

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

**Influência da L-glutamina sobre aspectos imunomodulatórios  
de células tronco mesenquimais medulares  
em situação de desnutrição proteico-energética**

**Guilherme Galvão dos Santos**

Tese para obtenção do grau de

**DOUTOR**

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo  
2015

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

**Influência da L-glutamina sobre aspectos imunomodulatórios  
de células tronco mesenquimais medulares  
em situação de desnutrição proteico-energética**

Versão original

**Guilherme Galvão dos Santos**

Tese para obtenção do grau de

**DOUTOR**

Orientador:

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo  
2015

# FICHA CATALOGRÁFICA

## Ficha Catalográfica

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

S237i	<p>Santos, Guilherme Galvão dos</p> <p>Influência da L-glutamina sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteico-energética / Guilherme Galvão dos Santos. -- São Paulo, 2015.</p> <p>164p.</p> <p>Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.</p> <p>Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio</p> <p>1. Desnutrição proteico-calórica : Medicina 2. Glutamina Células-tronco I. T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.</p> <p>616.399 CDD</p>
-------	--

Guilherme Galvão dos Santos

Influência da L-glutamina sobre aspectos imunomodulatórios  
de células tronco mesenquimais medulares  
em situação de desnutrição proteico-energética

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock  
Orientador/presidente

---

Prof. Dr. Heraldo Possolo de Souza

---

Prof. Dr. Fabio Bessa Lima

---

Prof. Dr. Fernando Luiz Affonso Fonseca

---

Prof. Dr. Edgar Julian Paredes Gamero

São Paulo, 24 de abril de 2015.

“A criação de algo novo é consumado pelo intelecto,  
mas despertado pelo instinto de uma necessidade pessoal.

A mente criativa age sobre algo que ela ama.”

*Carl Jung*

## DEDICATÓRIA

Aos meu pais

**Lúcia e Manuel**, por todo apoio e amor incondicionais.

**Ao Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock,**

orientador deste trabalho e exemplo de excelência em Ciência,  
meu inestimável agradecimento pela confiança, pelo profissionalismo,  
pelos ensinamentos e por ter contribuído à minha formação.

## AGRADECIMENTOS

À Diretoria da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP).

À Comissão de Pós-Graduação em Farmácia (CPG) da FCF-USP.

À Comissão Coordenadora do Programa (CCP) de Pós-Graduação em Análises Clínicas da FCF-USP.

À Secretaria do Departamento de Análises Clínicas da FCF-USP.

À Profa. Dra. Primavera Borelli, Departamento de Análises Clínicas FCF-USP, por seu exemplo de profissionalismo.

À Araceli Hastreiter, amiga e doutoranda do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pela parceria no laboratório, inestimável ajuda e valiosa contribuição ao longo desse trabalho.

À Maristela Tsujita, amiga e doutoranda do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pelas discussões científicas e pelo companheirismo no laboratório.

À Dra. Amanda Nogueira Pedro, pós-doutoranda do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, pelo importante apoio em uma das etapas do desenvolvimento desse trabalho.

Ao Edson Makiyama, técnico do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, e à Talita Sartori, mestranda do mesmo laboratório, pela amizade e suporte técnico fornecidos.

Aos companheiros de pós-graduação do Laboratório de Hematologia Experimental da FCF-USP, Andressa Antunes, Dalila Oliveira, Carolina Dias, Ed Wilson Santos, Graziela Batista e Jackeline Beltran.

Ao apoio financeiro da FAPESP, CAPES e CNPq sem o qual este trabalho não poderia ter sido executado.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela orientação de Iniciação Científica concedida ao início da minha formação.

Speciale dank aan Prof. Dr. Sue Gibbs, VU Medisch Centrum Amsterdam, die mij heeft begeleid als master student en als wetenschappelijk onderzoeker. Mijn grote dank gaat verder uit naar aan mijn collega's van de afdeling Dermatologie - VUMC Amsterdam, in het bijzonder Sander Spiekstra, Shakun Sampat, Melanie Breedveld,

Taco Waaijman, Judith Reinders, Kim Kroeze, Krista Ouwehand, Lenie van den Broek en Chantal Blok.

Aan Maarten Wijdenes, voor de voortdurende vertrouwen en steun.

Ao Rodrigo Vareschi, pelo apoio incondicional.

À minha família de coração, formada pelos amigos Marcio Caparica, Sergio Cardoso, Wagner Ribeiro, James Cimino, Daniela Kanemoto, Mariya Mouline, Iveta Petrova, Roen Kievik e João Victor Franco. Quem tem amigos, tem tudo.

## Resumo

DOS SANTOS, G.G. **Influência da L-glutamina sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteico-energética**. 2015. 160 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2015.

A desnutrição proteico-energética (DPE) altera a hemopoese e, portanto, a geração de células imunológicas, bem como compromete o sistema imune. Desta forma, indivíduos desnutridos apresentam maior susceptibilidade a infecções. As células tronco mesenquimais (CTMs) possuem propriedades imunomodulatórias e são importantes na formação do estroma medular que sustenta a hemopoese. Visto que a L-glutamina (GLUT) é o aminoácido condicionalmente essencial mais consumido por CTMs, e que também apresenta capacidade imunomoduladora, investigou-se, neste trabalho, se a GLUT exerceria efeito sobre aspectos imunomodulatórios das CTMs em um modelo experimental de DPE. Para tanto, utilizou-se camundongos da linhagem BALB/c, os quais receberam rações normoproteica ou hipoproteica isocalóricas contendo, respectivamente, 12% e 2% de proteína por um período de 5 semanas. Após o isolamento e a caracterização de CTMs provenientes dos grupos controle (CTMct) e desnutrido (CTMdesn), cultivou-se essas células em 0, 0,6, 2 e 10mM GLUT, a fim de determinar a influência deste aminoácido sobre a expressão de fatores de transcrição e produção de citocinas por CTMct e CTMdesn. Adicionalmente, avaliou-se o efeito dos sobrenadantes das culturas de CTMct e CTMdesn sobre a proliferação e produção de citocinas por macrófagos e linfócitos esplênicos. Os animais desnutridos apresentaram anemia, leucopenia, hipoplasia medular e diminuição na concentração de proteínas séricas, albumina e pré-albumina. A DPE não modificou a morfologia e o fenótipo das CTMs, bem como não alterou a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular. Por outro lado, a expressão de NF $\kappa$ B e STAT-3 e a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  por CTMs foram alteradas pela DPE e variaram de acordo com as concentrações de GLUT testadas. O aumento na concentração de GLUT diminuiu a expressão de NF $\kappa$ B e induziu a expressão de STAT-3 por CTMs obtidas de ambos os grupos. Quanto a produção de citocinas por essas células, observou-se uma diminuição nos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-6 e uma elevação nos níveis de IL-10 e TGF- $\beta$  com o aumento na concentração de GLUT. Variações na concentração desse aminoácido não alteraram a produção de IL-17 ou IFN- $\gamma$  por CTMct e CTMdesn. Ademais, a concentração de GLUT alterou, de forma diretamente proporcional, a taxa de proliferação das CTMs. Os meios condicionados de CTMct e CTMdesn diminuíram a proliferação de macrófagos e linfócitos esplênicos estimulados com LPS, induziram aumento na produção da citocina antiinflamatória IL-10 por ambos os tipos celulares e diminuíram a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos e IL-17 por linfócitos. Portanto, conclui-se que a GLUT possui efeito sobre a proliferação das CTMs, bem como a capacidade de imunomodular estas células.

**Palavras-chave:** Desnutrição proteico-energética; L-Glutamina; Célula tronco mesenquimal; Imunomodulação.

## Abstract

DOS SANTOS, G.G. **The influence of L-glutamine on immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells under protein-energy malnutrition.** 2015. 160 p. PhD Thesis – Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2015.

Protein-energy malnutrition (PEM) alters hemopoiesis and, therefore, the generation of immune cells, and compromises the immune system. In this way, malnourished individuals are more susceptible to infections. Mesenchymal stem cells (MSCs) have immunomodulatory properties and are important in the formation of bone marrow stroma that supports hemopoiesis. Since L-glutamine (GLUT) is a conditionally essential amino acid, which is most consumed by MSCs, and present immunomodulatory capacity, this work investigated whether GLUT would have an effect on immunomodulatory aspects of MSCs in a PEM experimental model. For this purpose, BALB/c mice were used, which received isocaloric normoproteic or hypoproteic diets, containing respectively, 12% and 2% of protein for a period of 5 weeks. After isolation and characterization of MSCs from control (MSCct) and malnourished (MSCmaln) groups, these cells were cultured with 0, 0.6, 2 and GLUT 10mM in order to determine the influence of this amino acid on the expression of transcription factors and cytokine production by MSCct and MSCmaln. Besides that, the effect of MSCct and MSCmaln culture supernatants on proliferation and cytokine production by macrophages and splenic lymphocytes was evaluated. Malnourished animals presented anemia, leucopenia, marrow hypoplasia and decreased concentration of serum proteins, albumin and prealbumin. PEM did not change morphology and phenotype of MSCs or altered the expression of cell cycle regulatory proteins. On the other hand, the expression of NF $\kappa$ B and STAT-3 and the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and TGF- $\beta$  by MSCs were modified by PEM and varied according to the tested GLUT concentrations. An increase in GLUT concentration decreased NF $\kappa$ B expression and induced STAT-3 expression by MSCs obtained from both groups. Regarding the production of cytokines by these cells, an increase in GLUT concentration resulted in decreased IL-1 $\beta$  and IL-6 levels and increased IL-10 and TGF- $\beta$  levels. Changes in the concentration of this aminoacid did not alter IL-17 or IFN- $\gamma$  production by MSCct and MSCmaln. Furthermore, the concentration of GLUT changed, in direct proportion, the proliferation of MSCs. The conditioned media MSCct and MSCmaln decreased the proliferation of macrophages and splenic lymphocytes stimulated with LPS, induced an increase in the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by both cell types, and decreased the production of proinflammatory cytokines IL-12 and TNF- $\alpha$  by macrophages and IL-17 by lymphocytes. Therefore, it can be concluded that GLUT has an effect on the proliferation of MSCs and it has the capacity to immunomodulate these cells.

