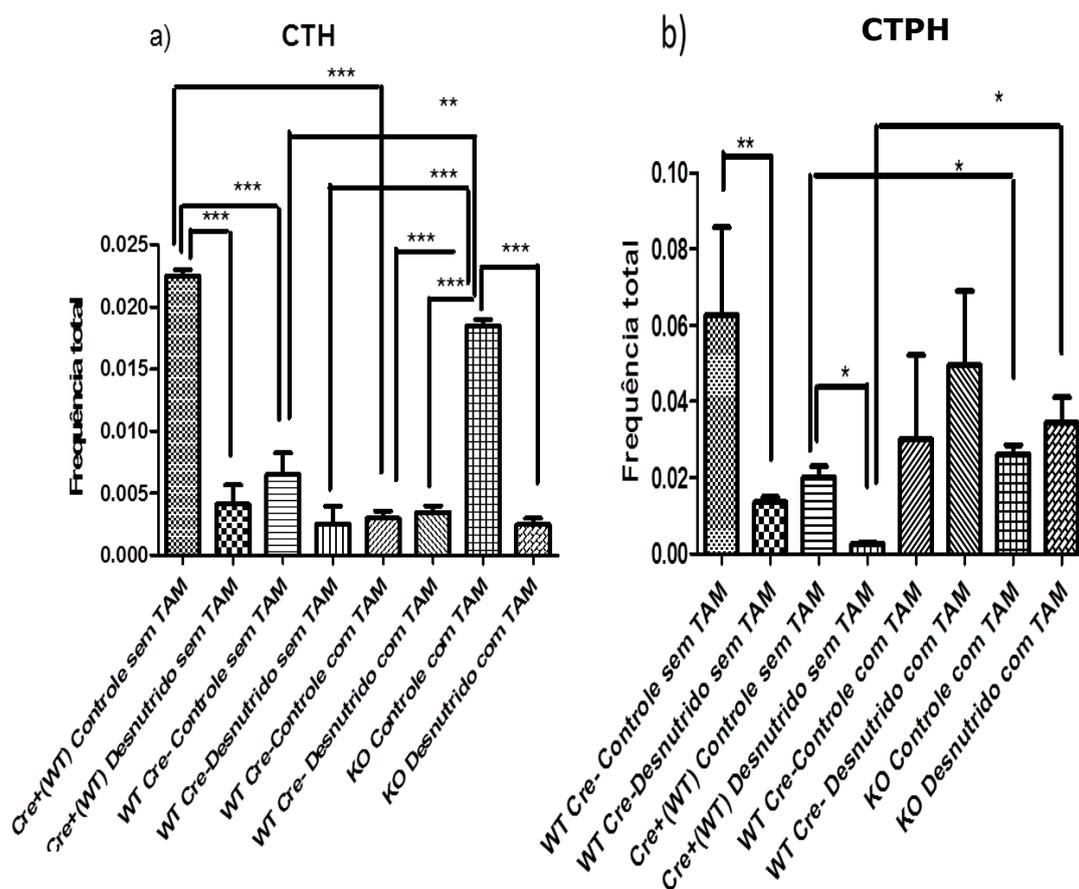


Figura 26. Representa a frequência total de CTH e CTPH (a) Quantificação da CTH em todos os grupos CAG CRE (b) Quantificação da CTPH em todos os grupos CAG CRE . Teste tw o-way ANOVA n=6 para todos os grupos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *p<0,05 , **p<0,01 e ***p<0,001.

6.6 Morte celular na CTH e CTPH

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com os anticorpos específicos para CTH e Anexina V, conforme item 3.2.11. Demonstramos aumento da apoptose inicial (Figura 27 A) no grupo KO desnutrido com TAM ao compararmos ao grupo KO Control com TAM. Não houve diferenças significativas na marcação com 7AAD, entretanto, na figura 27 C, podemos observar aumento da apoptose tardia no grupo KO desnutrido com TAM ao grupo KO Control com TAM, também encontramos aumento da apoptose tardia no grupo WT (Cre-) com TAM.

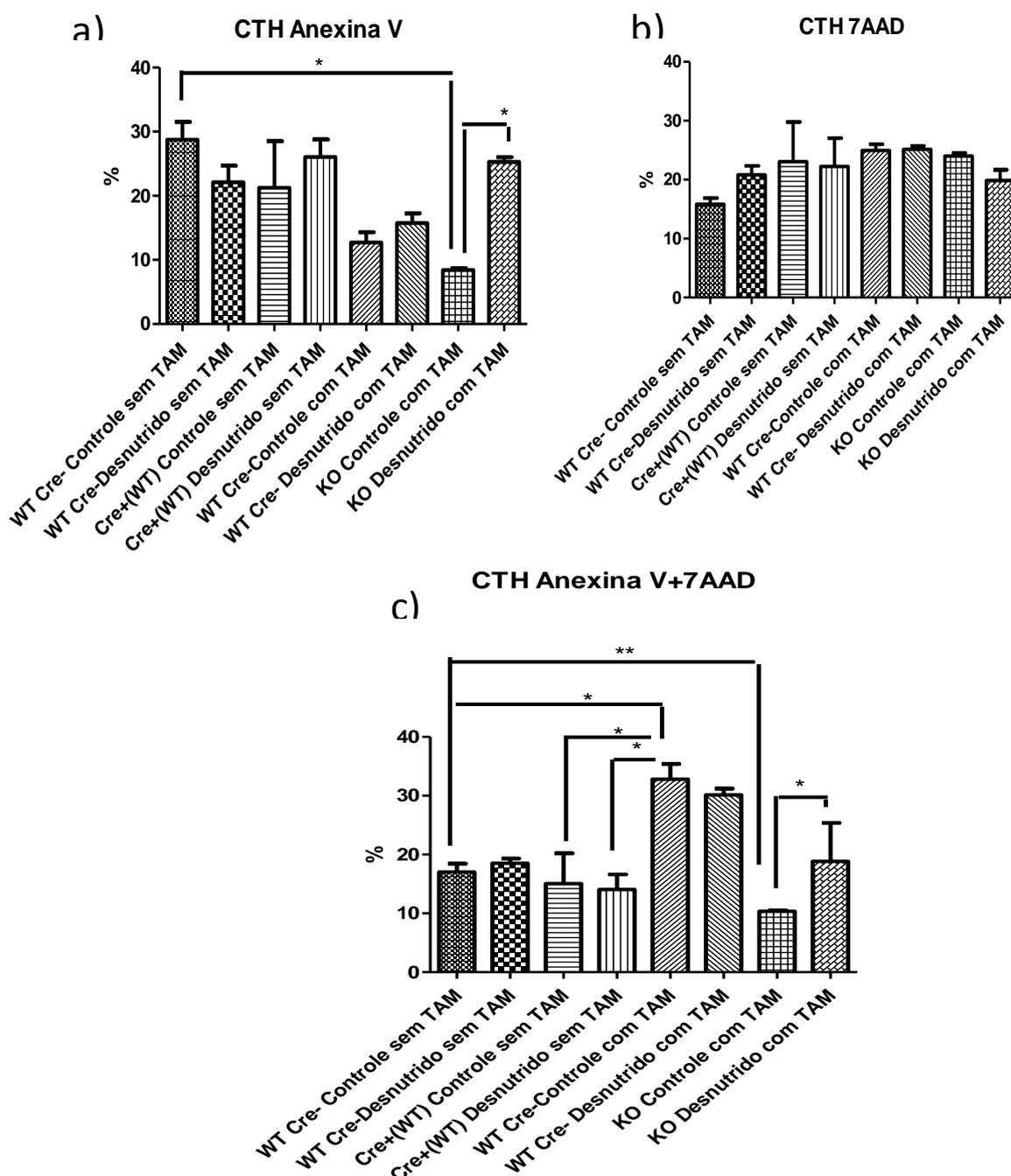


Figura 27. Representa a morte celular de CTH (a) Quantificação da Anexina V na CTH em todos os grupos CAG CRE (b) Quantificação do 7AAD em todos os grupos CAG CRE (c) Quantificação da Anexina V + 7AAD em todos os grupos CAG CRE. Teste tw o-way ANOVA n=6 para todos os grupos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *p<0,05, **p<0,01

6.7 Avaliação do Ciclo Celular na CTH

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com os anticorpos específicos para CTH e Anexina V, conforme item 3.2.13. Demonstramos aumento de células CTH na fase G0/G1 grupo KO desnutrido com TAM com relação ao grupo KO Controle com TAM (figura 28 A). Já, na figura 28 B, observamos aumento de CTH na fase S/G2/M no grupo WT (Cre+) Desnutrido sem TAM com relação ao grupo WT (Cre -) Desnutrido sem TAM e Cre (+) Controle sem TAM, entretanto, houve diminuição da CTH na fase S/G2/M no grupo KO desnutrido com TAM com relação ao grupo KO controle com TAM (figura 28 B).

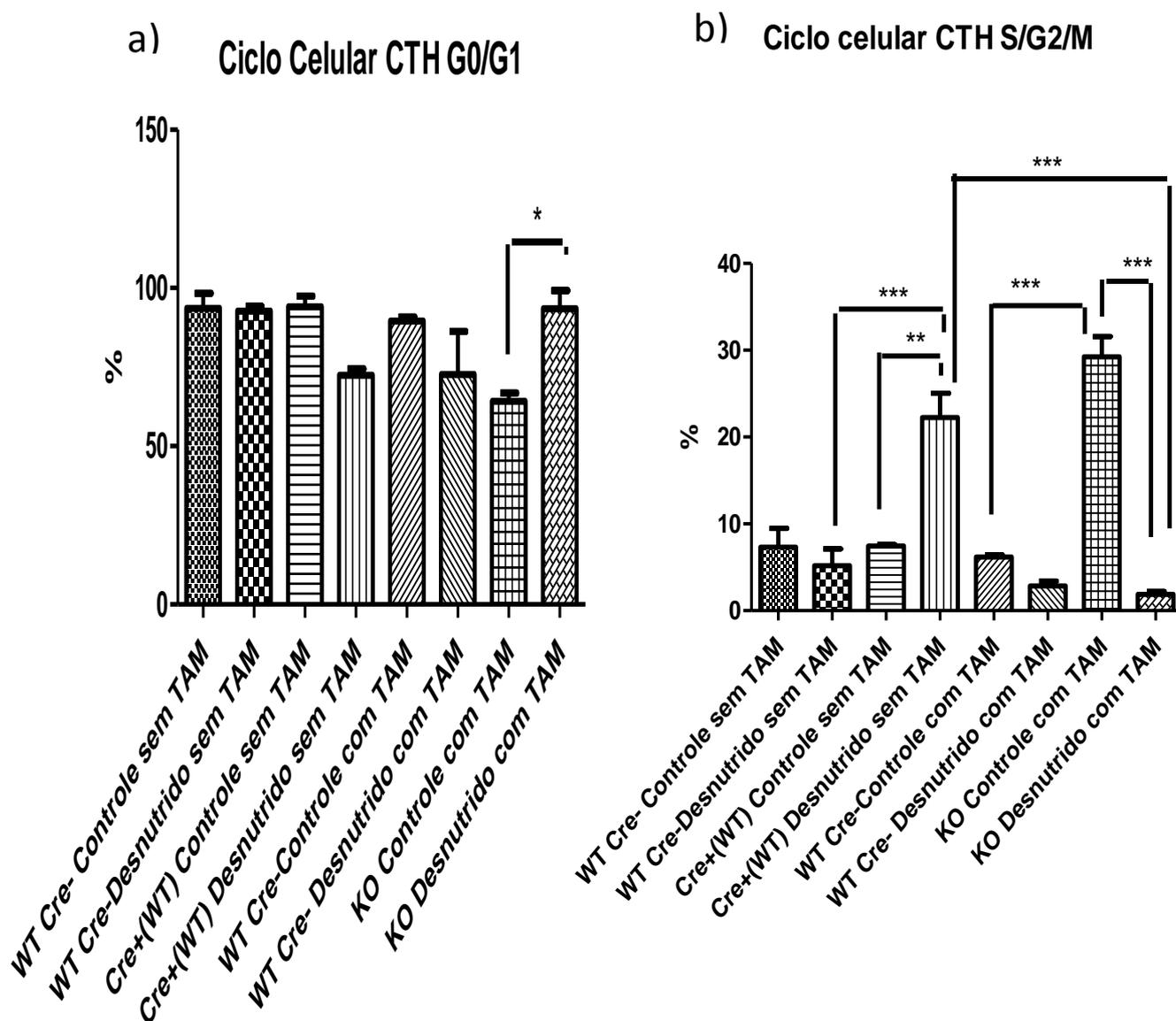


Figura 28 Representa o ciclo celular da CTH (a) Quantificação da CTH na fase G0/G1 em todos os grupos CAG CRE (b) Quantificação da CTH na fase S/G2/M em todos os grupos CAG CRE. Teste two-way ANOVA n=6 para todos os grupos. O n indica o número de animais utilizados no experimento. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

7.0 RESULTADOS TG2

7.1 Ausência da TG2 afeta a celularidade óssea.

A celularidade óssea é afetada no grupo TG^{-/-} (KO) com relação ao grupo WT, entretanto, ao compararmos com o grupo KO *starvation* (Jejum 24 horas), observamos aumento da celularidade óssea com relação a TG^{-/-} sem privação (figura 29)

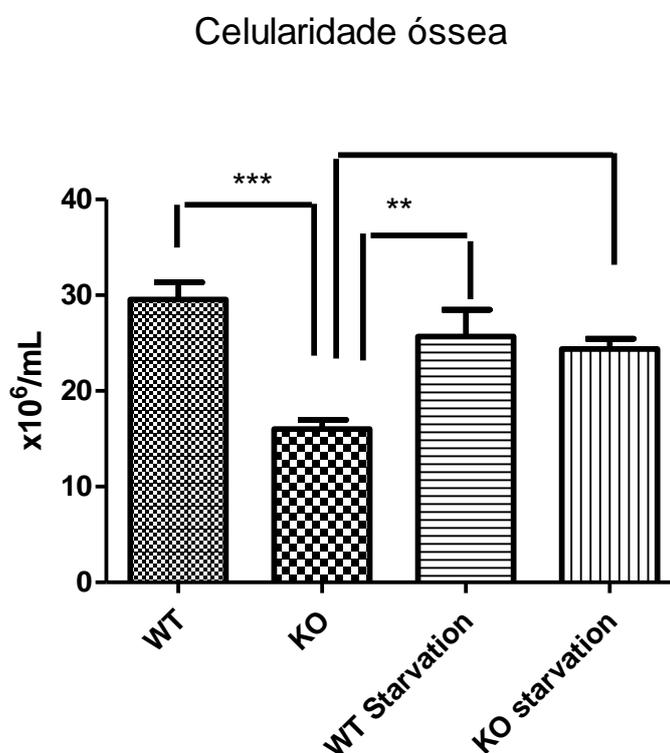


Figura 29: Celularidade óssea. Número total de células nucleadas da medula óssea de todos os grupos Foi utilizado n=6 para cada grupo. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão. O n indica o número de animais utilizados no experimento. **p<0,01 e ***p<0,001

7.2 Avaliação das proteínas envolvidas na sinalização autofágica e proliferação celular.

Conforme item 3.2.14, realizamos a extração de proteínas e analisamos as proteínas envolvidas na sinalização autofágica e na proliferação celular em células totais de medula óssea nos grupos WT e KO para TG2 sem privação. Demonstramos

que não houve expressão da TG2 no modelo KO e observamos aumento da expressão de LC3 II, p-MEK, p-44 Erk, p-42 Erk com diminuição de p62 nas células de medula óssea em TG^{-/-} (figura 30).