**Key words:** Protein energy malnutrition, L-Glutamine, Mesenchymal stem cell, Immunomodulation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mecanismos de interação entre as CTMs e células das imunidades inata e adaptativa e seu efeito sobre o sistema imunológico.....	35
<b>Figura 2</b>	Análise histológica da MO.....	65
<b>Figura 3</b>	Fotomicrografias representativas das CTMs durante o cultivo celular.....	67
<b>Figura 4</b>	Fotomicrografias representativas dos testes de diferenciação <i>in vitro</i> das CTMs.....	70
<b>Figura 5</b>	Imunofenotipagem das CTMs.....	71
<b>Figura 6</b>	Histograma referente ao ciclo celular e apoptose de CTMct e CTMdesn.....	74
<b>Figura 7</b>	Expressão de CDC25a, CDC42 e CDK2 em CTMct e CTMdesn.....	75
<b>Figura 8</b>	Expressão de PCNA, p27 e c-Myc em CTMct e CTMdesn .....	76
<b>Figura 9</b>	Fotomicrografias representativas de CTMct cultivadas em diferentes concentrações de GLUT.....	78
<b>Figura 10</b>	Expressão e quantificação de NF $\kappa$ B total e fosforilado em CTMs .....	80
<b>Figura 11</b>	Expressão e quantificação de STAT-3 total e fosforilado em CTMs.....	82

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b>	Peso corporal dos animais no período de adaptação....	59
<b>Gráfico 2</b>	Consumo diário de ração e proteína ao longo do período de adaptação.....	60
<b>Gráfico 3</b>	Consumo diário de ração e proteínas durante o período de indução à desnutrição.....	61
<b>Gráfico 4</b>	Peso corpóreo absoluto e a sua variação ao longo do período de indução à desnutrição .....	62
<b>Gráfico 5</b>	Concentração sérica de proteínas totais, albumina e pré-albumina .....	63
<b>Gráfico 6</b>	Porcentagem estimada da confluência de CTMs.....	68
<b>Gráfico 7</b>	Contagem de CFU-F.....	69
<b>Gráfico 8</b>	Ciclo celular e apoptose de CTMs.....	73
<b>Gráfico 9</b>	Proliferação relativa de CTMs.....	79
<b>Gráfico 10</b>	Produção de IL-1 $\beta$ e IL-6 por CTMct e CTMdesn em diferentes concentrações de GLUT.....	84
<b>Gráfico 11</b>	Produção de IL-10 e TGF- $\beta$ por CTMct e CTMdesn em diferentes concentrações de GLUT.....	85
<b>Gráfico 12</b>	Produção de IL-17 e IFN- $\gamma$ por CTMct e CTMdesn em diferentes concentrações de GLUT.....	86
<b>Gráfico 13</b>	Proliferação de macrófagos Raw 264,7 com meio condicionado de CTMs.....	88
<b>Gráfico 14</b>	Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a produção de IL-10 por macrófagos Raw 264,7.....	90
<b>Gráfico 15</b>	Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a produção de IL-12 por macrófagos Raw 264,7.....	91
<b>Gráfico 16</b>	Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a produção de TNF- $\alpha$ por macrófagos Raw 264,7.....	92
<b>Gráfico 17</b>	Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a proliferação de linfócitos esplênicos.....	95
<b>Gráfico 18</b>	Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a produção de IL-10 por linfócitos esplênicos.....	97

<b>Gráfico 19</b>	Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a produção de IL-17 por linfócitos esplênicos.....	98
<b>Gráfico 20</b>	Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a produção de IFN- $\gamma$ por linfócitos esplênicos.....	99

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Composição das rações produzidas <i>in house</i> (normoproteica e hipoproteica) .....	43
<b>Tabela 2</b>	Composição da mistura salínica utilizada na produção das rações <i>in house</i> (normoproteica e hipoproteica) .....	44
<b>Tabela 3</b>	Composição da mistura vitamínica utilizada na produção das rações <i>in house</i> (normoproteica e hipoproteica) .....	45
<b>Tabela 4</b>	Hemograma.....	64
<b>Tabela 5</b>	Celularidade de MO e mielograma.....	66
<b>Tabela 6</b>	Valores comparativos da porcentagem da marcação imunofenotípica.....	72
<b>Tabela 7</b>	Valores comparativos da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular em CTMct e CTMdesn.....	77
<b>Tabela 8</b>	Valores comparativos da razão da expressão de NFkB total e fosforilado em CTMct e CTMdesn.....	81
<b>Tabela 9</b>	Valores comparativos da razão da expressão de STAT-3 total e fosforilado em CTMct e CTMdesn.....	83
<b>Tabela 10</b>	Produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$ por CTMct e CTMdesn em diferentes concentrações de GLUT.....	87
<b>Tabela 11</b>	Proliferação de macrófagos Raw 264,7 em meio condicionado de CTMs.....	89
<b>Tabela 12</b>	Produção de IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$ por macrófagos Raw 264,7 em meio condicionado de CTMs.....	93
<b>Tabela 13</b>	Proliferação de linfócitos esplênicos em meio condicionado de CTMs.....	96
<b>Tabela 14</b>	Produção de IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$ por linfócitos esplênicos em meio condicionado de CTMs.....	100

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AAND** *American Academy of Nutrition and Dietetics*