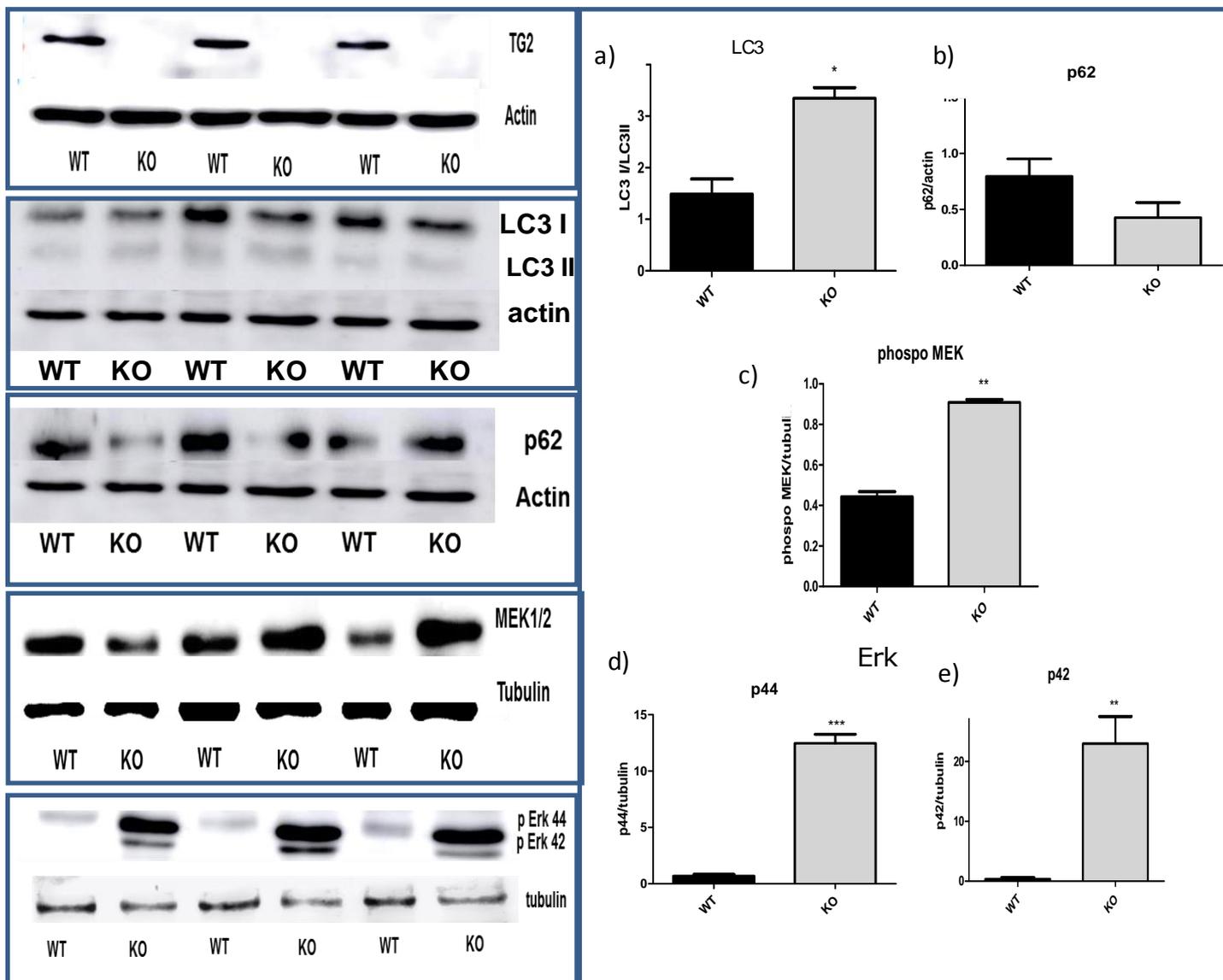


Figure 30. Efeito da TG2 nas proteínas envolvidas na sinalização autofágica e na proliferação em células totais de camundongos TG2 WT e KO avaliados por Western Blotting. (a) Resultados da determinação de LC3. (b) Resultados da determinação de p62 (c) Resultados da determinação de p-MEK. (d) Resultados da determinação de p-44 Erk (e) Resultados da determinação de p-442 Erk. Podemos observar também as imagens das proteínas com seu respectivo controle β -actina e ou tubulina pelo ImageQuant* ($p \leq 0,05$). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

* indica a diferença significativa entre o grupo WT e KO. No experimento foi utilizado $n = 3$ para o grupo WT e, $n = 3$ para o grupo KO. n refere-se ao número total de animais utilizados no ensaio.

7.3 A produção de CTH e CTPH é afetada na ausência da TG2.

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com os anticorpos, conforme item 3.2.10. Demonstramos que na ausência da TG2 (KO 0), houve aumento da quantidade de CTH, entretanto ao induzir à privação de nutrientes (*starvation*) houve uma diminuição na produção de CTH (figura 31 A). Já na figura 31 B, podemos observar que houve diminuição da CTPH na ausência da TG2, entretanto houve aumento da CTPH no grupo KO starvation.

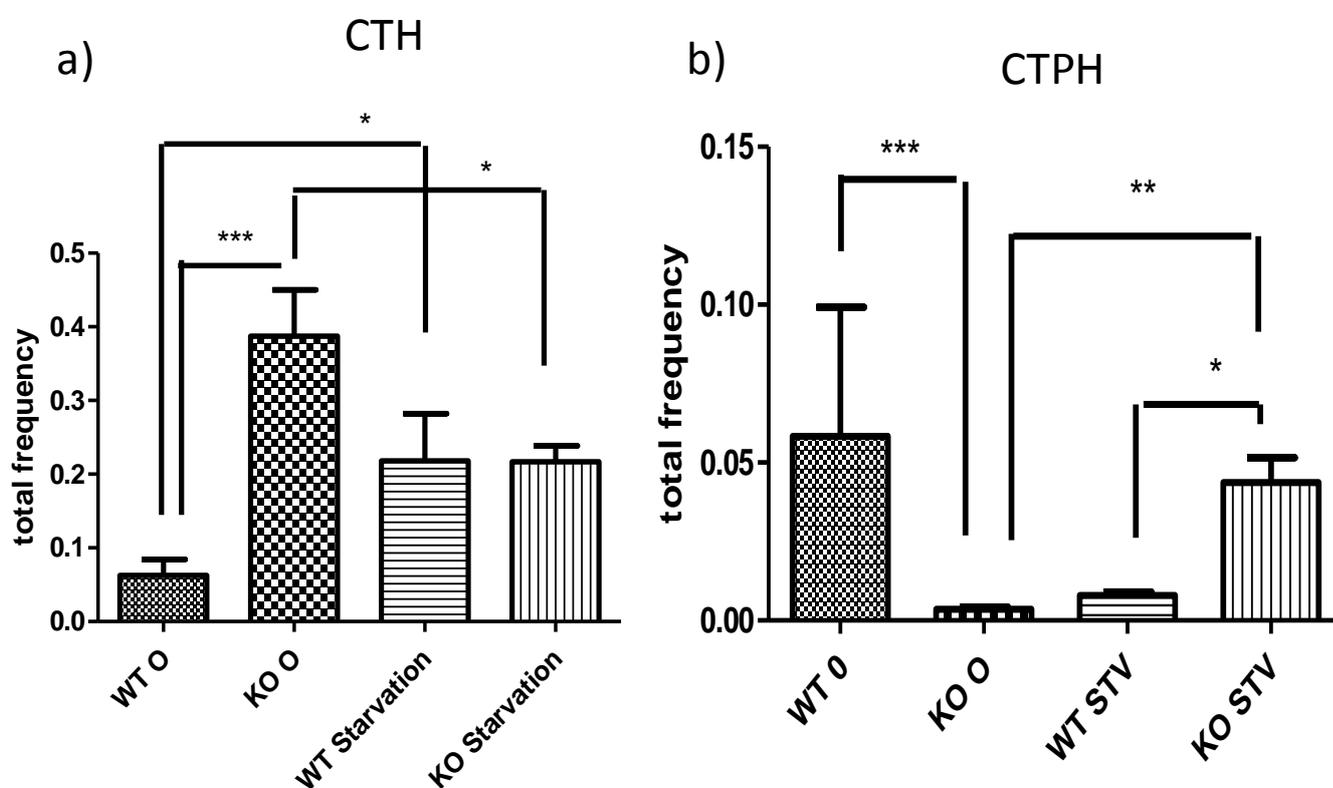


Figura 31. Representa a frequência total de CTH (a) Quantificação da CTH nos grupos WT e KO com ou sem privação e (b) Quantificação da CTPH nos grupos WT e KO com ou sem privação Teste tw o-w ay ANOVA. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e * $p < 0,001$ * indica a diferença significativa entre o grupo WT e KO. No experimento foi utilizado $n = 3$ para o grupo WT e, $n = 3$ para o grupo KO. n refere-se ao número total de animais utilizados no ensaio.**

7.4 Morte celular na TG2^{-/-}

As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com os anticorpos específicos para CTH e Anexina V, conforme item 3.2.11. Demonstramos

diminuição da apoptose inicial (Figura 32 A) no grupo KO com estímulo apoptótico (*staurosporine*) com relação ao WT com *staurosporine* e aumento da apoptose no grupo KO starvation com relação ao grupo KO sem *starvation*. Com relação as células CTPHs (figura 32 B) podemos observar diminuição da apoptose no grupo KO sem *starvation* e KO com *staurosporine*, ao comparar com o grupo WT com ou sem tratamento, entretanto houve aumento da apoptose nas CTPHs no grupo KO *starvation* com relação ao WT *starvation*.

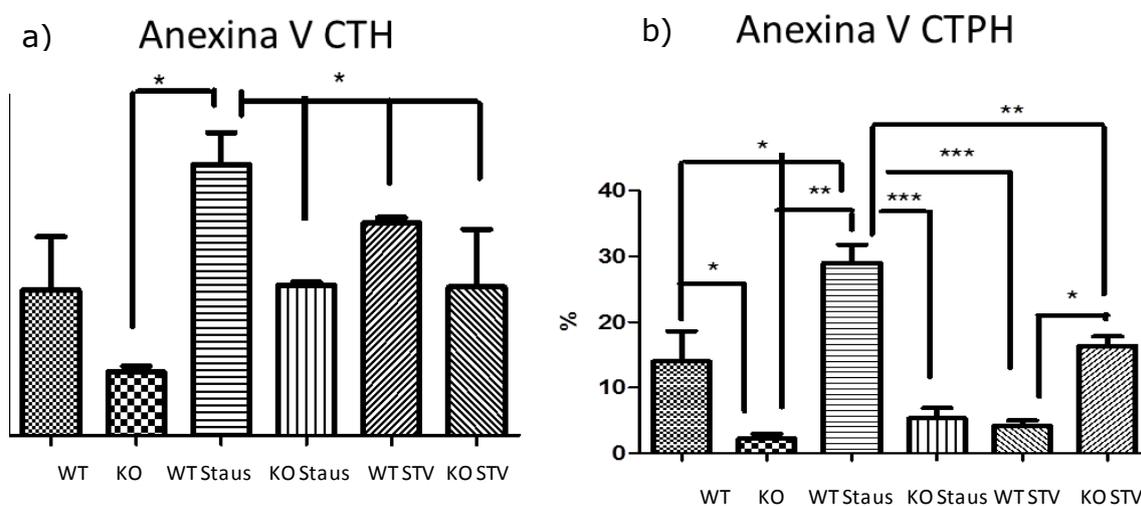


Figura 32. Representa a porcentagem de células apoptóticas em processo inicial na CTH e na CTPH (a) Quantificação da Anexina V na CTH nos grupos WT e KO sem tratamento, WT e KO com estímulo apoptótico *staurosporine* 2 μ m (Staus) e WT e KO com *starvation* (STV) **(b)** Quantificação da Anexina V na CTPH nos grupos WT e KO sem tratamento, WT e KO com estímulo apoptótico *staurosporine* 2 μ m (Staus) e WT e KO com *starvation* (STV) Teste two-way ANOVA. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ * indica a diferença significativa entre o grupo WT e KO. No experimento foi utilizado $n = 3$ para o grupo WT e, $n = 3$ para o grupo KO. n refere-se ao número total de animais utilizados no ensaio

7.5 Aumento da expressão de LC3 na ausência da TG2 em células-tronco hemopoéticas

Conforme item 3.2.14, analisamos as proteínas envolvidas na autofagia por citometria de fluxo, na figura 33, podemos observar aumento da proteína LC3 na CTH e na CTPH na ausência da TG2, entretanto houve diminuição da expressão nas

células CTPHs com *starvation* (figura 33 A e 33 B) . Já a expressão de p62 encontrou-se com baixa expressão no grupo KO STV na CTH (figura 33 C).

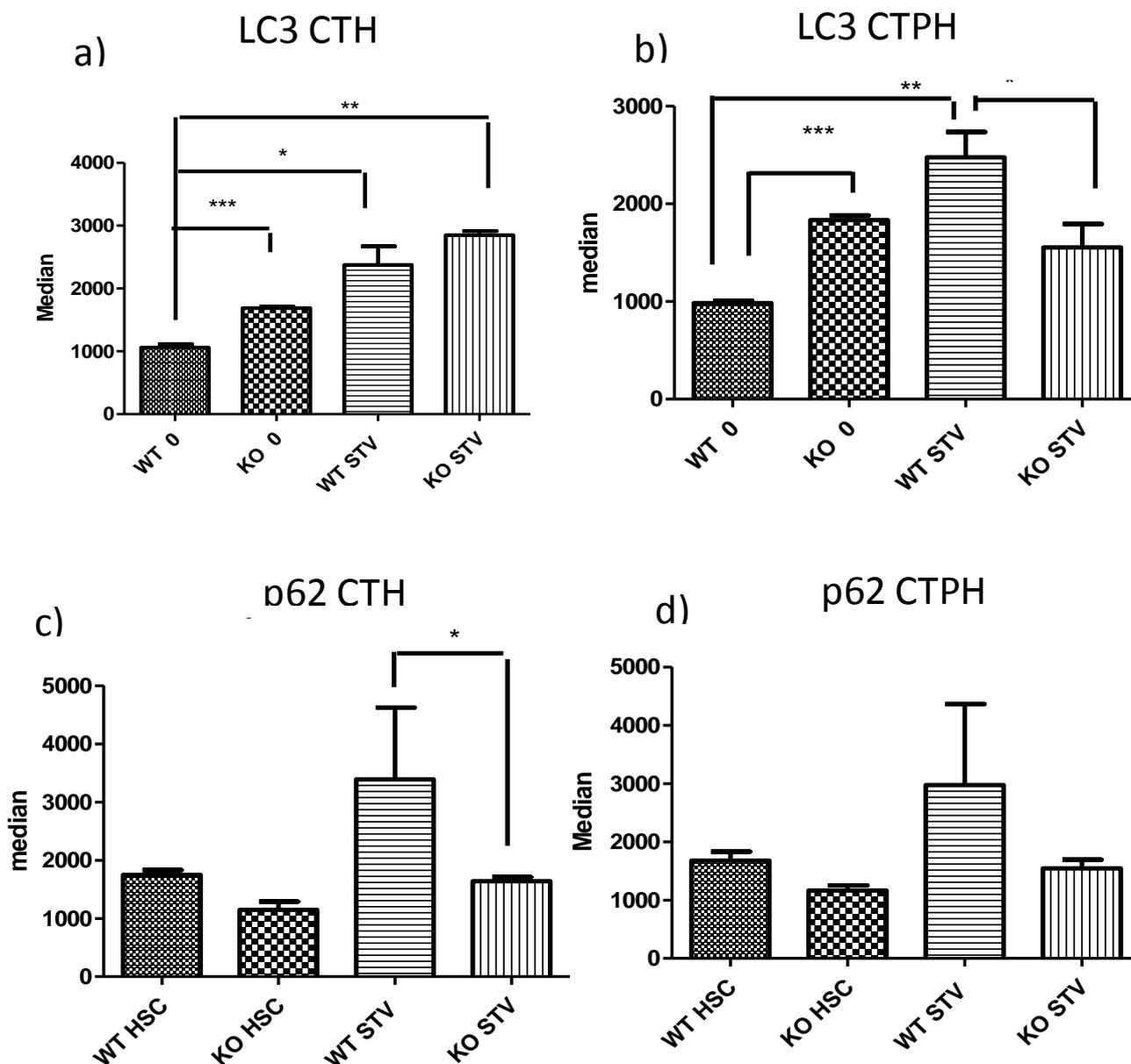


Figura 33. Representa a expressão de LC3 e p62 nas CTHs e na CTPHs por citometria de fluxo (a) Quantificação da LC3 na CTH nos grupos WT e KO sem tratamento e WT e KO com starvation (STV) (b) Quantificação da LC3 na CTPH nos grupos WT e KO sem tratamento e WT e KO com starvation (STV). (c) Quantificação da p62 na CTH nos grupos WT e KO sem tratamento e WT e KO com starvation (STV) (d) Quantificação da p62 na CTPH nos grupos WT e KO sem tratamento e WT e KO com starvation (STV) Teste two-way ANOVA. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ * indica a diferença significativa entre o grupo WT e KO. No experimento foi utilizado $n = 3$ para o grupo WT e, $n = 3$ para o grupo KO. n refere-se ao número total de animais utilizados no ensaio

7.6 Aumento da proliferação celular na ausência da TG2 em células-tronco hemopoéticas e progenitoras.

Conforme item 3.2.14, analisamos as proteínas envolvidas na proliferação celular por citometria de fluxo, na figura 34 A,B,C e D, podemos observar aumento da fosforilação de Erk e Ki67, nas populações de CTH e CTPH na ausência da TG2. O aumento da proliferação persistiu nos grupos KO *starvation*

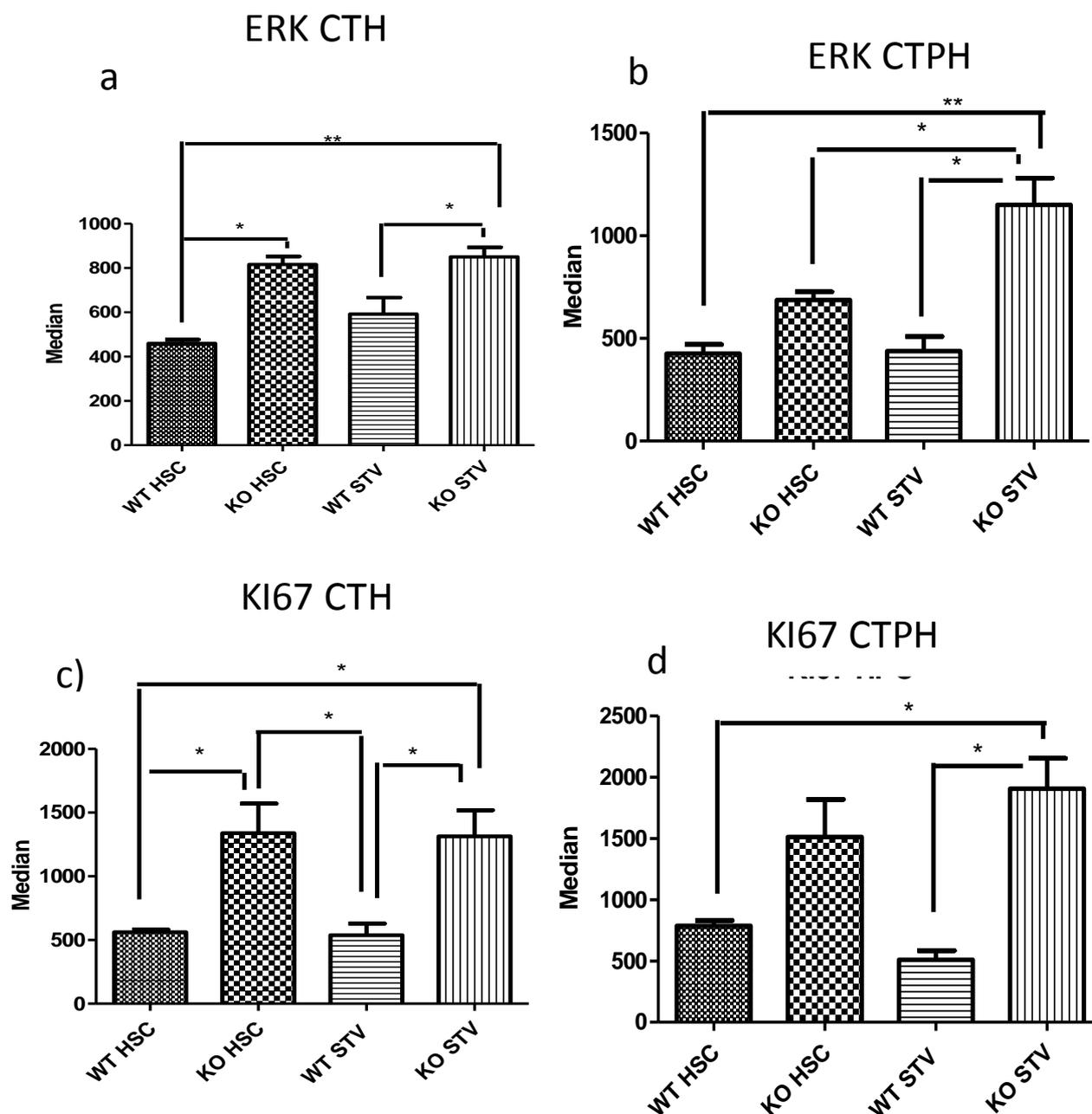


Figura 34. Representa a expressão de LC3 e p62 nas CTHs e na CTPHs por citometria de fluxo (a) Quantificação da ERK na CTH nos grupos WT e KO sem tratamento e WT e KO com starvation (STV) (b) Quantificação da ERK na CTPH nos grupos WT e KO sem tratamento e WT e KO com starvation (STV). (c) Quantificação da Ki67 na CTH nos grupos WT e KO sem tratamento e WT e KO com starvation (STV) (d) Quantificação da Ki67 na CTPH nos grupos WT e KO sem tratamento e WT e KO com starvation (STV) Teste tw o-way ANOVA. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ * indica a diferença significativa entre o grupo WT e KO. No experimento foi utilizado $n = 3$ para o grupo WT e, $n = 3$ para o grupo KO. n refere-se ao número total de animais utilizados no ensaio

8.0 DISCUSSÃO

A desnutrição ainda é um dos principais problemas de saúde pública mundialmente, sendo a desnutrição proteico-energética (DPE) uma das formas mais frequentes (ONIS; HABICHT, 1996). A DPE pode ocorrer em recém-nascidos, crianças e adultos. Em crianças, a desnutrição pode acarretar baixo peso e retardo no crescimento (baixa estatura). A falta de uma alimentação adequada e ingestão de nutrientes, bem como, recorrentes infecções são em grande maioria, a principal causa de desnutrição em lactantes e crianças. Em adultos, a desnutrição é vista em indivíduos hospitalizados, pacientes portadores de doenças crônicas e idosos (SHETTY, 2006).

Desnutrição proteica (DP) e a proteico-calórica ou proteico-energética é causa de várias manifestações clínicas, sendo que as alterações mais evidentes estão relacionadas aos parâmetros antropométricos. A DP e a DPE ocorrem em uma sequência que varia desde a deficiência protéica exclusiva e grave (Kwashiorkor), que é decorrente de carência proteica com ingestão normal de carboidratos até a deficiência proteica e energética grave (Marasmus), que decorre da deficiência prolongada de proteínas e carboidratos. No homem, a deficiência nutricional raramente é exclusivamente calórica ou proteica, ocorrendo frequentemente à associação de ambas e que é denominada de síndrome kwashiorkor-marasmática. (CARVALHO, 2001). As manifestações clínicas da DPE dependem do grau e severidade da deficiência proteico-calórica, da causa e duração da deficiência, bem como da idade do indivíduo e da associação ou não com outras doenças. Os quadros intermediários surgem pela combinação de vários graus de privação proteica com diversos graus de deficiência calórica total (De ANGELIS, 1986).

Além disso, a desnutrição pode ocasionar alterações psico-motoras, alterações morfológicas e funcionais em diversos órgãos: baço (MELLO *et al.*, 2014) pulmões (LIU *et al.*, 2014), fígado (GIUSTO *et al.*, 2014), alterações no sistema imunológico (MELLO *et al.*, 2014) e na matriz extracelular (MEC) (BORELLI *et al.*, 2009). Alterações hematológicas e na MEC pode contribuir para a hipoplasia observada na medula óssea em camundongos desnutridos. (BORELLI *et al.*, 2009).

No modelo de desnutrição utilizado neste trabalho, as rações foram elaboradas considerando os teores de vitaminas, ácidos graxos e sais minerais necessários para fornecer uma dieta adequada (REEVES *et al.*, 1993), restringindo-se a quantidade de proteína da ração ofertada (ração hipoprotéica). O grupo desnutrido apesar de não ter

ingerido menos calorias que o grupo controle teve perda de peso significativa indicando a desnutrição proteica.

Verificamos que os animais desnutridos apresentam menor número de eritrócitos, diminuição da concentração da hemoglobina e hematócrito comparado aos animais controle, caracterizando um quadro de anemia. Há diminuição da proliferação celular afetando a granulopoese (BORELLI *et al.*, 2009) o qual contribuiu para a leucopenia encontrada, linfocitopenia (GARCIA, 1992; BORELLI *et al.*, 1995; BARON, 1997) e neutropenia (BORELLI *et al.*, 1995 e 2007). Os animais desnutridos também apresentam hipoplasia medular, principalmente no setor mielóide (BORELLI *et al.*, 1995, 2001, 2007).

Essas alterações hematológicas como pancitopenia periférica e hipoplasia medular são justificadas por deficiência proteica no processo de renovação celular. Como a medula óssea é um tecido altamente renovável devido à vida média relativamente curta das células sanguíneas, o aporte de nutrientes é fator limitante para a produção medular. As células-tronco hemopoéticas (CTHs) e células-tronco progenitoras (CTPH) de animais desnutridos apresentam parada maturativa evidenciada por número elevado de células tronco/progenitoras na fase G0/G1 do ciclo celular (BORELLI *et al.*, 2004 e NAKAJIMA *et al.*, 2014). A permanência da CTH e CTPH no ciclo celular é devido a elevação da concentração de p21 e p27 e redução da proteína ERK e de ciclina D3 (NAKAJIMA *et al.*, 2014), assim como, poderia ser ocasionada pela via de mTOR já que o mesmo participa na progressão do ciclo celular (SABATINI, 2012).

A hipoplasia medular observada pode ser ocasionada também por morte celular, mas não por apoptose, mas por processo autofágico (FOCK *et al.*, 2010 e BELTRAN *et al.*, 2013). Desequilíbrios nutricionais e metabólicos podem induzir ativação autofágica (KOTA, 2013). Autofagia é um processo catabólico que regula o equilíbrio entre a síntese, a degradação e reciclagem de componentes celulares, desempenhando assim uma participação no crescimento, desenvolvimento e homeostase celular (MORGAN-BATHKE, 2013), podendo ser ativada por resposta a estresse celular, privação de nutrientes, espécies reativas de oxigênio (EROS), hipóxia e acumulação do retículo endoplasmático (KLIONSKY, 2009).

Além do estresse, a autofagia também participa em várias atividades fisiológicas, incluindo no desenvolvimento e diferenciação celular (LEVEQUE, 2015). O processo autofágico possui papel crítico na imunidade inata e adquirida, desempenhando função importante no controle da inflamação (DERETIC, 2013), ou

seja, a autofagia participa no controle da imunidade através da apresentação de antígenos, homeostase dos linfócitos e na secreção de mediadores inflamatórios.

Autofagia participa na regulação da MEC, através de fatores de crescimento, sensores de nutrientes, sensores de energia ou em resposta ao estresse (LOOK e DEBNATH, 2008) e na regulação das CTHs (JUN-LIN *et al.*, 2013).

CAO *et al.*, 2015 demonstram que a autofagia é essencial para manter e regular o ciclo celular nas células-tronco e progenitoras (HSPCs) e que o processo autofágico acelera ou reduz o ciclo celular das HSPCs em função das condições de nutrientes, ou seja, sob condições fisiológicas ou meio rico de nutrientes a ativação da autofagia in vivo promove a entrada do ciclo celular de HSPCs, através da ciclina D3, entretanto sob baixas concentrações de nutrientes a autofagia sinaliza a transcrição da fase G1 para S em HSPCs.

Dados da literatura demonstram, que a inibição dos genes essenciais da autofagia em camundongos knockout para *Atg7* ou *Fip200*, altera a auto-renovação da CTH e também ocasiona mieloproliferação desregulada (LIU *et al.*, 2010 e MORTENSEN *et al.*, 2011). Além disso, outros trabalhos demonstraram que autofagia depende do ATG7 para regular o ciclo celular das CTH e CTPH (CAO *et al.*, 2015), promovendo a megacariopoiese, a diferenciação de megacariócitos e trombopoiese (Cao *et al.*, 2015), regulando portanto a hematopoese.