**AIN** *American Institute for Nutrition*

**AMPK** Proteína quinase ativada por AMP

**ASPEN** *American Society for Parenteral and Enteral Nutrition*

**C3** Componente do complemento 3

**C5** Componente do complemento 5

**CCL2** Proteína quimiotática de monócitos 1

**CCR2** Receptor da CCL2

**CCR4** Receptor da CCL2

**CD** Grupamento de diferenciação

**CDC42** Homólogo da proteína de controle de divisão celular 42

**CDK** Quinases dependentes de ciclina

**CFU-F** Unidades formadoras de colônias fibroblastóides

**CKI** Inibidores de quinases dependentes de ciclinas

**CO<sub>2</sub>** Gás carbônico

**CTH** Célula tronco hemopoética

**CTM** Célula tronco mesenquimal medular

**CTMct** Célula tronco mesenquimal medular obtida de animais controles

**CTMct 0mM GLUT** Meio condicionado de CTMct cultivadas em 0mM de GLUT

**CTMct 0,6mM GLUT** Meio condicionado de CTMct cultivadas em 0,6mM de GLUT

**CTMct 2mM GLUT** Meio condicionado de CTMct cultivadas em 2mM de GLUT

**CTMct 10mM GLUT** Meio condicionado de CTMct cultivadas em 10mM de GLUT

**CTMdesn** Célula tronco mesenquimal medular obtida de animais desnutridos

**CTMdesn 0mM GLUT** Meio condicionado de CTMdesn cultivadas em 0mM de GLUT

**CTMdesn 0,6mM GLUT** Meio condicionado de CTMdesn cultivadas em 0,6mM de GLUT

**CTMdesn 2mM GLUT** Meio condicionado de CTMdesn cultivadas em 2mM de GLUT

**CTMdesn 10mM GLUT** Meio condicionado de CTMdesn cultivadas em 10mM de GLUT

**CKI** Inibidores de quinases-dependentes de ciclina

**DC** Células dendríticas

**DMEM** Meio Dulbecco modificado

**DNA** Ácido desoxirribonucléico

**DNAM1** Molécula acessória DNAX-1

**DPE** Desnutrição proteico-energética

**DPM** Desvio padrão da média

**EDTA** Sal potássico do ácido etileno diaminotetracético

**EGF** Fator de crescimento epidermal

**ELISA** *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

**FABP4** Proteína ligante de ácidos graxos

**FAO** *Food and Agriculture Organization*

**GLUT** L-Glutamina

**H/E** Hematoxilina e eosina

**HGF** Fator de crescimento de hepatócitos

**HLA** Antígenos leucocitários humanos

**IC** Intervalo de confiança

**ICAM** Molécula de adesão intercelular

**IDO** Indoleamina 2,3-dioxigenase

**IFN- $\gamma$**  Interferon gama

**Ig** Imunoglobulina

**IkB $\alpha$**  *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha*

**IKK** Quinase I $\kappa$ B

**IL** Interleucina

**INK4** Proteínas inibidora da quinase-4

**iNOS** Óxido nítrico sintase

**IRAK** Quinase associada ao receptor de interleucina-1

**JAK** Janus quinases

**KIP** Proteínas inibidoras de quinases

**LBP** Proteína ligante do lipopolissacarídeo

**LPS** Lipopolissacarídeo

**M-CSF** Fator de crescimento de colônias macrofágicas

**MD2** Antígeno linfocítico 96

**MEM** Meio essencial mínimo

**MO** Medula óssea

**MTT** Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio

**MyD88** *Myeloid differentiation primary response gene 88*

**NaCl** Cloreto de sódio

**NaF** Fluoreto de sódio

**NF $\kappa$ B** Fator de transcrição nuclear kappa B

**NK** Células *natural killers*

**OMS** Organização Mundial da Saúde

**P1** Primeira passagem

**PAMP** Padrões moleculares associados a patógenos  
**PBS** Solução tampão fosfato salina  
**PCNA** Antígeno nuclear de células em proliferação  
**PGE<sub>2</sub>** Prostaglandina E<sub>2</sub>  
**PMSF** Fenilmetilsulfonil fluorido  
**p-NFκB** Fator de transcrição nuclear kappa B, porção fosforilada  
**p-STAT3** Sinal de transdução e ativação de transcrição-3, porção fosforilada  
**PVDF** Fluoreto polivinidileno  
**PVR** Receptor de poliovírus  
**pRb** Proteína do retinoblastoma  
**qsp** Quantidade suficiente para  
**RPMI** Meio *Roswell Park Memorial Institute*  
**SBF** Soro bovino fetal  
**SDS** Sódio dodecil sulfato  
**sHLA-G5** Antígeno solúvel de histocompatibilidade G5  
**STAT** Sinal de transdução e ativação de transcrição  
**TBST** PBS suplementado com 0,1% Tween 20  
**TGF-β** Fator de transformação do crescimento beta  
**T<sub>H</sub>** Linfócitos T auxiliares  
**TLR** Receptores do tipo *Toll*  
**TNF-α** Fator de necrose tumoral alfa  
**TNFR** Receptores do fator de necrose tumoral  
**TRAF-6** Fator associado ao receptor de TNF  
**TrisHCl** Tris hidroclorido  
**Treg** Linfócitos T reguladores  
**VCAM** Proteína celular de adesão vascular

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE GRÁFICOS.....	XIII
LISTA DE TABELAS .....	XV
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	XVI
1 INTRODUÇÃO .....	22
1.1 DESNUTRIÇÃO .....	22
1.2 HEMOPOESE, SISTEMA IMUNE E DESNUTRIÇÃO PROTEICO- ENERGÉTICA .....	26
1.2.1 Hemopoese e Desnutrição Proteico-Energética .....	26
1.2.2 Sistema Imune e Desnutrição Proteico-Energética.....	29
1.3 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E CAPACIDADE IMUNOMODULADORA .....	33
1.4 L-GLUTAMINA .....	38
2 OBJETIVOS .....	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
3.1 MATERIAIS .....	42
3.1.1 Animais.....	42
3.1.2 Rações .....	42
3.2 MÉTODOS .....	45
3.2.1 Adaptação dos animais .....	45
3.2.2 Indução à desnutrição .....	46
3.2.3 Obtenção de amostras sanguíneas e hemograma .....	46
3.2.4 Determinação das concentrações de proteínas totais, albumina e pré- albumina séricas.....	47
3.2.5 Obtenção de células da MO e realização de mielograma.....	47
3.2.6 Avaliação histopatológica medular .....	48
3.2.7 Isolamento e cultivo de CTMs .....	48
3.2.8 Contagem de CFU-F e análise da confluência celular de CTM .....	49
3.2.9 Identificação das CTMs .....	49
3.2.10 Ensaio para a avaliação do ciclo celular em CTMs por citometria de fluxo .....	51
3.2.11 Determinação da expressão de CDC25A, CDC42, CDK2, c-MYC, PCNA e	

P27 em CTMs por Western Blot.....	52
3.2.12 Ensaio de MTT para CTMs medulares cultivadas em diferentes concentrações de L-glutamina .....	53
3.2.13 Determinação da expressão de NF $\kappa$ B (total e fosforilado) e STAT-3 (total e fosforilado) por Western Blot.....	54
3.2.14 Avaliação do efeito da GLUT sobre a produção de citocinas por CTMs	55
3.2.15 Avaliação da proliferação de células mononucleares esplênicas e da sua produção de citocinas quando cultivadas na presença de sobrenadantes de CTMs .....	55
3.2.16 Avaliação da proliferação da linhagem de macrófagos Raw 264.7 e da sua produção de citocinas quando cultivadas na presença de sobrenadante de CTMs .....	56
3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	57
4 RESULTADOS .....	58
4.1 PERÍODO DE ADAPTAÇÃO .....	58
4.1.1 Avaliação da variação do peso corpóreo .....	58
4.1.2 Determinação dos consumos de ração e de proteínas .....	59
4.2 PERÍODO DE INDUÇÃO À DESNUTRIÇÃO .....	60
4.2.1 Determinação dos consumos de ração e de proteínas .....	61
4.2.2 Avaliação da variação de peso corpóreo .....	61
4.3 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA E PRÉ-ALBUMINA.....	63
4.4 PERFIL HEMATOLÓGICO.....	64
4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MO .....	65
4.6 CELULARIDADE DA MO E MIELOGRAMA .....	65
4.7 CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL MEDULAR	66
4.7.1 Morfologia das CTMs .....	66
4.7.2 Estimativa da porcentagem de confluência celular .....	67
4.7.3 Contagem de CFU-F .....	68
4.7.4 Potencial de diferenciação de CTMs.....	69
4.7.5 Imunofenotipagem das CTMs .....	70
4.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR E DA APOPTOSE DE CTMs .....	72
4.8.1 Influência da DPE sobre o ciclo celular e apoptose de CTMs.....	72
4.8.2 Influência da DPE sobre a expressão de proteínas relacionadas a	

progressão do ciclo celular em CTMs .....	74
4.9 A INFLUÊNCIA DA GLUT SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CTMs .....	77
4.10 A INFLUÊNCIA DA GLUT SOBRE A EXPRESSÃO DE NFκB E STAT-3 EM CTMs .....	79
4.10.1 Influência da GLUT sobre a expressão de NFκB total e fosforilado em CTMct e CTMdesn .....	79
4.10.2 Influência da GLUT sobre a expressão de STAT-3 total e fosforilado em CTMct e CTMdesn .....	81
4.11 INFLUÊNCIA DA GLUT SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS CTMs .....	83
4.12 INFLUÊNCIA DO MEIO CONDICIONADO DE CTMs SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264,7 E SUA PRODUÇÃO DE CITOCINAS .....	87
4.13 INFLUÊNCIA DO MEIO CONDICIONADO DE CTMs SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS E SUA PRODUÇÃO DE CITOCINAS .....	94
5 DISCUSSÃO .....	101
6 CONCLUSÕES .....	117
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	118
ANEXOS.....	150

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 DESNUTRIÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas, todo ser humano tem direito à saúde, à não sofrer de fome e à nutrição adequada (ACC/SCN, 2000). No entanto, a desnutrição ainda é um dos principais distúrbios alimentares no mundo (MONTEIRO et al., 2009).

Desnutrição refere-se a uma condição fisiológica anormal causada pelo consumo inadequado, desbalanceado ou excessivo de micronutrientes (vitaminas e minerais) e/ou macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos) cruciais para o desenvolvimento e manutenção da saúde do organismo (FAO, 2014). Assim, a desnutrição pode ser classificada em (a) subnutrição (usualmente denominada desnutrição), (b) deficiência de micronutrientes e (c) sobrepeso e obesidade (WHO, 2011; FAO, 2012).

Segundo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), a desnutrição (ou subnutrição) é um grave problema de saúde pública, pois atinge aproximadamente 805,3 milhões de pessoas, ou seja, 11,3% da população mundial. Indivíduos desnutridos encontram-se predominantemente em regiões em desenvolvimento: são 525,6 milhões na Ásia, 226,7 milhões na África, 37 milhões na América Latina e Caribe e 1,4 milhões na Oceania, contabilizando 790,7 milhões de pessoas. Ainda que exista uma tendência global de diminuição no número de indivíduos desnutridos, em algumas nações da África subsaariana, por exemplo, a desnutrição incide de forma alarmante em mais de 30% de seus habitantes. Em regiões desenvolvidas, a desnutrição acomete cerca de 14,6 milhões de pessoas (FAO, 2014).

No Brasil, as taxas de desnutrição diminuíram gradativamente ao longo dos últimos anos. A implementação de programas sociais que garantem a segurança alimentar da população contribuíram de forma significativa para essa redução. Hoje a desnutrição prevalece em menos de 5% da população do país (FAO, 2014). As regiões Norte e Nordeste concentram um maior número de indivíduos desnutridos em comparação às regiões Sul e Sudeste, portanto observa-se uma distribuição desigual dos índices de desnutrição entre as diferentes áreas do Brasil (MONTEIRO,

2003; LIMA et al., 2010). Apesar da desnutrição infantil estar em declínio no país, em 2010 ainda havia mais de 1 milhão de crianças com algum grau de comprometimento nutricional (IBGE, 2010).

Etiologicamente, a desnutrição está associada à fome, às dietas quanti ou qualitativamente inadequadas e à outras doenças que, por ventura, aumentam a necessidade do uso de nutrientes pelo organismo e/ou desequilibram a absorção, digestão e excreção dos mesmos (JENSEN et al., 2009; FAO, 2013; GAT-YABLONSKI et al., 2013). Dessa maneira, diversos tipos de desnutrição podem ser desencadeados (SAUNDERS e SMITH, 2010) e manifestados independentemente ou simultaneamente a diversas patologias (STINNETT, 1983).