Dados deste trabalho demonstram redução de células CTH e CTPH, sem evidências de apoptose, porém com aumento da expressão de autofagia. Esse aumento do processo autofágico é devido a diminuição da fosforilação das proteínas Akt e mTOR encontrados nos animais desnutridos. O processo autofágico é controlado pela proteína mTOR, A proteína mTOR participa na manutenção da homeostase celular e sua ativação depende de fatores de crescimento e nutrientes, tais como: carboidratos e aminoácidos.

Entretanto, podemos verificar que mTOR quinase possuem dois complexos distintos denominados TOR complexo 1 (mTORC1) e TOR complexo II (mTORC2). O complexo mTORC1 que contém os seguintes complexos: mTOR, Raptor, mLST8 (*GβL*) e PRAS40, participa na inibição do processo autofágico (ALTMORE, 2012). Dados deste trabalho demonstrou que há redução da expressão de mTOR total e da porção fosforilada de mTOR ser 2481, nas células CTPH dos animais do grupo desnutrido.

O complexo mTORC1 é controlado pelas proteínas TSC1/2, que por sua vez, é regulado pela proteína Akt. A proteína Akt fosforila a proteína mTOR no sítio Ser

2448 e a partir desta primeira fosforilação, mTOR realiza uma autofosforilação da Ser2481, uma vez ativada a proteína mTOR inibe o processo autofágico e ativa a proteína p70S6 (p 70S6K), uma quinase ativada por sinalização mitogênica requerida para crescimento celular e passagem pela fase G1 do ciclo celular (LOOS,2013).

Não encontramos alterações nas proteínas que participam do complexo mTORC1 entre os grupos, exceto a proteína GβL ,onde demonstramos por RT-PCR uma redução da expressão gênica em CTPH de animais desnutridos. Dados da literatura demonstram que os níveis de mRNA não podem ser usados como substitutos para os níveis de proteína correspondentes (SCHWANHAUSSER ,2013),uma vez que há uma discrepância nos padrões de expressão relacionados entre proteína e mRNA que pode ser explicado pela regulação pós-transcricional da expressão gênica.

A proteína GβL é fundamental para formação da interação dos nutrientes entre Raptor e mTOR (TSUKASA, 2011), entretanto, a diminuição de mLST8 (GβL) não diminui os níveis de mTOR (SABATINI, 2006).

A desnutrição ocasionou diminuição das concentrações dos aminoácidos dispensáveis: Isoleucina, Lisina, Metionina e Valina, já o aa não dispensável Serina encontram-se aumentado e o aa Taurina encontra-se reduzido em camundongos desnutridos (Beltran et al.,2013). O aminoácido Taurina intensifica os efeitos da insulina e também contribui para o funcionamento do metabolismo da glicose (BERG,2006), este dado pode justificar a redução de insulina sérica e IGF-1 encontrada nos animais desnutridos,que este por sua vez interage com a via de Akt e contribui para a redução da fosforilação de mTOR em CTPHs.

mTOR detecta a disponibilidade de aminoácidos principalmente de glutamina e leucina, por meio de um sistema de transporte bidirecional (KRAFT , 2012).A leucina é um dos aminoácidos mais relevantes na sinalização de mTOR, no entanto, o mecanismo de detecção da disponibilidade de aminoácidos, bem como o mecanismo de desfosforilação do mTOR, ainda não está totalmente compreendido (NICKLIN, 2009). Portanto, os nutrientes (por exemplo, glicose) e aminoácidos (por exemplo, leucina) são estimuladores da via mTORC1 (KIM, 2011).

Conforme figura 24, a insulina ativa a proteína Akt, que por sua vez ,inibe as proteínas TSC1/2, que sucessivamente controla ativação de mTOR (CHAN,2011). As proteínas ERK e IKKβ participam na inibição de TSC1/2. Já IKKα participa na ativação de mTORC1. Karina et al.,2014 demonstraram redução da fosforilação de ERK em camundongos desnutridos e redução de IKKα e IKKβ em macrófagos estimulados

com LPS (CRISMA *et al.*,2010), as alterações nessas proteínas contribuíram para a redução da fosforilação de mTORC1.

Já o complexo mTORC2 que contém as seguintes proteínas: mTOR, Rictor, mSin1, PRR5 e mLST8 (GβL) , participa na sobrevivência celular e na organização do citoesqueleto, entretanto, a regulação do mTORC2 ainda é desconhecida; no entanto sabe-se que mTORC2 fosforila AKT em Ser473 (OH e JACINTO *et al.*,2011), dados deste trabalho evidenciaram diminuição de p-Akt ser 473 e mRNA (AKT2) em células CTPHS de animais desnutridos. Portanto a redução de insulina (NAKAJIMA *et al.*,2014) e dos aminoácidos encontrados nos animais desnutridos (BELTRAN *et al.*,2013) ,justificam a redução da p-Akt ser 473, que portanto afetou a fosforilação de mTORC1, ocasionando elevada expressão autofágica, visto que mTORC1, participa da inibição da autofagia.

Dados da literatura demonstram que a proteína Akt 2, é regulada por dieta rica em gordura e contribui na ativação de mTORC1, bem como na regulação do fluxo autofágico no tecido cardiovascular (ZHANG *et al.*,2013), também em dieta rica em gordura, JEFFREY *et al.*,2015, demonstrou que a fosforilação de Akt serina 473, apresentou reduzida no tecido adiposo, enquanto em dieta com restrição proteica, há também diminuição da p-Akt serina 473 , com comprometimento da proteína mTORC1 e aumento do fluxo autofágico em células totais de medula óssea (BELTRAN *et al.*, 2013).

As proteínas Akt e mTORC1 participam da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular das células hemopoéticas (FRANSECKY,2015).Dados da literatura demonstram que camundongos Knockout para mTOR , ocasionou alterações na medula óssea com defeitos na hemopoese , principalmente na linhagem mielóide ,eritróide e linfóide. A inibição de mTOR resulta em perda da quiescência das CTHs, e as mesmas não são capazes de repovoar o tecido medular em camundongos irradiados. Além disso, estimula aumento da apoptose em células maduras, mas não de CTHs, indicando uma função específica no estágio de diferenciação. Estes resultados demonstram que mTOR é essencial no transplante de CTHS e expansão das multi-linhagens (GUO *et al.*,2013).

As CTHs residem na medula óssea com baixa tensão de oxigênio e baixa redução de fornecimento de nutrientes (PARMAR *et al.*,2007 e MIHARADA *et al.*,2011) , com participação dos sensores de nutrientes e sensores de energia. A proteína LKB1 (sensor de energia) e mTOR (sensor de nutrientes) estimulam diversos sinais, incluindo fatores de crescimento, hormônios e disponibilidade de nutrientes e

possuem papéis importantes na homeostase da CTH (HUANG *et al.*,2012). A deleção de LKB1 (GAN *et al.*, 2010 e KROCK *et al.*,2011) ou de mTOR (ZHANG *et al.*2006 e CHEN *et al.*,2008) aumenta a proliferação dos progenitores hemopoéticos, com detrimento na manutenção da CTH, sugerindo que a baixa disponibilidade de nutrientes é uma característica importante no nicho hemopoético que sustenta a quiescência e auto-renovação da CTH.

Já a proteína Akt, que participa em diversas funções celulares, possui um papel ainda desconhecido nas CTHs. Dados da literatura demonstram que camundongos knockout para duas isoformas altamente expressas no compartimento hemopoético (AKT1 e AKT2) alterou o desenvolvimento de células mielóides e linfóides, após transplante em camundongos irradiados, além disso, houve parada do ciclo celular na fase G0 e diminuição da espécie reativas de oxigênio (EROS) nas CTHs ,portanto AKT1 e AKT2 são importantes na manutenção das CTHs long term (LT-CTHs) o que contribui para as alterações na hemopoese (JUNTILLA *et al.*,2010).

Durante a ativação do processo autofágico é necessário o envolvimento de outras proteínas, Beclin-1 e Bcl-2 (Figura 24) (RUBINSZTEIN, 2007). Não observamos neste trabalho, diferenças significativas da proteína Bcl-2 em CTPHS pelo método de Western blotting.

Na sinalização autofágica, é necessária a formação do fagóforo, que através das proteínas da família Atgs, ocorre o englobamento de componentes celulares e posteriormente, formação de uma vesícula de membrana dupla, chamada de autofagossomo (vesícula autofágica), que se funde com os lisossomos para formar uma vesícula única, chamado de autofagolisossomo. Para esta etapa, é fundamental a participação da proteína LC3.

Durante o processo autofágico, a proteína LC3 I citoplasmática é clivada e convertida em LC3 II lipídica, que se liga ao pré – autofagossomo e autofagossomo (figura 24). Observamos neste trabalho aumento significativo do LC3 I citoplasmático e LC3 II em CTPHS de animais desnutridos em relação aos animais controle, demonstrando um processo autofágico altamente ativo. Não foi possível avaliar estas proteínas envolvidas na sinalização autofágica na CTH, devido a quantidade de células não serem suficientes para essas análises, porém demonstramos por microscopia de fluorescência, um aumento da marcação de LC3 em camundongos desnutridos.

Portanto, após a formação do autofagolisossomo, inicia-se processo de degradação dos componentes celulares, sendo que estes produtos degradados são

reutilizados pelas células de modo a manter a homeostase celular (BEHRENDTS, 2010).

Há poucos trabalhos relacionados entre desnutrição e autofagia. SUGAWARA *et al*, 2009, avaliaram os efeitos da ingestão de leucina em uma dieta deficiente de proteína (desnutrição proteica) na síntese e degradação das proteínas musculares. A redução da massa muscular foi suprimida pela suplementação de leucina (1,5% de leucina) em ratos alimentados com uma dieta isenta de proteína, durante 7 dias. Além disso, houve uma diminuição na degradação das proteínas musculares, principalmente da expressão da proteína LC3II, mas não foi evidenciado aumento na síntese de proteínas do músculo. Esses resultados sugerem que a dieta isenta de proteína, suplementado com leucina, suprime a degradação das proteínas musculares, através da inibição da autofagia, em vez da síntese proteica.

Embora autofagia atue principalmente como um mecanismo de proteção, sabe-se que uma excessiva atividade autofágica pode ocasionar morte celular (MAIURI, 2007).

Portanto, dependendo dos diferentes estímulos celulares o resultado da autofagia pode promover a sobrevivência celular ou a morte celular. Entretanto, a autofagia possui uma função complexa e essencial na fisiologia das células e no organismo. Estudos recentes indicaram que a autofagia também tem uma função de pró-morte através de vários mecanismos. A excessiva indução de autofagia pode ser um dos mecanismos pelo qual o processo autofágico possa ser considerado como um fator de pró-morte. O mecanismo pelo qual a autofagia pode executar essas duas funções de uma pré-sobrevivência ou de um mecanismo de pró-morte permanece sem entendimento até o momento (Fan e Zong, 2012).

Uma vez que as CTHs e CTPHs demonstraram neste trabalho, aumento da expressão autofágica e, portanto, não sabemos se autofagia é benéfica para o organismo desnutrido, avaliamos as CTHs e as CTPHs em camundongos CAG CRE Tag / Atg7 flox/flox.CAG- CreER (sendo CAG promotor de citomegalovírus), CRE recombinase viral capaz de quebrar sequenciais lox sob o controle do CAG e ER o receptor de tamoxifeno) e Atg7^{flox} (que tem o gene Atg 7 flanqueado por sequenciais lox, ou seja, irá induzir a migração nuclear de complexos CreER), isto faz com que as células destes camundongos respondam ao tamoxifeno. Não há trabalhos publicados sobre esta linhagem de camundongo. Dados deste trabalho demonstram que ausência da autofagia em modelo de desnutrição altera a produção de CTH e CTPH. Assim, como a ausência da TG2 (proteína envolvida na maturação do autofagossomo),

prejudicou a produção de CTH e CTPH, entretanto essas células com período de *starvation* 24 horas, aumentou a produção dessas populações.

Há outros modelos knockouts para CTHs, LEVEQUE *et al.*,2013, demonstraram que a autofagia é um processo ativo na LT-CTHs e que a eliminação do gene ATG5, resultou alterações na manutenção e função da CTH.

Já, MORTENSEN *et al.*,2010, demonstraram que camundongos camundongos *Vav-Atg7^{-/-}*, (camundongos Knockout específico para CTH), possui um elevado número de mitocôndrias nas CTHs, anemia grave, aumento da produção de EROS e danos no DNA com sobrevivência de ~ 9 semanas após o nascimento.

Uma vez que em nosso modelo de desnutrição, é induzido em camundongos de 2 meses de idade em torno de 5 semanas, seria inviável utilizar essa linhagem para nossos experimentos. Por isso vamos utilizar os camundongos CAG CRE-ER, pois são camundongos Knockouts condicionais, onde o gene de interesse (Atg7) é deletado após tratamento com tamoxifeno.

Contudo, visto que autofagia funciona como uma sinalização complexa e dinâmica e que a desnutrição proteica acarreta alterações na fosforilação de Akt/mTOR, sugere-se que essas modificações contribuíram no bloqueio da inibição, corroborando para aumento da expressão do processo autofágico na CTH e CTPH. Com base nos resultados dos camundongos CAG CRE Atg7 flox a autofagia é necessária no modelo de desnutrição proteica como mecanismo de sobrevivência celular, entretanto, diferentes proteínas, sendo eles ATG7 ou TG2, regulam a produção e diferenciação da CTH de maneira diferente e mesmo quando submetidas à desnutrição ou privação de 24 horas.

9.0 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram a existência de autofagia na CTH e CTPH com redução da fosforilação de Akt e mTOR em animais desnutridos, com aumento da proteína LC3 II nos animais desnutridos do grupo C57Bl/6J, demonstrando que a via autofágica está expressivamente ativada. Estes dados podem em parte justificar a hipoplasia medular nesses animais com conseqüente comprometimento da produção de células sanguíneas, sendo este processo autofágico benéfico para o modelo de desnutrição proteica.

10.0 ANEXOS

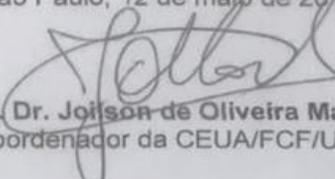
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 46.2014-P443

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, **CERTIFICA** que o Projeto de Pesquisa "**Avaliação da autofagia na célula-tronco hemopoética em camundongos knockout para Atg7 submetidos à desnutrição proteica**" (Protocolo CEUA/FCF/443), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Jacqueline Soares de Oliveira Beltran**, sob orientação do(a) **Profa. Dra. Primavera Borelli**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de **11 de abril de 2014**. Conforme a legislação vigente, deverá ser apresentado, no encerramento deste Projeto de Pesquisa, o respectivo **relatório final**.

São Paulo, 12 de maio de 2014.



Prof. Dr. Joilson de Oliveira Martins
Coordenador da CEUA/FCF/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS - AV. PAULISTA, 562 - JARDIM PAULISTA - SÃO PAULO - SP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Comissão Interna de Biossegurança



Of.CIBio/0032014/FCF

São Paulo, 20 de março de 2014

Senhora Professora,

Conforme parecer favorável do relator, informo a Vossa Senhoria que estamos aprovando "ad referendum" da Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Ciências Farmacêuticas o Projeto "*Avaliação da autofagia na célula-tronco hemopoética em camundongos knockout para Atg 7 submetidos a destruição proteica*".

Lembramos que, quando da elaboração do Relatório Anual a ser encaminhado à Comissão Interna de Biossegurança esta Comissão solicitará a V.Sa. comprovante de participação em treinamentos de Biossegurança de sua equipe para manutenção do credenciamento.

Atenciosamente,

Prof. Dr. MARIO HIROUKI HIRATA
Presidente da CIBio

Ilma. Sra.

Profa. Dra. PRIMAVERA BORELLI

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP

NESTA

Jackeline Soares de Oliveira Beltran

- **Endereço para acessar este CV:**<http://lattes.cnpq.br/4059207492145590>
- **Última atualização do currículo em 26/02/2018**

Resumo informado pelo autor

Docente na Universidade Ibirapuera, Research Trainee (pHd sanduíche) na Università di Roma " Tor Vergata " e INMI "Lazzaro Spallanzani", Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Farmácia, área de Fisiopatologia e Toxicologia (USP), Mestre em Ciências, área de Análises Clínicas(USP), Graduada em Ciências Biológicas , extensão universitária em conceitos e aplicações atuais da Biologia Celular e nível técnico em Bioadiagnóstico e Patologia Clínica. Tem experiência na área de Análises Clínicas, com ênfase em Hematologia, célula-tronco hemopoética, apoptose, autofagia, camundongos Knockouts, transferência gênica por vetores virais , Rna de interferência e terapia gênica.

(Texto informado pelo autor)*Nome civil*

Nome Jackeline Soares de Oliveira Beltran

Formação acadêmica/titulação

- 2014** Doutorado em Ciências.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Aviação da autofagia na célula-tronco hemopoética em camundongos knockout para o gene Atg7 submetidos à desnutrição proteica
Orientador: Primavera Borelli 
Co-orientador: João Gustavo Pessini Amarante-Mendes
- 2010 - 2013** Mestrado em Ciências.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Aviação da participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica, Ano de obtenção: 2013
Orientador: Primavera Borelli 
- 2004 - 2008** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade do Grande ABC, UNIABC, Santo André, Brasil
Título: Contaminação do solo no Estado de São Paulo nos últimos 5 anos.
Orientador: Prof^o Valéria Bruscella
- 2005 - 2007** Ensino Profissional de nível técnico.
Nível Centro Educacional, NÍVEL, Brasil
- 2009 - 2010** Aperfeiçoamento em Hematologia Experimental.
Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
Título: Hematologia Experimental
Orientador: Prof. Primavera Borelli

Formação complementar

2015 - 2015	Curso de curta duração em Uso de animais em Experimentação. (Carga horária: 10h). Instituição de Ciências Biomédicas IV, ICB IV, Brasil
2015 - 2015	Curso de curta duração em Atividades com OGM em contenção. (Carga horária: 16h). Conselho de Informações sobre Biotecnologia, CIB, Brasil
2015 - 2015	Curso de curta duração em Curso Teórico e Prático Imunoistoquímica. (Carga horária: 8h). Instituição de Ciências Biomédicas IV, ICB IV, Brasil
2013 - 2013	Curso de curta duração em Workshop de Capacitação de Pesq. em Método Científ. (Carga horária: 40h). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2013 - 2013	Curso de curta duração em qPCR Users Meeting. (Carga horária: 8h). Life Technologies , LIFE TEC, Sao Paulo, Brasil
2013 - 2013	Curso de curta duração em Biossegurança e Contenção de Camundongos OGM. (Carga horária: 2h). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2012 - 2012	Treinamento Biotério de Produção e Experimentação. . (Carga horária: 25h). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2012 - 2012	Curso de curta duração em 6º Curso de Citometria de Fluxo. (Carga horária: 60h). Instituto Adolfo Lutz, IAL, Sao Paulo, Brasil
2011 - 2011	Curso de curta duração em Imunohistoquímica e Patologia Molecular. (Carga horária: 9h). Faculdade de Medicina Veterinária USP, FMV USP, Brasil
2011 - 2011	Curso de curta duração em Apoptose, Checkpoint e Câncer. (Carga horária: 12h). Instituto de Biosciências USP, IB USP, Brasil
2011 - 2011	Curso de curta duração em Flow Cytometry - Let's hear it.. (Carga horária: 8h). Life Technologies , LIFE TEC, Sao Paulo, Brasil
2010 - 2010	Curso de curta duração em Citometria de Fluxo. Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2010 - 2010	II Simpósio em Análises Clínicas. . Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2010 - 2010	Curso de curta duração em Proteomics Methods and Approaches for protein. (Carga horária: 4h). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2009 - 2009	Extensão universitária em Conceitos e Aplicações Atuais da Biologia Celular. (Carga horária: 40h). Instituição de Ciências Biomédicas, ICB, Brasil
2009 - 2009	I Simpósio em Análises Clínicas. . Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2007 - 2008	Estagiária na área do Ensino (Fundamental e Médio. . (Carga horária: 400h). Universidade do Grande ABC, UNIABC, Santo Andre, Brasil
2008 - 2008	Curso de curta duração em Biologia Molecular e Tecidual. (Carga horária: 40h). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2007 - 2007	Extensão universitária em Oceanografia. (Carga horária: 150h). Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Técnicas de Coleta e Manuseio de Líquor. (Carga horária: 10h). Biosciense Tecnologia, BIOSCIENSE, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Prática de Coletas em Geral. (Carga horária: 50h). Biosciense Tecnologia, BIOSCIENSE, Brasil

2006 - 2006	Estagiária. . (Carga horária: 150h). Centro Hospitalar de Santo André, CENTRO SANTO AND, Brasil
2006 - 2006	Curso de curta duração em Técnicas de Perícia Criminal. (Carga horária: 50h). Biosciense Tecnologia, BIOSCIENSE, Brasil
2005 - 2005	Estagiário. . (Carga horária: 50h). Hospital Municipal Universitário São Bernardo do Campo, HMU, Brasil
2005 - 2005	Estagiária. . (Carga horária: 50h). Slab Diagnósticos, SLAB, Brasil

A atuação profissional

1. Universidade Ibirapuera - UNIB

Vínculo institucional

2018 - Atual Vínculo: Docente , Enquadramento funcional: Docente, Regime: Parcial

2. Università degli Studi di Roma Tor Vergata - UNIROMA

Vínculo institucional

2017 - Atual

3. Universidade de São Paulo - USP

Vínculo institucional

2014 - Atual

4. Setra Medicina Diagnóstica - SETRA

Vínculo institucional

2006 - 2008 Vínculo: Técnico de Patologia Clínica , Enquadramento funcional: Técnico , Carga horária: 44, Regime: Integral
Outras informações:
Atuava na parte de coletas em geral e técnicas laboratoriais auxiliando nos setores de : Hematologia , Bioquímica , Parasitologia , Microbiologia , Imunologia e Urinálise.

Projetos

Projetos de pesquisa

2017 - Atual

Role of Tg2 signaling pathway in regulation of hematopoietic stem cell

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Jackeline Soares de Oliveira Beltran (Responsável); ; BORELLI, P.; Mauro Piacentini; Serafina Olivero; federica Rossin; Veronica Bordoni

2014 - Atual

Avaliação da autofagia na célula tronco hemopoética em camundongos knockout para Atg7 submetidos á desnutrição

Descrição: Dados do nosso grupo evidenciaram que a desnutrição proteica leva a comprometimento da hemopoese, alterações no ciclo celular das células-tronco hemopoéticas (CTH) e hipoplasia medular com pancitopenia periférica nos propomos neste projeto, avaliar a interação da autofagia na CTH no modelo knockout para o gene Atg7.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Doutorado (3);

Integrantes: Jackeline Soares de Oliveira Beltran; Dalila Cunha de Oliveira; Graziela Batista da Silva; Ed Wilson dos Santos; Primavera Borelli (Responsável); João Gustavo Pessini Amarante-Mendes

Áreas de atuação

1. Biologia Geral
2. Análises Clínicas
3. Hematologia
4. Fisiopatologia Experimental

Idiomas

Inglês	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
Espanhol	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
Italiano	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Prêmios e títulos

- 2015** Melhor trabalho em Ciências Básica na 4ª Edição do Prêmio Pemberton 2015, Coca-Cola
- 2014** Prêmio Jovem Cientista Prof. Dr. Mario Mariano Trabalho A Influência da Desnutrição Proteica sobre a produção de GM-CSF e M-CSF por macrófagos peritoneais., XXIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP
- 2014** Prêmio Jovem Cientista Prof. Dr. Mario Mariano: Trabalho Desnutrição Proteica ativa a sinalização autofágica regulada por Akt/mTOR nas células de medula óssea., XXIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli -Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP

*Produção***Produção bibliográfica****Artigos completos publicados em periódicos**

1. [doi>](#) SANTOS, ED WILSON; OLIVEIRA, DALILA CUNHA DE; HASTREITER, ARACELI; SILVA, GRAZIELA BATISTA DA; **BELTRAN, JACKELINE SOARES DE OLIVEIRA**; TSUJITA, MARISTELA; CRISMA, AMANDA RABELO; NEVES, SILVÂNIA MEIRY PERIS; [FOCK, RICARDO AMBRÓSIO](#); BORELLI, PRIMAVERA
Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. BRAZILIAN JOURNAL VETERINARY RES. AND ANIMAL SCIENCE. , v.53, p.138 - , 2016.

2. [doi>](#) SANTOS, ED WILSON; DE OLIVEIRA, DALILA CUNHA; HASTREITER, ARACELI; **BELTRAN, JACKELINE SOARES DE OLIVEIRA**; ROGERO, MARCELO MACEDO; [FOCK, RICARDO AMBRÓSIO](#); BORELLI, PRIMAVERA
High-fat diet or low-protein diet changes peritoneal macrophages function in mice. Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. , v.41, p.1 - , 2016.
3. [doi>](#) [MELLO, A. S.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); BIZARRO, B.; [SA-NUNES, A.](#); BELTRAN, J. S. O.; XAVIER, G. J.; [BORELLI, P.](#); [FOCK, R. A.](#)
Protein Malnutrition alters spleen cell proliferation and IL-2 and IL-10 production by affecting the STAT-1 and STAT-3. Inflammation. [JCR](#), v.37, p.1 - 14, 2014.
4. [doi>](#) DE OLIVEIRA, DALILA CUNHA; HASTREITER, ARACELI APARECIDA; MELLO, ALEXANDRA SIQUEIRA;
DE OLIVEIRA BELTRAN, JACKELINE SOARES; OLIVEIRA SANTOS, ED WILSON CAVALCANTE; BORELLI, PRIMAVERA
; [FOCK, RICARDO AMBRÓSIO](#)
The effects of protein malnutrition on the TNF-RI and NF-κB expression via the TNF-α signaling pathway. Cytokine. [JCR](#), v.69, p.218 - 225, 2014.

Artigos aceitos para publicação

1. [doi>](#) SANTOS, ED W.; OLIVEIRA, DALILA C.; SILVA, GRAZIELA B.; TSUJITA, MARISTELA; **BELTRAN, JACKELINE O.**;
HASTREITER, ARACELI; FOCK, RICARDO A.; BORELLI, Primavera
Hematological alterations in protein malnutrition. NUTRITION REVIEWS. [JCR](#), 2017.

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. [Silva, G.B.](#); [TSUJITA, M.](#); [SANTOS, E. W.](#); **BELTRAN, J. S. O.**; [BORELLI, P.](#)
Role of AKT/mTOR pathway in fibronectin expression mediated by protein malnutrition. In: 43rd Annual Scientific Meeting of the ISEH International Society for Experimental Hematology, 2014, Montreal.
43rd Annual Scientific Meeting of the ISEH International Society for Experimental Hematology. , 2014. v.42. p.S60 - S60

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. DIAS, C. C.; **BELTRAN, J. S. O.**; PEDRO, A. N.; PAREDES-GAMERO, E. J.; [FOCK, R. A.](#)
Bone marrow animal model submitted to protein malnutrition: a decrease in the stem cells hematopoietic pool In: 17 th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies, 2016, Barcelona.
17 th Biennial Meeting of the European Society for immunodeficiencies. , 2016.
2. **BELTRAN, J. S. O.**; [Silva, G.B.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); HASTREITER, A.; [SANTOS, E. W.](#); ARANA-CHAVEZ, V. E.; [FOCK, R. A.](#); [BORELLI, P.](#)
Induction of autophagy by Akt/mTOR pathway in the bone marrow due to protein malnutrition In: 3rd Prof. Eric A. Newsholme Research Symposium, 2016, São Paulo.
3rd Prof. Eric A. Newsholme Research Symposium. , 2016.
3. **BELTRAN, J. S. O.**; [Silva, G.B.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); HASTREITER, A.; [SANTOS, E. W.](#); ARANA-CHAVEZ, V. E.; [FOCK, R. A.](#); [BORELLI, P.](#)
Induction of autophagy by Akt/mTOR pathway in the bone marrow due to protein malnutrition In: 17 th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies, 2016, Barcelona.
17 th Biennial Meeting of the European Society for Immunodeficiencies. , 2016.
4. **BELTRAN, J. S. O.**; [Silva, G.B.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); HASTREITER, A.; [SANTOS, E. W.](#); ARANA-CHAVEZ, V. E.; [FOCK, R. A.](#); [BORELLI, P.](#)
Induction of autophagy by Akt/mTOR pathway in the bone marrow due to protein malnutrition In: 45° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2016, Natal.
45° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. , 2016.
5. [Graziela Batista da Silva](#)); **BELTRAN, J. S. O.**; KATZ, I. S. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; RIBEIRO, O. G.; [Primavera Borelli](#)
Análise proteômica do estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo.
Análise proteômica do estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2011. v.33. p.33 - 293
6. [Karina Nakajima](#); [Amanda Crisma Rabello](#); [Graziela Batista da Silva](#)); **BELTRAN, J. S. O.**; [Primavera Borelli](#)
Comprometimento do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas na desnutrição proteica: o desafio da recuperação

nutricional In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo.