A desnutrição desenvolve-se paulatinamente no organismo e altera a biodisponibilidade de nutrientes no sangue, induzindo modificações metabólicas adaptativas que visam a homeostase (MONTE, 2000). Sua instalação e gravidade dependem das causas, intensidade e duração da carência, e pode levar o indivíduo a óbito nos casos severos (BONANNI et al., 2011; WHO, 2011; CHEUNG et al., 2012).

Atualmente, o tipo de desnutrição que prevalece no âmbito mundial é a desnutrição proteico-energética (DPE) (KEUSCH, 2003), que é definida pela OMS como “um conjunto de condições patológicas provenientes da menor ingestão, em proporções variadas, de proteínas e calorias” (WHO, 2011).

O consumo de dietas com baixo valor proteico e calórico, associado ou não à ingestão insuficiente de lipídios, vitaminas e minerais, constitui a base do desequilíbrio metabólico que acomete o indivíduo na DPE (WATERLOW et al., 1996). A DPE altera o metabolismo proteico e induz um estado catabólico, no qual o balanço nitrogenado é negativo, o que compromete a capacidade de síntese e distribuição de proteínas no organismo (POWANDA e BEISEL, 2003; MITHAL et al., 2013). A DPE também modifica o metabolismo de carboidratos, o que pode gerar hipoglicemia, alteração nas concentrações séricas de insulina e glucagon, bem como aumento da gliconeogênese (NUTTALL et al., 2008; JIA et al., 2012). Visto que as proteínas constituem o principal componente estrutural celular e os carboidratos são utilizados como fonte primária de energia, caso o suprimento dessas moléculas seja persistentemente menor que o adequado, o metabolismo

perde a sua capacidade adaptativa e todos os tecidos, órgãos e sistemas tornam-se propensos à falência (IMNA, 2005; WAITZBERG, 2006).

Ademais, a DPE pode provocar efeitos psicossociais deletérios, como depressão e ansiedade (SAUNDERS e SMITH, 2010), ocasionar retardo no crescimento e no desenvolvimento (MONTEIRO et al., 2009) e diminuir a função cognitiva do indivíduo (WHO, 2011).

Os grupos mais susceptíveis à DPE são recém-nascidos, crianças (SAWAYA, 2006), idosos (SACKS et al., 2000), indivíduos com distúrbios alimentares e/ou sob dietas radicais (MARCOS, 2000; NOVA et al., 2002) ou ainda pacientes hospitalizados, portadores de neoplasias e/ou doenças crônicas (WAITZBERG et al., 1999; BRUNDTLAND, 2000; AKNER e CEDERHOLM, 2001).

A DPE atinge com frequência lactentes e crianças em regiões em desenvolvimento (BAIN et al., 2013; BHUTTA et al., 2013) e é responsável por 45% das mortes infantis contabilizando 3,1 milhões de vítimas (JONES et al., 2014).

No âmbito hospitalar, a DPE pode ocorrer em 20% a 80% dos pacientes, sendo que até 70% dos pacientes inicialmente desnutridos sofrem uma piora gradual em seu estado nutricional durante a hospitalização, afetando a sua condição geral e a resposta ao tratamento (WAITZBERG, 2006; CORREIA et al., 2014). Dessa forma, o monitoramento do estado nutricional do paciente é essencial para definir estratégias dietéticas que possam atuar de forma sinérgica ao tratamento da doença original, garantindo assim o aporte de nutrientes necessário para o restabelecimento da saúde do indivíduo (HAMILTON e BOYCE, 2013; MALONE e HAMILTON, 2013).

A DPE é capaz de comprometer a homeostase do organismo e gerar efeitos adversos que podem ser clinicamente diagnosticados (LEAN, 2010; SAUNDERS et al., 2011). Suas manifestações clínicas variam de acordo com a gravidade da deficiência proteico-energética, com a idade do paciente e com sua possível associação à outras doenças.

Dentre as formas clínicas mais graves de desnutrição destacam-se a *Marasmus* e a *Kwashiorkor*, que podem ocorrer de forma isolada ou combinada (síndrome Kwashiorkor-marasmática). *Marasmus*, a mais comum, advém da severa restrição da ingestão de proteínas e carboidratos, sendo caracterizada pela depleção de tecido adiposo subcutâneo, perda de massa muscular e ausência de

edema (BHAN et al., 2003; GROVER e EE, 2009). *Kwashiorkor* resulta da ingestão de uma dieta com baixo valor proteico, ainda que adequada em termos calóricos, gerando uma leve perda de peso corpóreo, edema generalizado, dermatoses, abdômen distendido e hepatomegalia, frequentemente se manifestando associada à processos infecciosos (KRAWINKEL, 2003; GROVER e EE, 2009). Quadros intermediários de DPE aparecem devido à combinação de vários graus de privação proteica, com diversos níveis de deficiência calórica total (DE ANGELIS, 1986; BARON, 1997).

Até recentemente, não havia consonância na literatura quanto ao conjunto exato de alterações clínicas que possibilitaria um diagnóstico assertivo de desnutrição, pois seus sintomas podem ser comuns a outras patologias (SOETERS et al., 2008; MEIJERS et al., 2010). Isto posto, em 2012, a *American Academy of Nutrition and Dietetics* (AAND) e a *American Society for Parenteral and Enteral Nutrition* (ASPEN) publicaram, em conjunto, um consenso (WHITE et al., 2012) no qual determinou-se que, para o diagnóstico de desnutrição, pelo menos dois dos seis sintomas clínicos a seguir devem ser observados: ingestão insuficiente de nutrientes, perda involuntária de peso, perda de massa muscular, perda de gordura subcutânea, edema e caquexia (ROSENBAUM et al., 2000; GADDUCCI et al., 2001; BANKHEAD et al., 2009; JENSEN et al., 2009; NORMAN et al., 2011; SKIPPER et al., 2012).

Além da observação dos sintomas clínicos, a avaliação antropométrica do estado nutricional do paciente é de extrema importância, pois permite a identificação de manifestações de desnutrição aguda, crônica ou total (aguda e crônica) através, respectivamente, dos índices peso-para-altura (P/A), altura-para-idade (A/I) e peso-para-idade (P/I) (DUGGAN, 2010). Dentre esses parâmetros, destaca-se o índice P/I, devido à sua capacidade de monitorar quadros de desnutrição aguda e crônica de forma simultânea (PARK et al., 2012). Segundo a OMS, indivíduos que apresentam índices P/A, A/I ou P/I menores que dois desvios-padrão da média, comparado ao respectivo valor de referência, podem ser considerados desnutridos (WHO, 2011; HECHT et al., 2015).

## 1.2 HEMOPOESE, SISTEMA IMUNE E DESNUTRIÇÃO PROTEICO-ENERGÉTICA

Órgãos linfo-hemopoéticos, como medula óssea (MO), timo, baço e linfonodos, são constituídos por tecidos que possuem altas taxas metabólicas e que, portanto, necessitam de um elevado aporte de nutrientes para o seu funcionamento adequado (BORELLI et al., 2009). Conseqüentemente, a DPE pode gerar alterações histo-funcionais nesses tecidos e levar esses órgãos à falência, comprometendo assim, a hemopoese, a resposta inflamatória e o sistema imune (XAVIER et al., 2007; FOCK, BLATT, et al., 2010).

### 1.2.1 Hemopoese e Desnutrição Proteico-Energética

A hemopoese é um processo dinâmico no qual células tronco hemopoéticas (CTH) pluripotentes proliferam, diferenciam e se comprometem para as linhagens mielóide ou linfóide, originando os diferentes tipos celulares que compõem o sistema sanguíneo (NAKAJIMA, 2010). As células sanguíneas exercem diversas funções essenciais à sobrevivência do organismo, como transporte de oxigênio, regulação da homeostase sanguínea e controle das imunidades inata e adaptativa (DEXTER, 1991).

Em seres humanos, após o nascimento a hemopoese ocorre exclusivamente no tecido hemopoético da MO (FERNANDEZ e DE ALARCON, 2013). Este tecido é altamente adaptável, pois apresenta a habilidade de alterar sua função em resposta a estímulos externos (MAYANI et al., 1992), como a falta de nutrientes. Dessa forma, a manutenção da sua homeostasia e da sua plasticidade é fundamental para o estabelecimento de um *pool* de células sanguíneas adequado ao estado fisiológico normal ou patológico do organismo (LORD e DEXTER, 1995; VERFAILLIE, 2005).

A produção de células sanguíneas em um padrão constante depende do microambiente medular (LORD e DEXTER, 1995; VERFAILLIE, 2005), descrito pela primeira vez na década de 70 por Schofield, como “regiões histo-anatômicas altamente organizadas e dinâmicas que modulam a auto-renovação, proliferação e diferenciação das CTHs” (SCHOFIELD, 1978).

Publicações posteriores à de Schofield (SCHOFIELD, 1978) mostram que o microambiente medular fornece o parênquima de sustentação para as CTHs (MAYANI et al., 1992; MENDEZ-FERRER et al., 2015), sendo responsável pela regulação do desenvolvimento dessas células em todos os seus níveis de diferenciação e por sua liberação da MO para o sangue periférico (VITURI et al., 2000). O balanço entre auto renovação e diferenciação das CTHs é considerado crítico para o estabelecimento de um reservatório celular pluripotente constante na MO, fundamental para a hemopoese (MOSAAD, 2014).

A localização anatômica do microambiente medular onde as CTHs residem é denominada de nicho hemopoético (SCHOFIELD, 1978). As CTHs estão distribuídas em grandes quantidades na interface entre a MO e os ossos trabeculares (ZHANG et al., 2003), chamada de endósteo, e próximas ao endotélio vascular dos sinus medulares, denominada de região perivascular (FUCHS et al., 2004; KIEL et al., 2007). Desta maneira, surgiram os conceitos dos nichos hemopoéticos endosteal (ZHANG et al., 2003; LI e XIE, 2005) e perivascular (KIEL et al., 2005). Enquanto o nicho endosteal abriga CTHs quiescentes, reguladas por osteoblastos e por células tronco mesenquimais (CTMs) (TAICHMAN e EMERSON, 1994; STIER et al., 2005; ARAI e SUDA, 2007; MENDEZ-FERRER et al., 2010), o nicho perivascular aloja CTHs em proliferação, resultado da produção de proteínas reguladoras por células endoteliais e CTMs (HOOPER et al., 2009; BUTLER et al., 2010; MENDEZ-FERRER et al., 2010; RENSTROM et al., 2010; LEVESQUE e WINKLER, 2011; KUNISAKI et al., 2013).

O microambiente medular é composto pelo compartimento estromal, primordial na tradução de sinais extra-medulares para as CTHs por ser altamente adaptável à estímulos externos (MULLER-SIEBURG e DERYUGINA, 1995), e por células hemopoéticas (DEANS e MOSELEY, 2000). Observou-se, no nosso modelo *in vitro*, alterações no estroma medular de animais desnutridos com consequente comprometimento da hemopoese (BORELLI et al., 2007).

A hemopoese é regulada pela produção e secreção local de citocinas, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular por células estromais, co-localização dessas moléculas para as CTHs nos locais de contato CTH - célula estromal e/ou - matriz extracelular ou ainda, por estímulo direto pelo contato celular (DEXTER, 1991; WADHWA e THORPE, 2008; RATAJCZAK et al., 2010).

A sinalização entre os compartimentos estromal e hemopoético resulta na formação de um ambiente bioquímico ideal para a proliferação, diferenciação e maturação das CTHs, fundamental para a sustentação da hemopoese (JANOWSKA-WIECZOREK et al., 2000; RATAJCZAK et al., 2010).

As interações celulares existentes entre os compartimentos estromal e hemopoético são importantes na manutenção da capacidade proliferativa das CTHs, pois relacionam-se com a progressão adequada do seu ciclo celular ao longo das fases G1-S-G2-M. O ciclo celular é controlado por ciclinas, CDK (quinases dependentes de ciclina) e CKI (inibidores de quinases dependentes de ciclina) (FROLOV e DYSON, 2004; SATYANARAYANA e KALDIS, 2009). Outras proteínas, como CDC42 (homólogo da proteína de controle da divisão celular 42), c-Myc, PCNA (antígeno nuclear de células em proliferação) e p27 (inibidor 1B de quinase dependente de ciclina) possuem papel adjuvante nesse processo (EZOE et al., 2004; SATOH et al., 2004; ASPENSTROM et al., 2007; LIEBERMANN e HOFFMAN, 2007).

Estímulos extracelulares induzem a expressão da ciclina D1 com consequente formação do complexo D1/CDK4,6, responsável pela fosforilação de repressores transcricionais do tipo retinoblastoma (pRb, p107 e p130) que mantêm a expressão do gene E2F reprimida. A fosforilação desses repressores promove a síntese da ciclina E e do complexo ciclina E/Cdk2, contribuindo na inativação da inibição de E2F dependente de pRb, o que resulta na transição G1-S do ciclo celular. Além disso, a fosforilação do complexo de ciclina B/CDK1 ativa CDC25, responsável pelo controle das transições do ciclo celular de G1-S e G2-M. Concomitantemente, proteínas pertencentes à família das CDK, como as INK4 (proteínas inibidora da quinase 4) p15, p16 e p19, e sua interação com KIP (proteínas inibidoras de quinases) p21 e p27 inibem a ativação de complexos ciclinas-CDK regulando a progressão do ciclo celular (PERUCCA et al., 2009; ZOU et al., 2011).

As CTHs obtidas de animais desnutridos apresentam redução na expressão de proteínas que induzem ciclo celular, como ciclina D1, ciclina E, pRb, PCNA, CDC25a, CDK2 e CDK4, bem como um aumento na expressão de proteínas inibidoras (p21 e p27), sem diferença significativa na expressão de p53. Esse fato ocorre pela diminuição na expressão da ciclina D1 e aumento na expressão de p21/p27, indicando um comprometimento na proliferação celular resultante de

alterações nas interações entre os compartimentos estromal e hemopoético, causadas por modificações no microambiente medular desencadeadas pela DPE (NAKAJIMA et al., 2014).

Nosso grupo tem demonstrado que a DPE provoca mudanças no perfil proliferativo das CTHs (NAKAJIMA et al., 2014) e prejudica a produção de precursores mielóides e linfóides, afetando a granulopoese (BORELLI et al., 2009), contribuindo para quadros de neutropenia (RUST et al., 2000), leucopenia e linfocitopenia (FOCK, BLATT, et al., 2010). Estas alterações hematológicas quantitativas podem ser observadas clinicamente durante períodos de carência nutricional e sugerem um estado de falência dos órgãos linfo-hemopoéticos (DE ANGELIS, 1986; ALVES, 1995; LEE e HERBERT, 1999). Desse modo, o sistema imunológico pode ser comprometido.

### 1.2.2 Sistema Imune e Desnutrição Proteico-Energética

A imunidade protetora contra estímulos prejudiciais ao organismo, como patógenos e moléculas, toxinas e células nocivas, é mediada pelas reações iniciais da imunidade inata e pelas respostas posteriores da imunidade adaptativa (COICO e SUNSHINE, 2009).

A DPE está frequentemente associada à imunodeficiência, pois altera diversos aspectos das imunidades inata e adaptativa (CHANDRA, 1997; MARCOS, 2000), desde a ontogenia de suas células até a capacidade efetora das mesmas quando já diferenciadas e maduras (CHANDRA, 2003; ORTIZ et al., 2009; FOCK, ROGERO, et al., 2010; HICKMAN et al., 2014).

Em razão disso, indivíduos desnutridos são mais susceptíveis à infecções oportunistas em relação aos que consomem uma dieta balanceada (CHANDRA, 1999; CALDER, 2013). A associação desnutrição-infecção é responsável pelos altos índices de morbidade e mortalidade, visto que agrava o estado de saúde do paciente desnutrido (TAYLOR et al., 2013).

A primeira linha de defesa do organismo contra elementos nocivos envolve a participação de fagócitos (macrófagos, monócitos e granulócitos

polimorfonucleares), células dendríticas (DC) e células *natural killers* (NK), bem como proteínas presentes no sangue, como as do sistema complemento, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e imunoglobulinas (ABBAS et al., 2013).

Citocinas são sintetizadas e secretadas por inúmeros tipos celulares e atuam de maneira autócrina ou parácrina em células que apresentam receptores específicos na superfície de sua membrana (OPAL e ESMON, 2003). Sua ação dá-se de forma sinérgica ou antagônica a outras citocinas, portanto constituem um importante mecanismo regulatório das respostas inflamatória e imune (DELVES et al., 2011). O efeito resultante da combinação da ação de diversas citocinas sobre a célula-alvo pode induzir sua ativação, proliferação, maturação, sobrevivência ou morte (ABBAS et al., 2013). Não há um consenso na literatura quanto a produção de citocinas em condições de desnutrição. Esse fato deve-se, principalmente, ao período, causa e gravidade do quadro de carência nutricional, bem como aos diferentes tipos celulares e modelos experimentais utilizados em diversos estudos.

Padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns* - PAMPs) são estruturas produzidas por microrganismos e reconhecidas por receptores do tipo *Toll* (TLR) (VANDEWALLE, 2008). O lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina presente na membrana de bactérias Gram-negativas, induz o sistema imune inato a produzir respostas não-específicas através do seu reconhecimento via TLR4 (LIU et al., 2004). Hepatócitos produzem a proteína ligante do lipopolissacarídeo (LBP), que é liberada na corrente sanguínea e possui alta afinidade pelo LPS, formando o complexo LPS-LBP (SCHUMANN et al., 1990). Este complexo liga-se à molécula co-estimulatória CD14, presente na superfície de células-alvo, e à molécula acessória MD-2 (antígeno linfocítico 96) (FOCK et al., 2007). Na sequência, ocorre o recrutamento de MyD88 (*Myeloid differentiation primary response gene 88*), que associa-se à IRAK (quinase associada ao receptor de IL-1) que, após sua fosforilação, liga-se à TRAF-6 (fator associado ao receptor de TNF), o que resulta na ativação de MAP quinases ativadoras de IKK (quinase I $\kappa$ B) 1 e IKK2 (PERKINS, 2007). Enquanto inativo, o NF $\kappa$ B presente no citoplasma encontra-se complexado com sua proteína inibidora I $\kappa$ B $\alpha$ . Porém, IKKs ativas fosforilam I $\kappa$ B $\alpha$ , que é degradada nos proteossomos, dissociando o NF $\kappa$ B do seu inibidor tornando-o ativo. O NF $\kappa$ B ativo transloca-se para o núcleo, onde regula a

expressão de genes essenciais para o processo inflamatório, para a produção de citocinas e para a regulação do ciclo celular (COURTOIS e GILMORE, 2006).