Comprometimento do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas na desnutrição proteica: o desafio da recuperação nutricional. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2011. v.33. p.33 - 293

7. [Amanda Crisma Rabello](#); [Karina Nakajima](#); [Graziela Batista da Silva](#)); BELTRAN, J. S. O.; [Primavera Borelli](#)
Efeito da recuperação nutricional na reversão das alterações na via de NFkB em macrófagos peritoneais de camundongos submetidos à desnutrição proteica In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo.
Efeito da recuperação nutricional na reversão das alterações na via de NFkB em macrófagos peritoneais de camundongos submetidos à desnutrição proteica. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2011. v.33. p.33 - 293
8.  BELTRAN, J. S. O.; [Graziela Batista da Silva](#)); [Karina Nakajima](#); [Amanda Crisma Rabello](#); [Primavera Borelli](#)
Evaluation of involvement of apoptotic processes, necrotic and autophagic marrow hypoplasia in mice submitted to protein malnutrition In: Simpósio anual de pesquisa em ciências farmacêuticas e XLVI Semana Universitária paulista de farmácia e bioquímica, 2011, São Paulo.
Evaluation of involvement of apoptotic processes, necrotic and autophagic marrow hypoplasia in mice submitted to protein malnutrition. Brazilian Journal of pharmaceutical sciences, 2011. v.47. p.85 - 85
9. [Graziela Batista da Silva](#)); BELTRAN, J. S. O.; KATZ, I. S. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; RIBEIRO, O. G.; [Primavera Borelli](#)
Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo.
Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2011. v.33. p.33 - 293
10. [Graziela Batista da Silva](#)); BELTRAN, J. S. O.; KATZ, I. S. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; RIBEIRO, O. G.; [Primavera Borelli](#)
Proteomics analysis of the bone marrow extracellular matrix of mice submitted to protein malnutrition In: Simpósio anual de pesquisa em ciências farmacêuticas e XLVI Semana universitária paulista de farmácia e bioquímica,, 2011, São Paulo.
Proteomics analysis of the bone marrow extracellular matrix of mice submitted to protein malnutrition. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. v.47. p.15 - 15
11. [Karina Nakajima](#); [Amanda Crisma Rabello](#); [Graziela Batista da Silva](#)); BELTRAN, J. S. O.; [Primavera Borelli](#)
Redução da capacidade proliferativa de células célulastronco/progenitoras hemopoéticas na desnutrição proteica: papel do microambiente medular nocomprometimento do ciclo celular In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo.
. Redução da capacidade proliferativa de células célulastronco/progenitoras hemopoéticas na desnutrição proteica: papel do microambiente medular nocomprometimento do ciclo celular. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2011. v.33. p.33 - 293
12. [Graziela Batista da Silva](#)); [Karina Nakajima](#); [Amanda Crisma Rabello](#); BELTRAN, J. S. O.; [FOCK, R. A.](#); [Primavera Borelli](#)
Avaliação da fibronectina no estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2010, São Paulo.
Avaliação da fibronectina no estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica. Revista brasileira de hematologia e hemoterapia, 2010. v.32. p.89 - 89
13. [Graziela Batista da Silva](#)); [Karina Nakajima](#); [Amanda Crisma Rabello](#); BELTRAN, J. S. O.; [FOCK, R. A.](#); [Primavera Borelli](#)
Evaluation of fibronectin in bone marrow stroma of mice subjected to protein malnutrition In: XV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA, 2010, São Paulo.
XV SEMANA FARMACÊUTICA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Brazilian journal of Pharmaceutical Sciences, 2010. v.26. p.36 - 36

Artigos em jornal de notícias

1. BELTRAN, J. S. O.; [Graziela Batista da Silva](#)); [OLIVEIRA, D. C.](#); MASSARO, R. R.; MARIA-ENGLER, S. S.; OLIVEIRA, T. C.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; [BORELLI, P.](#)
Desnutrição Proteica ativa a sinalização da via autofágica regulada por mTOR na medula óssea. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.60 - 60, 2013.
2. [TSUJITA, M.](#); BELTRAN, J. S. O.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; FOCK, R.; [Silva, G.B.](#); [BORELLI, P.](#)
Efeitos da desnutrição proteica na densidade óssea e aspectos ósseos microanatômicos. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. São Paulo, p.343 - 343, 2013.
3. [SANTOS, E. W. C. O.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); BELTRAN, J. S. O.; HASTREITER, A.; [Silva, G.B.](#); [TSUJITA, M.](#); FOCK, R.; [BORELLI, P.](#)
Efeitos de dietas hipoproteica ou hiperlipídica nos parâmetros hematológicos e imunológicos em modelo murino. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. , p.342 - 342, 2013.

4. BELTRAN, J. S. O.; [Silva, G.B.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); [SANTOS, E. W.](#); [BORELLI, P.](#)
Effect of Protein Malnutrition and the mechanisms of apoptosis, necrosis and autophagy in marrow hypoplasia. J Nutrigenet Nutrigenomics. São Paulo, p.171 - 302, 2012.

Apresentação de trabalho e palestra

1. BELTRAN, J. S. O.; SILVA, GRAZIELA BATISTA DA; [OLIVEIRA, D. C.](#); [SANTOS, E. W.](#); [FOCK, R. A.](#); ARANA-CHAVEZ, V. E.; [BORELLI, P.](#)
Induction of autophagy by Akt/mTOR pathway in the bone marrow due to protein malnutrition, 2016. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
2. BELTRAN, J. S. O.; SILVA, GRAZIELA BATISTA DA; [OLIVEIRA, D. C.](#); [SANTOS, E. W.](#); ARANA-CHAVEZ, V. E.; [FOCK, R. A.](#); [BORELLI, P.](#)
Induction of autophagy by Akt/mTOR pathway in the bone marrow due to protein malnutrition, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
3. BELTRAN, J. S. O.; [BORELLI, P.](#)
Induction of autophagy by AKT/mTOR pathway in the bone marrow due to protein malnutrition, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
4. BELTRAN, J. S. O.; [Silva, G.B.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); [SANTOS, E. W.](#); ARANA-CHAVEZ, V. E.; [FOCK, R. A.](#); [BORELLI, P.](#)
Induction of autophagy by AKT/mTOR pathway in the bone marrow due to protein malnutrition, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
5. BELTRAN, J. S. O.
Métodos de monitoramento da autofagia, 2016. (Seminário, Apresentação de Trabalho)
6. [SANTOS, E. W.](#); DIAS, C. C.; [OLIVEIRA, D. C.](#); HASTREITER, A.; [Silva, G.B.](#); BELTRAN, J. S. O.; [FOCK, R. A.](#); [BORELLI, P.](#)
Protein Restriction Changes stromal Cellularity in Lon-Term Bone Marrow Culture in Mice, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
7. [SANTOS, E. W. C. O.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); BELTRAN, J. S. O.; [FOCK, R. A.](#); HASTREITER, A.; [Primavera Borelli](#)
Avaliação da função de macrófagos peritonias de camundongos submetidos à dieta hipoproteica ou dieta hiperlipídica, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
8. [OLIVEIRA, D. C.](#); [SANTOS, E. W.](#); BELTRAN, J. S. O.; BORELLI, Primavera; [FOCK, R. A.](#)
Evaluation of Glutamine as Modulator of The transcription Factor NF- κ B in Macrophages from mice Subjected to Dietary Restriction/ B140, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
9. [SANTOS, E. W.](#); DIAS, C. C.; [OLIVEIRA, D. C.](#); HASTREITER, A.; [Silva, G.B.](#); BELTRAN, J. S. O.; PAREDES-GAMERO, E. J.; [BORELLI, P.](#)
Ex vivo study of hematopoiesis in protein malnutrition: characterization of bone marrow stromal cells in mice, 2015. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
10. [Silva, G.B.](#); HASTREITER, A.; MASSARO, R. R.; [TSUJITA, M.](#); BELTRAN, J. S. O.; MARIA-ENGLER, S. S.; [BORELLI, P.](#)
Protein Malnutrition modifies fibronectin remodeling capability in long-term bone marrow culture, 2015. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
11. BELTRAN, J. S. O.; [Silva, G.B.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); OLIVEIRA, T. C.; [SANTOS, E. W.](#); ARANA-CHAVEZ, V. E.; [BORELLI, P.](#)
Desnutrição Proteica ativa a sinalização autofágica regulada por Akt/mTOR nas células de medula óssea, 2014. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
12. [Silva, G.B.](#); [TSUJITA, M.](#); [SANTOS, E. W.](#); BELTRAN, J. S. O.; [BORELLI, P.](#)
'Role of AKT/mTOR Pathway in Fibronectin Expression mediated by Protein Malnutrition', 2014. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
13. [SANTOS, E. W.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); BELTRAN, J. S. O.; [Silva, G.B.](#); [TSUJITA, M.](#); CARMO, L. S.; [RABELLO, A. C.](#); FOCK, R.; [BORELLI, P.](#)
Valores de referência de parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss Webster, C57BL/6, BALB/c e ratos Wistar, 2014. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
14. [SANTOS, E. W.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); BELTRAN, J. S. O.; [Silva, G.B.](#); [TSUJITA, M.](#); CARMO, L. S.; [RABELLO, A. C.](#); FOCK, R.; [BORELLI, P.](#)
Valores de referência de parâmetros hematológicos e bioquímicos de camundongos Swiss Webster, C57BL/6, BALB/c e ratos

- Wistar, 2014. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
15. BELTRAN, J. S. O.; [Silva, G.B.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); [SANTOS, E. W.](#); [Primavera Borelli](#)
Avaliação da participação dos processos apoptóticos, necróticos e autofágicos na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2013. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
16. BELTRAN, J. S. O.; [Silva, G.B.](#); [SANTOS, E. W.](#); MASSARO, R. R.; MARIA-ENGLER, S. S.; OLIVEIRA, T. C.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; [BORELLI, P.](#); [OLIVEIRA, D. C.](#)
Desnutrição Proteica ativa a sinalização da via autofágica regulada por mTOR na medula óssea, 2013. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
17.  BELTRAN, J. S. O.; [Graziela Batista da Silva](#); [OLIVEIRA, D. C.](#); [SANTOS, E. W. C. O.](#); [Primavera Borelli](#)
Effect of protein malnutrition in the mechanisms of apoptosis, necrosis and autophagy in marrow hypoplasia, 2012. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
18. [Graziela Batista da Silva](#); BELTRAN, J. S. O.; [Primavera Borelli](#)
Análise Proteômica do Estroma Medular de Camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2011. (Seminário, Apresentação de Trabalho)
19. [Graziela Batista da Silva](#); BELTRAN, J. S. O.; KATZ, I. S. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; [Primavera Borelli](#)
Análise Proteômica do Estroma Medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
20. BELTRAN, J. S. O.; [Graziela Batista da Silva](#); [Karina Nakajima](#); [Amanda Crisma Rabello](#); [Primavera Borelli](#)
Avaliação da participação dos processos de apoptose, necrose e autofagia na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
21.  BELTRAN, J. S. O.; [Graziela Batista da Silva](#); [Amanda Crisma Rabello](#); [Karina Nakajima](#); [Primavera Borelli](#)
Avaliação dos processos de Apoptose, Necrose e Autofagia na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
22.  BELTRAN, J. S. O.; [Graziela Batista da Silva](#); [Amanda Crisma Rabello](#); [Karina Nakajima](#); [Primavera Borelli](#)
Avaliação dos processos de apoptose, necrose e autofagia na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2011. (Seminário, Apresentação de Trabalho)
23. [Karina Nakajima](#); [Amanda Crisma Rabello](#); [Graziela Batista da Silva](#); BELTRAN, J. S. O.; [Primavera Borelli](#)
Comprometimento do ciclo celular de células tronco/progenitoras hemopoéticas na desnutrição proteica: o desafio da recuperação nutricional, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
24. [Amanda Crisma Rabello](#); [Karina Nakajima](#); [Graziela Batista da Silva](#); BELTRAN, J. S. O.; [Primavera Borelli](#)
Efeito da recuperação nutricional na reversão das alterações na via de NFkB em macrófagos peritoniais de camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
25. [Graziela Batista da Silva](#); BELTRAN, J. S. O.; KATZ, I. S. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; RIBEIRO, O. G.; [Primavera Borelli](#)
Pesquisa de Isoformas da Fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
26. [Graziela Batista da Silva](#); BELTRAN, J. S. O.; KATZ, I. S. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; RIBEIRO, O. G.; [Primavera Borelli](#)
Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
27. [Graziela Batista da Silva](#); BELTRAN, J. S. O.; KATZ, I. S. S.; ALBUQUERQUE, L. L.; RIBEIRO, O. G.; [Primavera Borelli](#)
Proteomics Analysis of the bone marrow extracellular matrix of mice submitted to protein malnutrition, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)
28. [Karina Nakajima](#); [Amanda Crisma Rabello](#); [Graziela Batista da Silva](#); BELTRAN, J. S. O.; [Primavera Borelli](#)
Redução da capacidade proliferativa de células tronco/progenitoras hemopoéticas na desnutrição proteica: papel do microambiente medular no comprometimento do ciclo celular, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)
29. [MELLO, A. S.](#); BELTRAN, J. S. O.; CARMO, L. S.; [OLIVEIRA, D. C.](#); [Primavera Borelli](#); [FOCK, R. A.](#)

The Influence of protein-energy malnutrition on proliferation capacity and quantification of lymphocytes subtypes in spleen cells, 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

30. [MELLO, A. S.](#); BELTRAN, J. S. O.; CARMO, L. S.; [OLIVEIRA, D. C.](#); [Primavera Borelli](#); [FOCK, R. A.](#)

The Influence of protein-energy malnutrition on proliferation capacity and quantification of lymphocytes subtypes in spleen cells, 2011. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **BELTRAN, J. S. O.**
Ciclo Celular e Apoptose, 2016. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. Avaliador no(a) **FEBRACE Feira Brasileira de Ciências e Engenharia**, 2016. (Feira)
Avaliador da área de Ciências.
2. Avaliador no(a) **FEBRACE Feira Brasileira de Ciências e Engenharia**, 2015. (Feira)
Avaliadora dos trabalhos relacionados a Ciências Exatas e da Terra, Ciências Biológicas e Ciências da Saúde.
3. **II Symposium on Cell Death ICB-USP**, 2015. (Simpósio)
4. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2011. (Congresso)
Avaliação da participação dos processos de apoptose, necrose e autofagia na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica.
5. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2011. (Congresso)
Pesquisa de isoformas da fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica.
6. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2011. (Congresso)
Análise Proteômica do Estroma Medular de Camundongos submetidos à desnutrição proteica.
7. **III Simpósio de Pós Graduação de Análises Clínicas**, 2011. (Simpósio)
8. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XLVI Semana Farmacêutica USP**, 2011. (Simpósio)
Avaliação dos processos de Apoptose, Necrose e Autofagia na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica.
9. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XLVI Semana Universitária Paulista de Farmácia e Bioquímica**, 2011. (Simpósio)
The Influence of protein-energy malnutrition on proliferation capacity and quantification of lymphocytes subtypes in spleen cells.
10. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XX Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli**, 2011. (Simpósio)
Análise Proteômica do Estroma Medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica.
11. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XX Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli**, 2011. (Simpósio)
Avaliação da apoptose, necrose e autofagia na hipoplasia medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica.
12. Apresentação Oral no(a) **XX Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli**, 2011. (Simpósio)
Pesquisa de Isoformas da Fibronectina em culturas de longa duração de estroma medular de camundongos submetidos à desnutrição proteica.

13. Apresentação de Poster / Painel no(a) **Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia**, 2010. (Congresso)
Avaliação da fibronectina no estroma medular de camundongos submetidos a desnutrição protéica.
14. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XV Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia USP**, 2010. (Simpósio)
Evaluation of fibronectin in bone marrow stroma of mice subjected to protein malnutrition.
15. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XXV Reunião Anual da FESBE**, 2010. (Simpósio)
"Avaliação da Fibronectina no Estroma Medular de Camundongos Submetidos à Desnutrição Protéica".