Ainda que seus mecanismos moleculares intracelulares sejam distintos, LPS e ligantes da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) e de IL (interleucina) -1 resultam na ativação da via do NF $\kappa$ B (JOBIN et al., 1999). Assim, há indução da produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- $\alpha$ , consideradas mediadores pró-inflamatórios celulares que controlam a infecção através da liberação de mediadores secundários, da indução da quimiotaxia e da ativação, sobrevivência, proliferação, maturação e/ou morte de células imunológicas (BEUTLER, 2003; GRIVENNIKOV et al., 2009; DA SILVA LIMA et al., 2013).

Dados do nosso grupo demonstram que a DPE diminui a expressão de moléculas envolvidas na via de sinalização do NF $\kappa$ B, como TLR4, CD14 e TRAF-6, em macrófagos previamente estimulados com LPS (FOCK et al., 2007). Além disso, macrófagos obtidos de animais desnutridos apresentam uma redução na expressão do receptor TNFR1 e na fosforilação do NF $\kappa$ B, resultando na diminuição dos níveis de IL-1 $\beta$  e IL-12 (DE OLIVEIRA et al., 2014). Dessa forma, a imunodeficiência observada em animais desnutridos pode ser causada pela alteração de expressão de receptores e proteínas associadas à via do NF $\kappa$ B, bem como pelo comprometimento de seus produtos proteicos.

A ativação de receptores de citocinas dos tipos I e II por citocinas e fatores de crescimento induz a via de sinalização composta por tirosinas quinases citoplasmáticas, denominadas de Janus quinases (JAKs), que fosforilam e ativam sinais de transdução e ativação de transcrição (STATs). A família STAT é composta por sete membros (STAT-1, STAT-2, STAT-3, STAT-4, STAT-5a, STAT-5b e STAT-6). Uma vez ativadas, as STATs migram para o núcleo e estimulam a transcrição gênica ao se ligarem a promotores específicos, resultando na produção de diversas citocinas (VILLARINO et al., 2015).

A STAT-3, assim como a STAT-1, é um fator de transcrição essencial nas respostas imune e inflamatória (ZHONG et al., 1994). A ativação de STAT-3 por IL-5, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , EGF (fator de crescimento epidermal), HGF (fator de crescimento de hepatócitos) e leptina em linfócitos promove a sua diferenciação em células T auxiliaadoras (T<sub>H</sub>) produtoras de IL-17 (T<sub>H</sub>17) (JARNICKI et al., 2010; CAMPOREALE

e POLI, 2012). Por sua vez, a IL-17 auxilia no combate a patógenos, pois eleva a produção de quimiocinas que induzem o recrutamento de monócitos e macrófagos para o sítio da inflamação (NAKAYAMADA et al., 2012).

Nosso grupo evidenciou que camundongos desnutridos inoculados com LPS apresentam nível circulatório da citocina antiinflamatória IL-10 elevado em comparação aos seus controles (FOCK et al., 2008). A DPE também aumenta a produção de IL-10 e a expressão de STAT-3 por linfócitos previamente estimulados com LPS (MELLO et al., 2014). Além disso, a DPE diminui a expressão de L-selectina, P-selectina e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1), alterando a capacidade de migração de leucócitos para os sítios de inflamação (LANDGRAF et al., 2007). As concentrações e atividade de moléculas do sistema complemento, como C3, C5 e fator B, encontram-se reduzidas em desnutridos, o que reduz a opsonização de patógenos e aumenta a probabilidade de infecções oportunistas (CHANDRA, 1983). A DPE modifica a resposta humoral quanto aos níveis de secreção de anticorpos e a afinidade dos mesmos (WOODWARD et al., 1992). Portanto, a DPE é capaz de alterar diversos aspectos da resposta inflamatória e imune, resultando em imunodeficiência.

A capacidade efetora de linfócitos antígeno-específicos é regulada por células apresentadoras de antígenos, com destaque para as células dendríticas e macrófagos (BOUSSO, 2008). De acordo com a literatura, a DPE induz queda no número de células dendríticas no baço, diminui a sua capacidade de ativar linfócitos T e reduz a produção de IL-12 e IFN- $\gamma$  por essas células, comprometendo sua função (NIIYA et al., 2007). A DPE também altera a função dos macrófagos, pois diminui sua produção de citocinas pró-inflamatórias, altera o *burst* respiratório e induz apoptose dessas células, levando a um estado de imunodeficiência (MCCARTER et al., 1998; RIVADENEIRA et al., 2001).

Foi evidenciado pelo nosso grupo que a DPE prejudica a linfoproliferação e diminui a quantidade de linfócitos no timo, baço e em regiões timo-dependentes dos linfonodos (FOCK, BLATT, et al., 2010; NAKAJIMA et al., 2014). A depleção dessas células é decorrente da diminuição da população de progenitores linfóides e de alterações nos processos de proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (SAVINO, 2002; NAJERA et al., 2004; FOCK, BLATT, et al., 2010; NAKAJIMA et al.,

2014). Estes progenitores apresentaram falência para expansão quando cultivados na presença de citocinas hemopoéticas (FOCK, BLATT, et al., 2010).

A DPE reduz a captação de glicose por linfócitos e modifica a produção de citocinas por essas células, podendo afetar o metabolismo e a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e aumentar a secreção de IL-4 e IL-10 por essas células, o que denota uma alteração no balanço T<sub>H</sub>1 / T<sub>H</sub>2 resultante da DPE (RODRIGUEZ et al., 2005; MACIVER et al., 2008; SAUCILLO et al., 2014).

Em resumo, a falência de tecidos e órgãos decorrente da DPE modifica a produção de células que orquestram a resposta imune e altera as respostas específicas e não-específicas do organismo de diversas formas (NOVA et al., 2002), comprometendo o sistema imune do indivíduo desnutrido e aumentando a sua susceptibilidade à infecções (CHISTI et al., 2013; HICKMAN et al., 2014; PAPIER et al., 2014).

### 1.3 CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL E CAPACIDADE IMUNOMODULADORA

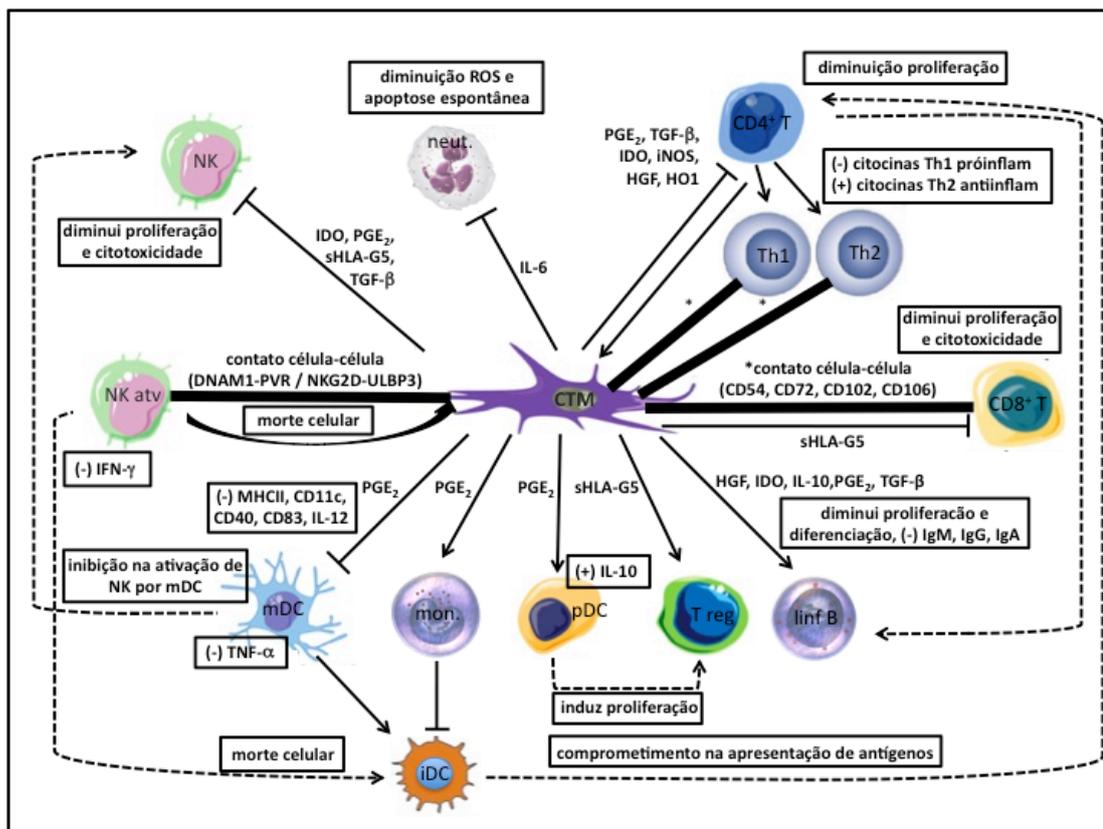
A primeira evidência concreta de que a MO contém células precursoras não-hemopoéticas provém de estudos realizados por Friedenstein (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Posteriormente, estudos evidenciaram que essas células estromais mesenquimais multipotentes, chamadas atualmente de células tronco mesenquimais, têm a capacidade de se diferenciar em tipos celulares mesodérmicos, como osteócitos, condrócitos, adipócitos, miócitos e células endoteliais (BARRY e MURPHY, 2004; WATABE e MIYAZONO, 2009; KURODA et al., 2010). Recentemente, foi demonstrado que estas células podem se transdiferenciar e adotar perfis de expressão e fenótipos funcionais de células neuroectodérmicas, endodérmicas e mesodérmicas viscerais (EGEA et al., 2011).

CTMs são células clonogênicas encontradas ao longo da MO que apresentam morfologia fusiforme e fibroblastóide e são capazes de se diferenciar em tipos celulares constituintes do estroma medular, sendo portanto, um importante componente do microambiente hemopoético (HOCKING e GIBRAN, 2010). Apesar dessas células representarem uma pequena fração – de 0,001 a 0,01% – da população celular nucleada total da MO, elas podem ser isoladas e expandidas *in*

*vitro* com alta eficiência, em meio contendo baixa concentração de glicose, pois apresenta aderência seletiva a superfícies plásticas em comparação às CTHs (PITTENGER et al., 1999; BARRY e MURPHY, 2004). Durante seu cultivo *in vitro*, as CTMs tendem a formar colônias chamadas de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F) (ABDALLAH e KASSEM, 2008).

Em relação à sua caracterização fenotípica, CTMs oriundas de murinos apresentam-se negativas para os marcadores hemopoéticos CD14, CD34 e CD45 e positivas para CD44, CD73, CD90 e CD105 (BARRY e MURPHY, 2004; KASSEM e ABDALLAH, 2008). Em razão da falta de especificidade desses marcadores, outros marcadores de superfície, como CD29, CD49e, CD106, CD271 e Sca-1, são utilizados de forma complementar para identificar fenotipicamente as CTMs com maior assertividade (BARRY e MURPHY, 2004; MORIKAWA et al., 2009; KUCI et al., 2010).

Além de originar o estroma medular, regular o nicho hemopoético e influenciar a função de células presentes no microambiente (BIANCO et al., 2010), as CTMs modulam a atividade de células do sistema imune e a produção de fatores solúveis, como citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e angiopoietinas (**Figura 1**) (DA SILVA MEIRELLES et al., 2008; SHI et al., 2010; BAIGUERA et al., 2012). Adicionalmente, por expressarem moléculas de adesão como ICAM-1, ICAM-2 e VCAM, as CTMs podem modular o sistema imune através do contato célula-célula, representado pelas linhas espessas da **Figura 1** (TSE et al., 2003; ZHANG et al., 2004; NAUTA et al., 2006).



**Figura 1.** Mecanismos de interação entre as CTMs e células das imunidades inata e adaptativa e seus efeitos sobre o sistema imunológico. As CTMs atuam sobre células imunológicas através do contato célula-célula e/ou pela secreção de citocinas, representados, respectivamente, pelas barras espessas e finas da figura. As CTMs podem inibir a proliferação de células NK e o seu potencial citotóxico através da secreção dos fatores solúveis PGE<sub>2</sub>, IDO, TGF-β e sHLA-G5. As células NK são capazes de induzir a morte de CTMs pelo contato célula-célula dependente da ligação entre moléculas de superfície (NKG2D-ULBP3 / DNAM1-PVR) expressas por ambas as células. As CTMs podem inibir, através da secreção de PGE<sub>2</sub>, a diferenciação de monócitos em DC, prejudicar a manutenção da maturação de DC, diminuir a produção de TNF-α por essas células e aumentar a produção de IL-10 por DC plasmocitóides. As DC imaturas são susceptíveis ao ataque de células NK ativas. A indução de um fenótipo imaturo em DC por CTMs afeta a capacidade das DC maduras em ativar células NK e compromete a apresentação de antígenos aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, prejudicando sua expansão clonal e produção de citocinas. Além disso, a produção de IL-10 por DC plasmocitóides e a secreção de sHLA-G5 por CTMs induzem a proliferação de linfócitos T reguladores. As CTMs inibem a ativação de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, através da secreção de PGE<sub>2</sub>, IDO, TGF-β, iNOS e HGF. Como consequência, a proliferação de linfócitos B e a sua produção de imunoglobulinas podem ser comprometidas. A capacidade efetora de linfócitos B também pode ser diretamente prejudicada através da produção de HGF, IDO, IL-10, PGE<sub>2</sub> e TGF-β pelas CTMs. As CTMs inibem a proliferação e o potencial citotóxico de linfócitos T CD8<sup>+</sup> pela secreção de sHLA-G5 e pelo contato célula-célula. Através da produção de IL-6, as CTMs diminuem a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos e retardam a apoptose espontânea dessas células. \* Moléculas de adesão ainda não identificadas.

A plasticidade imunológica das CTMs relaciona-se diretamente com o tipo de estímulo inflamatório proveniente do microambiente onde se encontram (WANG et al., 2012). Por exemplo, essas células adquirem caráter imunossupressor somente na presença de citocinas como IFN- $\gamma$  ou TNF- $\alpha$  (DAZZI et al., 2012).

As CTMs possuem a capacidade de modular a função de células do sistema imune inato, como DC e NK. As CTMs inibem a diferenciação e maturação de DC através da secreção de IL-6, M-CSF (fator de crescimento de colônias macrofágicas) e PGE<sub>2</sub> (prostaglandina E<sub>2</sub>), diminuindo a expressão de moléculas co-estimulatórias e alterando o perfil de produção de citocinas por DC (ZHANG et al., 2004; NAUTA et al., 2006; PREVOSTO et al., 2007; CHEN et al., 2008). As CTMs podem inibir a proliferação e a sobrevivência das células NK pela produção deIDO, s-HLAG5, TGF- $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, e também através de suas propriedades citotóxicas exercidas pelo contato célula-célula (CTM-NK) (SPAGGIARI et al., 2006).

Além de regular a função de células da imunidade inata, as CTMs atuam sobre células da imunidade adaptativa. As CTMs inibem a proliferação e produção de citocinas por células T CD4<sup>+</sup> ativadas e por células T de memória, coibindo a formação de células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas, diminuindo os níveis de citocinas T<sub>H</sub>1 pró-inflamatórias, aumentando a secreção de citocinas T<sub>H</sub>2 anti-inflamatórias e induzindo a produção de células Treg através da secreção de IL-10, HGF, TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, IDO, iNOS, HO1, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (BEYTH et al., 2005; GLENNIE et al., 2005; KLYUSHNENKOVA et al., 2005; BATTEN et al., 2006; BENVENUTO et al., 2007).

Ademais, as CTMs podem exercer efeitos inibitórios em células B, comprometendo o ciclo celular dessas células nas fases G0/G1, ou estimulantes, induzindo a sua diferenciação e livrando-as do processo de apoptose natural que ocorre durante a ontogenia desses linfócitos (CORCIONE et al., 2006; TABERA et al., 2008; CAPLAN, 2009).

As CTMs apresentam uma subpopulação produtora de IL-17 que atua de forma autócrina e ativa a via de sinalização do NF $\kappa$ B, inibindo a produção de TGF- $\beta$  por essas células e comprometendo, dessa forma, sua característica imunossupressora (KRSTIC et al., 2012; YANG et al., 2013). De acordo com a literatura, as CTM inibem a diferenciação de células T precursoras de memória e

células T *naïve* em T<sub>H</sub>17, através da secreção de PGE<sub>2</sub>, diminuindo assim o número de T<sub>H</sub>17 no local da inflamação (DUFFY et al., 2011).

Pode-se concluir, portanto, que o perfil imunomodulador da CTM é de extrema importância na regulação do sistema imune como um todo (GLENN e WHARTENBY, 2014).

Por possuírem a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares, o transplante de CTMs é utilizado na clínica como terapia para diversas doenças, principalmente as degenerativas (CONESE et al., 2013; DAS et al., 2013; ALAGESAN e GRIFFIN, 2014; HOOGDUIJN et al., 2014). O caráter imunossupressor dessas células associado ao fato de apresentarem baixa expressão de HLA (antígeno leucocitário humano) -I e ausência de HLA-II aumentam a probabilidade de êxito do transplante (HERRMANN e STURM, 2014).

Estima-se que aproximadamente metade dos pacientes hospitalizados apresentam algum grau de desnutrição, o que aumenta a probabilidade de comprometimento da resposta imune desses indivíduos (KIRKLAND et al., 2013; CORKINS et al., 2014). Este fato é de extrema importância e deve ser levado em consideração no tratamento de doenças que envolvam o transplante de CTMs como terapia. Dessa forma, deve-se reverter o quadro de desnutrição anteriormente ao transplante de CTMs, a fim de evitar um comprometimento ainda maior do sistema imune desses pacientes.