Organização de evento

1. **BELTRAN, J. S. O.**
II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology, 2016. (Congresso, Organização de evento)
2. **BELTRAN, J. S. O.**
VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas(SIMPAC) e I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology, 2015. (Congresso, Organização de evento)
3.  **BELTRAN, J. S. O.**
Diabetes Mellitus, 2006. (Outro, Organização de evento)
4. **BELTRAN, J. S. O.**
Tipagem Sanguínea (ABO e Rh), 2006. (Outro, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de comissões julgadoras

Outra

1. **Comissão de Avaliação 14ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia**, 2016
Escola Politécnica Worksheet
2. **Comissão de Pré-avaliação 14ª Feira Brasileira de Ciências e Engenharia**, 2015

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico	4
Artigos aceitos para publicação	1
Jornais de Notícias	4
Trabalhos publicados em anais de eventos	14
Apresentações de trabalhos (Congresso)	17
Apresentações de trabalhos (Seminário)	3
Apresentações de trabalhos (Simpósio)	10

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (aperfeiçoamento)	1
Eventos	
Participações em eventos (congresso)	4
Participações em eventos (simpósio)	9
Organização de evento (congresso)	2
Organização de evento (outro)	2
Participação em banca de comissões julgadoras (outra)	2

Outras informações relevantes

- 1 Experiência Profissional na área laboratorial e coletas em geral.
Programa de Aperfeiçoamento de Ensino-PAE 2011 e 2016 Universidade de São Paulo - USP
Disciplina: Hematologia Clínica e Fisiologia do Sistema Hemopoético Responsável pela disciplina: Primavera Borelli
Representante discente do Programa de Pós- Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas-USP



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 6857275/1 - Jackeline Soares de Oliveira Beltran

Email: jackbeltran@usp.br
Data de Nascimento: 13/10/1986
Cédula de Identidade: RG - 40.564.275-1 - SP
Local de Nascimento: Estado de São Paulo
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Licenciada em Ciências Biológicas - Universidade do Grande A B C - São Paulo - Brasil - 2008
Mestrado: Mestra em Ciências - Área: Análises Clínicas - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo - São Paulo - Brasil - 2013

Curso: Doutorado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 07/03/2014
Início da Contagem de Prazo: 07/03/2014
Data Limite para o Depósito: 25/04/2018
Orientador: Prof(a). Dr(a). Primavera Borelli Garcia - 10/08/2016 até o presente. Email: borelli@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Joao Gustavo Pessini Amarante Mendes - 10/08/2016 até o presente. Email: gpam@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 07/03/2014
Prorrogação(ões): 49 dias
 Período de 07/03/2018 até 25/04/2018
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 03/05/2016
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 07/03/2014
 Prorrogação em 07/03/2018

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 07/03/2018

Impresso em: 22/04/2018 23:20:24

- Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

FICHA DO ALUNO

9142 - 6857275/1 - Jackeline Soares de Oliveira Beltran

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5899-2/3	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	100	A	N	Concluída
BIF5707-3/1	Regulação da Expressão Gênica em Processos Fisiológicos (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	24/04/2014	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5792-3/1	Tópicos em Análises Clínicas III	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5766-4/1	Tópicos em Análises Clínicas IV	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
MPT5780-2/2	Genética Forense (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	09/09/2014	13/10/2014	75	5	100	A	N	Concluída
BMF5862-4/1	Ciclo Celular e Apoptose (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	03/11/2014	23/11/2014	90	6	100	A	N	Concluída
BIO5749-2/3	Biologia Molecular da Célula-Tronco (Instituto de Biociências -	01/04/2015	09/06/2015	60	4	87	A	N	Concluída

	Universidade de São Paulo)									
	Métodos Utilizados para a Fenotipagem de									
	Animais Geneticamente Modificados (Curso Interunidades: Biotecnologia - Universidade de São Paulo)									
BTC5805-1/3		02/11/2015	29/11/2015	60	4	100	A	N	Concluída	
	Sinalização Celular (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)									
BIF5794-1/1		13/09/2016	21/11/2016	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada	

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	35
Estágios:			
Total:	0	20	35

Créditos Atribuídos à Tese: 167

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: Prorrogação em 07/03/2018

Impresso em: 22/04/2018 23:20:24

11.0 REFERÊNCIAS

ALTOMARE, D.; R. KHALED, A. Homeostasis and the Importance for a Balance Between AKT/mTOR Activity and Intracellular Signaling. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 22, p. 3748–3762, 2012.

AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; WEISSMAN, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, v. 404, n. 6774, p. 193–197, 2000.

BANKAITIS, V. A. Unsaturated fatty acid-induced non-canonical autophagy: unusual? Or unappreciated? *The EMBO journal*, v. 34, n. 8, p. 978–980, 2015.

BERG, J., TYMOCZKO, J. and STRYER, L.; *Biochemistry, International Edition*, W.H. Freeman and Company, 2006.

BEHRENDTS, C.; SOWA, M. E.; GYGI, S. P.; HARPER, J. W. Network organization of the human autophagy system. *Nature*, v. 466, n. 7302, p. 68–76, 2010.

BELTRAN, J.S.O. Avaliação da apoptose, necrose e autofagia em células totais de medula óssea. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, 2013.

BORELLI, P.; BARROS, F. E. V.; NAKAJIMA, K. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira De Biofísica* v. 42, n. 6, p. 523–530, 2009.

BLACKSTONE, C.; O’KANE, C. J.; REID, E. Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nature Reviews. Neuroscience*, v. 12, n. 1, p. 31–42, 2011.

CAMPBELL, T. B.; BASU, S.; HANGOC, G.; TAO, W.; BROXMEYER, H. E. Overexpression of Rheb2 enhances mouse hematopoietic progenitor cell growth while impairing stem cell repopulation. *Blood*, v. 114, n. 16, p. 3392–3401, 2009.

CHRISTENSEN, J. L.; WEISSMAN, I. L. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, n. 25, p. 14541–14546, 2001.

CAO, Y.; ZHANG, A.; CAI, J. Autophagy regulates the cell cycle of murine HSPCs in a nutrient-dependent manner. *Experimental Hematology*, v. 43, n. 3, p. 229–242, 2015.

CAO, Y.; CAI, J.; ZHANG, S. Loss of autophagy leads to failure in megakaryopoiesis, megakaryocyte differentiation, and thrombopoiesis in mice. *Experimental Hematology*, v. 43, n. 6, p. 488–494, 2015.

CARVALHO NF; CARRINGTON PH ; HALL DE e KENNEY RD. Severe nutritional deficiencies in toddlers resulting from health food milk alternatives. *Pediatrics*. v.107,p.:4-45,2001.

CHALLEN, G. A.; BOLES, N.; LIN, K.-Y. K.; GOODELL, M. A. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry Part A*, v. 75A, n. 1, p. 14–24, 2009.

CHEN, Y.; KLIONSKY, D. J. The regulation of autophagy - unanswered questions. *Journal of cell science*, v. 124, n. Pt 2, p. 161–170, 2011.

CHEN, C.; LIU, Y.; LIU, R. TSC-mTOR maintains quiescence and function of hematopoietic stem cells by repressing mitochondrial biogenesis and reactive oxygen species. *Journal of Experimental Medicine*, v. 205, n. 10, p. 2397–2408, 2008.

CHEN, C.; LIU, Y.; LIU, Y.; ZHENG, P. Mammalian target of rapamycin activation underlies HSC defects in autoimmune disease and inflammation in mice. *Journal of Clinical Investigation*, v. 120, n. 11, p. 4091–4101, 2010.

CHO, H.; THORVALDSEN, J. L.; CHU, Q.; FENG, F.; BIRNBAUM, M. J. Akt1/PKB α is required for normal growth but dispensable for maintenance of

glucose homeostasis in mice. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 42, p. 38349–38352, 2001.

CALAUTTI, E. Akt modes of stem cell regulation: more than meets the eye? *Discoveries*, v. 1, 2013.

COLLER, H. A.; SANG, L.; ROBERTS, J. M. A New Description of Cellular Quiescence. *PLoS Biology*, v. 4, n. 3, p. e83, 2006.

DAN, H. C.; EBBS, A.; PASPARAKIS, M. Akt-dependent activation of mTORC1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by I κ B kinase α (IKK α). *The Journal of Biological Chemistry*, v. 289, n. 36, p. 25227–25240, 2014.

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

DEY, N.; GHOSH-CHOUDHURY, N.; DAS, F. PRAS40 acts as a nodal regulator of high glucose-induced TORC1 activation in glomerular mesangial cell hypertrophy. *Journal of Cellular Physiology*, v. 225, n. 1, p. 27–41, 2010.

DE ONIS, M.; HABICHT, J. P. Anthropometric reference data for international use: recommendations from a World Health Organization Expert Committee. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v.64, p.650-658, 1996.

DERETIC, V.; SAITOH, T.; AKIRA, S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nature Reviews. Immunology*, v. 13, n. 10, p. 722–737, 2013.

DENTON, D.; CHANG, T.-K.; NICOLSON, S. Relationship between growth arrest and autophagy in midgut programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation*, v. 19, n. 8, p. 1299–1307, 2012.

DHINGRA, R.; GANG, H.; WANG, Y. Bidirectional regulation of nuclear factor- κ B and mammalian target of rapamycin signaling functionally links Bnip3 gene repression and cell survival of ventricular myocytes. *Circulation. Heart Failure*, v. 6, n. 2, p. 335–343, 2013.

DODD, K. M.; DUNLOP, E. A. Tuberous sclerosis—A model for tumour growth. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 52, p. 3–11, 2016.

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

EHNINGER, A.; TRUMPP, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of experimental medicine*, v. 208, n. 3, p. 421–428, 2011..

FAN YJ.; ZONG W. The cellular decision between apoptosis and autophagy. *Cancer Chin J.* v. 10 ,2012.

FAO – Food and agriculture organization of the United Nations. www.fao.org, 2014 e 2015.

FOCK, R. A.; BLATT, S. L.; BEUTLER, B. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein–energy malnutrition. *Nutrition*, v. 26, n. 10, p.1021–1028, 2010.

FRANSECKY, L.; MOCHMANN, L. H.; BALDUS, C. D. Outlook on PI3K/AKT/mTOR inhibition in acute leukemia. *Molecular and Cellular Therapies*, v. 3, p. 2, 2015.

GAN, B.; HU, J.; JIANG, S. Lkb1 regulates quiescence and metabolic homeostasis of haematopoietic stem cells. *Nature*, v. 468, n. 7324, p. 701–704, 2010.

GANLEY, I. G.; LAM, D. H.; WANG, J. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 18, p. 12297–12305, 2009.

GE, L.; MELVILLE, D.; ZHANG, M.; SCHEKMAN, R. The ER-Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *eLife*, v. 2, p. e00947, 2013.

GIUSTO, M.; LATTANZI, B.; DI GREGORIO, Changes in nutritional status after liver transplantation. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 31, p.682–690, 2014.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of biological chemistry*, v. 177, n. 2, p. 751–766, 1949.

GUO, F.; ZHANG, S.; GROGG, M.; Mouse gene targeting reveals an essential role of mTOR in hematopoietic stem cell engraftment and hematopoiesis. *Haematologica*, v. 98, n. 9, p. 1353–1358, 2013.

GURUMURTHY, S.; XIE, S. Z.; ALAGESAN, B. The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival. *Nature*, v. 468, n. 7324, p. 659–663, 2010

HAN, J. M.; PATTERSON, S. J.; LEVINGS, M. K. The Role of the PI3K Signaling Pathway in CD4(+) T Cell Differentiation and Function. *Frontiers in Immunology*, v. 3, p. 245, 2012.

HARA, K.; YONEZAWA, K.; WENG, Q. P. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 23, p. 14484–14494, 1998.

HAYASHI-NISHINO, M.; FUJITA, N.; NODA, T.; A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nature Cell Biology*, v. 11, n. 12, p. 1433–1437, 2009.

HASIMA, N.; OZPOLAT, B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death & Disease*, v. 5, p. e1509, 2014.

HAMASAKI, M.; FURUTA, N.; MATSUDA, A.; Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, v. 495, n. 7441, p. 389–393, 2013.

HOSOKAWA, N.; HARA, T.; KAIZUKA, T. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, n. 7, p. 1981–1991, 2009.

HUANG, J.; NGUYEN-MCCARTY, M.; HEXNER, E. O.; DANET-DESNOYERS, G.; KLEIN, P. S. Maintenance of hematopoietic stem cells through regulation of Wnt and mTOR pathways. *Nature Medicine*, v. 18, n. 12, p. 1778–1785, 2012.

INOKI, K.; LI, Y.; ZHU, T.; WU, J.; GUAN, K.-L. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biology*, v. 4, n. 9, p. 648–657, 2002.

INDRA, A. K.; WAROT, X.; BROCARD, J. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic acids research*, v. 27, n. 22, p. 4324–4327, 1999.

JEWELL, J. L.; KIM, Y. C.; RUSSELL, R. C. Metabolism. Differential regulation of mTORC1 by leucine and glutamine. *Science (New York, N.Y.)*, v. 347, n. 6218, p. 194–198, 2015.

JEFFERY, E.; CHURCH, C. D.; HOLTRUP, B.; COLMAN, L.; RODEHEFFER, M. S. Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity. *Nature Cell Biology*, v. 17, n. 4, p. 376–385, 2015.

JOSHI, A.; KUNDU, M. Mitophagy in hematopoietic stem cells: The case for exploration. *Autophagy*, v. 9, n. 11, p. 1737–1749, 2013.

JUN-LIN, G.; SIMON, A. K.; PRESCOTT, M. Autophagy in stem cells. *Autophagy*, v. 9, n. 6, p. 830–849, 2013.

JUNG, C. H.; JUN, C. B.; RO, S.-H. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Molecular Biology of the Cell*, v. 20, n. 7, p. 1992–2003, 2009.

JUNTILLA, M. M.; PATIL, V. D.; CALAMITO, M. AKT1 and AKT2 maintain hematopoietic stem cell function by regulating reactive oxygen species. *Blood*, v. 115, n. 20, p. 4030–4038, 2010.

KING, K. Y.; GOODELL, M. A. Inflammatory modulation of HSCs: viewing the HSC as a foundation for the immune response. *Nature Reviews Immunology*, v. 11, n. 10, p. 685–692, 2011.

KHAMINETS, A.; BEHL, C.; DIKIC, I. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology*, v. 26, n. 1, p. 6–16, 2016.

KNUPPERTZ, L.; OSIEWACZ, H. D. Orchestrating the network of molecular pathways affecting aging: Role of nonselective autophagy and mitophagy. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 153, p. 30–40, 2016.

KROCK, B.; SKULI, N.; SIMON, M. C. The tumor suppressor LKB1 emerges as a critical factor in hematopoietic stem cell biology. *Cell Metabolism*, v. 13, n. 1, p. 8–10, 2011.

KARANTZA-WADSWORTH, V.; PATEL, S.; KRAVCHUK, O. Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes & Development*, v. 21, n. 13, p. 1621–1635, 2007.

KAIZUKA, T.; HARA, T.; OSHIRO, N. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 26, p. 20109–20116, 2010.

KANG, Y.-A.; SANALKUMAR, R.; O'GEEN, H. Autophagy Driven by a Master Regulator of Hematopoiesis. *Molecular and Cellular Biology*, v. 32, n. 1, p. 226–239, 2012.

KIM, S.; KIM, S. F.; MAAG, D. Amino acid signaling to mTOR mediated by inositol polyphosphate multikinase. *Cell Metabolism*, v. 13, n. 2, p. 215–221, 2011.

KOTA, S. K.; GAYATRI, K.; JAMMULA, S. Fetal endocrinology. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, v. 17, n. 4, p. 568–579, 2013.

KOMATSU M.,KOMINAMI E. Autophagic-lysosomal system: physiology and pathology. *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. v.26, p. 75-81, 2006

KOMATSU, M.; WAGURI, S.; UENO, T. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *The Journal of cell biology*, v. 169, n. 3, p. 425–434, 2005.

KRAFT, C.; KIJANSKA, M.; KALIE, E.; et al. Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *The EMBO journal*, v. 31, n. 18, p.3691–3703, 2012.

KIHARA A., NODA T., ISHIHARA N., OHSUMI Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* V.152,p.519-530,2001.

KIM, J.; KUNDU, M.; VIOLLET, B.; GUAN, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, v. 13, n. 2, p.132–141, 2011.

KLIONSKY DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 931–937.

KLIONSKY DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 8: 931–937.

KUMA A., MIZUSHIMA N. Physiological role of autophagy as an intracellular recycling system: with an emphasis on nutrient metabolism. *Semin Cell Dev Biol.*v.21, p.90-683,2010.

LAMB, C. A.; YOSHIMORI, T.; TOOZE, S. A. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 14, n. 12, p. 759–774, 2013.

LAMARK, T.; JOHANSEN, T. Autophagy: links with the proteasome. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 22, n. 2, p. 192–198, 2010.

LEE, I.; HENDRIX, A.; KIM, J.; YOSHIMOTO, J.; YOU, Y.-J. Metabolic Rate Regulates L1 Longevity in *C. elegans*. (P. Callaerts, Org.)*PLoS ONE*, v. 7, n. 9, p. e44720, 2012.

LEPPER, C.; FAN, C.-M. Generating Tamoxifen-Inducible Cre Alleles to Investigate Myogenesis in Mice. In: J. X. DiMario (Org.); *Myogenesis*. v. 798, p.297–308, 2012. Totowa, NJ: Humana Press. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-343-1_17>.

LIPPAI, M.; LÖW, P. The role of the selective adaptor p62 and ubiquitin-like proteins in autophagy. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 832704, 2014.

LOCK R, DEBNATH J. Extracellular matrix regulation of autophagy. *Curr Opin Cell Biol*. 2008 Oct;20(5):583–8.

LORIN, S.; TOL, M. J.; BAUVY, C. Glutamate dehydrogenase contributes to leucine sensing in the regulation of autophagy. *Autophagy*, v. 9, n. 6, p. 850–860, 2013.

LIU, X.; LIN, Y.; TIAN, B. Maternal protein restriction alters VEGF signaling and decreases pulmonary alveolar in fetal rats. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 7, n. 6, p. 3101–3111, 2014.

LOOS, B.; ENGELBRECHT, A.-M.; LOCKSHIN, R. A.; KLIONSKY, D. J.; ZAKERI, Z. The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. *Autophagy*, v. 9, n. 9, 2013.

LOOS B, Engelbrecht A-M. Cell death: a dynamic response concept. *Autophagy*. 2009 Jul;5(5):590–603.

LEVEQUE, L.; LE TEXIER, L.; LINEBURG, K. E.; HILL, G. R.; MACDONALD, K. P. Autophagy and haematopoietic stem cell transplantation. *Immunology and Cell Biology*, v. 93, n. 1, p. 43–50, 2015. Acesso em: 29/4/2015.

LEVEQUE, L.; LE TEXIER, L.; LINEBURG, K. E.; HILL, G. R.; MACDONALD, K. P. Autophagy Is Required For Long-Term Hematopoietic Stem Cell (HSC) Function and G-CSF-Induced HSC Mobilization. *Blood*.v.122,n. 21, p.892 2013

LIU, F.; LEE, J. Y.; WEI, H.; et al. FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells. *Blood*, v. 116, n. 23, p. 4806–4814, 2010.

MAIURI, M. C.; ZALCKVAR, E.; KIMCHI, A.; KROEMER, G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 8, n. 9, p. 741–752, 2007

MORGAN-BATHKE, M.; LIN, H. H.; CHIBLY, A. M. Deletion of ATG5 Shows a Role of Autophagy in Salivary Homeostatic Control. *Journal of Dental Research*, v. 92, n. 10, p. 911–917, 2013.

MELLO, A. S.; DE OLIVEIRA, D. C.; BIZZARRO, B.; et al. Protein Malnutrition Alters Spleen Cell Proliferation and IL-2 and IL-10 Production by Affecting the STAT-1 and STAT-3 Balance. *Inflammation*, 2014.

MEENHUIS, A.; VAN VEELLEN, P. A.; DE LOOPER, H. MiR-17/20/93/106 promote hematopoietic cell expansion by targeting sequestosome 1-regulated pathways in mice. *Blood*, v. 118, n. 4, p. 916–925, 2011.

MEHTA, P.; HENAULT, J.; KOLBECK, R.; SANJUAN, M. A. Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity. *Current Opinion in Immunology*, v. 26, p. 69–75, 2014.

MIHARADA, K.; KARLSSON, G.; REHN, M. Cripto regulates hematopoietic stem cells as a hypoxic-niche-related factor through cell surface receptor GRP78. *Cell Stem Cell*, v. 9, n. 4, p. 330–344, 2011.

MIZUSHIMA, N. The role of mammalian autophagy in protein metabolism. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, v. 83, n. 2, p. 39–46, 2007.

MORGAN-BATHKE, M.; LIN, H. H.; CHIBLY, A. M. Deletion of ATG5 Shows a Role of Autophagy in Salivary Homeostatic Control. *Journal of Dental Research*, v. 92, n. 10, p. 911–917, 2013.

MORTENSEN, M.; WATSON, A. S.; SIMON, A. K. Lack of autophagy in the hematopoietic system leads to loss of hematopoietic stem cell function and dysregulated myeloid proliferation. *Autophagy*, v. 7, n. 9, p. 1069–1070, 2011.

MORTENSEN, M.; FERGUSON, D. J. P.; EDELMANN, M. Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 2, p. 832–837, 2010.

NAKAJIMA, K.; CRISMA, A. R.; SILVA, G. B. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down- regulation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, v. 30, n. 1, p. 82–89, 2014.

NAZIO, F.; CECCONI, F. mTOR, AMBRA1, and autophagy: an intricate relationship. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, v. 12, n. 16, p. 2524–2525, 2013.

NICKLIN, P.; BERGMAN, P.; ZHANG, B. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*, v. 136, n. 3, p. 521–534, 2009.

ÖZKALE, M.; SIPAHI, T. Hematologic and Bone Marrow Changes in Children with Protein-Energy Malnutrition. *Pediatric Hematology-Oncology*, v. 31, n. 4, p. 349–358, 2014.

OH, W. J.; JACINTO, E. mTOR complex 2 signaling and functions. *Cell Cycle*, v. 10, n. 14, p. 2305–2316, 2011.

PHADWAL, K.; WATSON, A. S.; SIMON, A. K. Tightrope act: autophagy in stem cell renewal, differentiation, proliferation, and aging. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, v. 70, n. 1, p. 89–103, 2013.

PARMAR, K.; MAUCH, P.; VERGILIO, J.-A.; SACKSTEIN, R.; DOWN, J. D. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 13, p. 5431–5436, 2007.

PASSEGUÉ, E.; JAMIESON, C. H. M.; AILLES, L. E.; WEISSMAN, I. L. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100 Suppl 1, p. 11842–11849, 2003.

PRONK, C. J. H.; ROSSI, D. J.; MÅNSSON, R. Elucidation of the phenotypic, functional, and molecular topography of a myeloerythroid progenitor cell hierarchy. *Cell stem cell*, v. 1, n. 4, p. 428–442, 2007.

QI, Z.; HE, Q.; JI, L.; DING, S. Antioxidant supplement inhibits skeletal muscle constitutive autophagy rather than fasting-induced autophagy in mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2014, p. 315896, 2014.

RABINOWITZ, J.D. ; WHITE, E. Autophagy and Metabolism .*Sciencemag*.v.330, 2010.

RAVIKUMAR, B.; MOREAU, K.; JAHREISS, L.; PURI, C.; RUBINSZTEIN, D. C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nature Cell Biology*, v. 12, n. 8, p. 747–757, 2010.

REEDS, P.J.; GARLICK, P.J. Protein and amino acids for humans.*J.Nutr*.v.130,2000.

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. *The Journal of Nutrition*, v. 123, n. 11, p. 1939–1951, 1993.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e setudos de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan*, v. 20, p.315-28, 1947.

ROMANOV, J.; WALCZAK, M.; IBIRICU, I. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *The EMBO journal*, v. 31, n. 22, p. 4304–4317, 2012.

RUBINSTEIN, A. D.; EISENSTEIN, M.; BER, Y.; BIALIK, S.; KIMCHI, A. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Molecular Cell*, v. 44, n. 5, p. 698–709, 2011.

SHAW, R. J.; KOSMATKA, M.; BARDEESY, N. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 10, p. 3329–3335, 2004.

SARKAR, S. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society Transactions*, v. 41, n. 5, p. 1103–1130, 2013.

SANCAK, Y.; BAR-PELED, L.; ZONCU, R. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*, v. 141, n. 2, p. 290–303, 2010.

SANCHEZ-WANDELMER, J.; REGGIORI, F. Amphisomes: out of the autophagosome shadow?: Amphisome-like compartments regulate mucin secretion. *The EMBO Journal*, v. 32, n. 24, p. 3116–3118, 2013.

SABATINI DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. **Nat Rev Cancerv.**6,p. 729–734,2006.

SABATINI,D.; PELED, L.SnapShot: mTORC1 Signaling at the Lysosomal Surface.*Cell.*v.6,p.1390-1390,2012.

SANJUAN, M. A.; DILLON, C. P.; TAIT, S. W. G. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*, v. 450, n. 7173, p. 1253–1257, 2007.

SERWOLD, T.; EHRLICH, L. I. R.; WEISSMAN, I. L. Reductive isolation from bone marrow and blood implicates common lymphoid progenitors as the major source of thymopoiesis. *Blood*, v. 113, n. 4, p. 807–815, 2009.

SETTEMBRE, C.; ZONCU, R.; MEDINA, D. L. A lysosome-to-nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB. *The EMBO journal*, v. 31, n. 5, p. 1095–1108, 2012.

SETTEMBRE, C.; DI MALTA, C.; POLITO, V. A. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, v. 332, n. 6036, p. 1429–1433, 2011.

SHI, J.; CAO, J.; ZHOU, B. P. Twist-BRD4 complex: potential drug target for basal-like breast cancer. *Current Pharmaceutical Design*, v. 21, n. 10, p. 1256–1261, 2015.

SUZUKI, T.; INOKI, K. Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids sensing pathway. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, v. 43, n. 9, p. 671–679, 2011.

SCHWANHÄUSSER, B.; BUSSE, D.; LI, N. Corrigendum: Global quantification of mammalian gene expression control. *Nature*, v. 495, n. 7439, p. 126–127, 2013.

SHEN, J.; ZHOU, Y.; LU, T.; et al. An integrated chip for immunofluorescence and its application to analyze lysosomal storage disorders. *Lab on a Chip*, v. 12, n. 2, p. 317–324, 2012.

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

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, v. 241, n. 4861, p. 58–62, 1988.

SUGAWARA T., ITO Y., NISHIZAWA N., NAGASAWA T. Regulation of muscle protein degradation, not synthesis, by dietary leucine in rats fed a protein-deficient diet. *Amino Acids*.v.37,p.609-616, 2009

TAN, V. P.; MIYAMOTO, S. Nutrient-sensing mTORC1: Integration of metabolic and autophagic signals. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2016.

TANIDA, I.; YAMAJI, T.; UENO, T. Consideration about negative controls for LC3 and expression vectors for four colored fluorescent protein-LC3 negative controls. *Autophagy*, v. 4, n. 1, p. 131–134, 2008.

THUMM, M.; EGNER, R.; KOCH, B.; et al. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, v. 349, n. 2, p. 275–280, 1994.

TODD, L. R.; GOMATHINAYAGAM, R.; SANKAR, U. A novel Gfer-Drp1 link in preserving mitochondrial dynamics and function in pluripotent stem cells. *Autophagy*, v. 6, n. 6, p. 821–822, 2010.

- TSUKASA, S.; KEN, I. Spatial regulation of the mTORC1 system in amino acids pathway. *Acta Biochim Sin.* v.43, p.671-679, 2011.
- TAVASSOLI, M.; MINGUELL, J. J. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)*, v. 196, n. 4, p.367–373, 1991.
- UNGAR, D.; HUGHSON, F. M. SNARE protein structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 19, p. 493–517, 2003.
- WARR, M. R.; BINNEWIES, M.; FLACH, J. FOXO3A directs a protective autophagy program in haematopoietic stem cells. *Nature*, v. 494, n. 7437, p. 323–327, 2013.
- WEISSMAN, I. L.; SEITA, J.; Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine*, v. 2, n. 6, p. 640–653, 2010.
- WILSON, A.; TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews. Immunology*, v. 6, n. 2, p. 93–106, 2006.
- WILSON, A.; LAURENTI, E.; OSER, G. Hematopoietic Stem Cells Reversibly Switch from Dormancy to Self-Renewal during Homeostasis and Repair. *Cell*, v. 135, n. 6, p. 1118–1129, 2008.
- XAVIER, J. G.; FAVERO, M. E.; VINOLO, M. A. R.; 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. 651–660, 2007.
- WHO –World Health Organization. www.who.int/en, 2013
- YLÄ-ANTTILA, P.; VIHINEN, H.; JOKITALO, E.; ESKELINEN, E.-L. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, v. 5, n. 8, p. 1180–1185, 2009.
- YAMAZAKI, S.; EMA, H.; KARLSSON, G.; et al. Nonmyelinating Schwann Cells Maintain Hematopoietic Stem Cell Hibernation in the Bone Marrow Niche. *Cell*, v. 147, n. 5, p. 1146–1158, 2011.
- YUAN, H.-X.; RUSSELL, R. C.; GUAN, K.-L. Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy*, v. 9, n. 12, p. 1983–1995, 2013.
- ZHOU, Y.; RUCKER, E. B.; ZHOU, B. P. Autophagy regulation in the development and treatment of breast cancer. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, v. 48, n. 1, p. 60–74, 2016.
- ZHANG, J.; GRINDLEY, J. C.; YIN, T.; et al. PTEN maintains haematopoietic stem cells and acts in lineage choice and leukaemia prevention. *Nature*, v. 441, n. 7092, p. 518–522, 2006.