Pouco se sabe em relação aos efeitos da desnutrição sobre as CTMs. Oreffo e colaboradores observaram que a desnutrição materna influencia na proliferação e diferenciação das CTMs obtidas de ratos recém-nascidos (OREFFO et al., 2003). Recentemente, nosso grupo relatou que as CTMs provenientes de animais desnutridos tendem a se diferenciar em adipócitos, comprometendo a manutenção de um estroma de suporte adequado para o processo de hemopoese (CUNHA et al., 2013). Até o momento, não existem estudos que abordam a influência da desnutrição sobre aspectos proliferativos e imunomodulatórios das CTMs.

#### 1.4 L-GLUTAMINA

Os aminoácidos são requeridos para a síntese de uma série de proteínas e possuem importante papel na resposta imune. Portanto, o consumo de uma dieta balanceada quanto ao seu valor proteico é necessário para o funcionamento adequado do sistema imune, prevenindo assim doenças e infecções (CALDER e YAQOUB, 1999).

A L-glutamina (GLUT) é um dos aminoácidos constituintes das proteínas que encontra-se presente em quantidades abundantes no plasma, tecidos e corrente sanguínea (RENNIE et al., 1996; TAPIERO et al., 2002). A GLUT é considerada um aminoácido não essencial, pois é sintetizada pelo organismo de acordo com sua necessidade (NEWSHOLME, 2001). Entretanto, em condições de estresse metabólico causadas por exercício físico intenso, desnutrição, infecções, septicemia, câncer, traumas, e/ou queimaduras, a GLUT pode tornar-se um aminoácido condicionalmente essencial (ADEVA et al., 2012), sendo rapidamente sintetizada, a partir de glutamato e amônia, pela ação da enzima glutamino sintetase (RENNIE et al., 1996; TAPIERO et al., 2002), e secretada pelos músculos esqueléticos (CASTELL e NEWSHOLME, 2001).

Em condições de equilíbrio na homeostasia, a GLUT consumida no metabolismo celular provém da digestão de proteínas ingeridas na dieta. Esse aminoácido é utilizado como fonte de energia por células com altos índices metabólicos, como as CTMs (NEWSHOLME, 2001; BRASSE-LAGNEL et al., 2010). A GLUT é o aminoácido mais consumido pelas CTMs, sendo a segunda principal fonte de energia depois da glicose (SCHOP et al., 2008; HIGUERA et al., 2012).

Em situações catabólicas, como na desnutrição, a proteólise muscular resulta na liberação de aminoácidos que podem ser captados por outros tecidos. Os aminoácidos de cadeia ramificada leucina, isoleucina e valina, são usados diretamente como fonte alternativa de energia por diversos tipos celulares ou ainda na síntese de alanina e GLUT, que são utilizados posteriormente no processo de gliconeogênese (KRAFT et al., 2005).

A GLUT exerce uma série de funções no organismo, pois participa de diversas vias metabólicas e processos celulares. Dentre essas funções, pode-se citar sua

capacidade de transferência de nitrogênio e carbono para síntese de outras moléculas como ácidos nucleicos e proteínas, indução de proteínas do tipo *heat shock*, na detoxificação e captação de amônia da corrente sanguínea, participação no metabolismo energético celular juntamente com a glicose, atuação na gliconeogênese, regulação do equilíbrio ácido-base renal, diminuição da resistência à insulina e modulação do sistema imune (BROSNAN, 2003; ALEDO, 2004; CURI et al., 2005; ZIEGLER et al., 2005; YUNEVA et al., 2007).

Por ser capaz de modular o sistema imune, alguns autores classificam a GLUT como um imunonutriente (KIM, 2011). A literatura demonstra que a GLUT aumenta a capacidade de resposta de células do sistema imune (CASTELL e NEWSHOLME, 2001; NEWSHOLME, 2001), estimulando a proliferação de linfócitos e a capacidade fagocítica de macrófagos, bem como atua na produção de citocinas por esses dois tipos celulares (CALDER e YAQOUB, 1999; ROGERO, BORELLI, VINOLO, et al., 2008).

A deficiência de GLUT, causada por episódios de desnutrição ou por desequilíbrios da homeostasia inflamatória, gera redução na capacidade proliferativa de linfócitos, alteração na atividade de monócitos e macrófagos, indução da apoptose celular, alteração do potencial redox celular pela modulação da síntese de glutatona e aumento da atividade do sistema AMPK (proteína quinase ativada por AMP), comprometendo, dessa maneira, o sistema imune (ROTH, 2007; HARDIE, 2008).

Sabe-se, por exemplo, que a GLUT é essencial para a funcionalidade de macrófagos, sendo a sua privação dietética prejudicial para a função adequada dessas células (ROGERO, BORELLI, VINOLO, et al., 2008). Demonstrou-se que a suplementação de GLUT na dieta de camundongos recém desmamados modula a capacidade de síntese de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6 por macrófagos obtidos desses animais (ROGERO, BORELLI, FOCK, et al., 2008).

Observou-se também que células da mucosa intestinal expostas ao LPS presente em bactérias gram-negativas aumentam a expressão de TLR4 e MyD88, induzindo a secreção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6 (CARIO et al., 2000). A suplementação enteral de GLUT aumenta a atividade anti-bacteriana e anti-inflamatória, uma vez que esse aminoácido regula negativamente a produção de TLR4, MyD88 e TRAF6 por essas células (KESSEL et al., 2008).

Dessa forma, segundo alguns autores, a administração de GLUT pode ser recomendada em casos de desnutrição e/ou distúrbios na homeostase, visando uma melhora na qualidade da resposta imune comprometida (MIZOCK, 2010; KIM, 2011; UYANGAA et al., 2012).

Em contraste com esses estudos, outros grupos demonstraram que a GLUT possui a capacidade de atuar negativamente na via de sinalização dependente de NF $\kappa$ B e, conseqüentemente, inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-8 (WISCHMEYER et al., 2003; HUBERT-BURON et al., 2006; DA SILVA LIMA et al., 2013). Nesse caso, a administração de GLUT em indivíduos desnutridos poderia comprometer ainda mais o sistema imunológico desses pacientes.

Isto posto, pode-se constatar que a literatura é controversa quanto ao benefício da modulação do sistema imune pela GLUT. A divergência encontrada na literatura pode ser o resultado de variações nas metodologias utilizadas (*in vitro* / *in vivo*), no tipo de modelo experimental (murino / humano), nos tipos celulares avaliados, nas concentrações de GLUT testadas e no período de exposição à esse aminoácido.

## 2. OBJETIVOS

Dados da literatura e do nosso grupo evidenciam que a desnutrição causa alterações funcionais no tecido medular hemopoético, comprometendo a hemopoese e, conseqüentemente, a geração de células imunológicas e a resposta imune (CHANDRA, 1991; FOCK et al., 2007; FOCK, ROGERO, et al., 2010).

O compartimento estromal, originado a partir da diferenciação de CTMs, é responsável pela geração de um microambiente bioquímico favorável à hemopoese e pode ser alterado pela desnutrição (PONTIKOGLOU et al., 2011). Além de fornecerem o parênquima de sustentação para a hemopoese, as CTMs são capazes de modular células do sistema imunológico (BAIGUERA et al., 2012).

A GLUT é um aminoácido condicionalmente essencial e o mais consumido pelas CTMs (SCHOP et al., 2008; HIGUERA et al., 2012). Visto que CTMs e células imunológicas aumentam o consumo de GLUT durante períodos de carência nutricional (LI et al., 2007), hipotetizamos que a suplementação de GLUT seria capaz de modular a proliferação e diferenciação das CTMs, cruciais na formação do estroma que sustenta a hemopoese, bem como seus aspectos imunomodulatórios.

Dessa forma, esse trabalho teve como objetivo investigar, em um modelo animal de desnutrição proteico-energética, aspectos relacionados à capacidade imunomodulatória das CTMs e se a suplementação de GLUT seria capaz de influenciar alguns desses aspectos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus domesticus*) machos, com 45 a 60 dias de idade, da linhagem BALB/c (isogênica) provenientes de colônias mantidas pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Após o nascimento, os animais foram mantidos em temperatura controlada (22 a 25°C), ciclo de luz claro-escuro de 12 horas e umidade relativa do ar igual a 55 ± 10%. Após o desmame, os animais receberam ração CR-1 (Nuvilab<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) e água *ad libitum* até atingirem a idade determinada para o início dos experimentos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Protocolo CEUA/FCF/USP/394, anexo II).

##### 3.1.2 Rações

Para a alimentação dos animais utilizados no modelo experimental, dois tipos de ração - normoproteica e hipoproteica - foram preparadas contendo, respectivamente, 12% e 2% de proteína. Ambas as rações foram produzidas em nosso laboratório (*in house*) na forma de granulado e armazenadas a -4°C até a sua utilização.

A composição das rações, discriminada na **Tabela 1**, está de acordo com as recomendações do Instituto Americano de Nutrição (AIN) para camundongos adultos – AIN-93M (REEVES et al., 1993). Foi utilizada caseína comercial (LABSYNTH<sup>®</sup>, Diadema, Brasil) como fonte proteica e sua concentração foi determinada pelo

método micro-Kjeldahl (Instituto Adolfo Lutz, 1985) no Laboratório de Bioquímica da Nutrição (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo), pela Sra. Ivanir Pires e sob responsabilidade do Prof. Dr. Júlio Tirapegui. As misturas vitamínica e salínica foram preparadas sob encomenda pela Rhoster<sup>®</sup> (Rhoster<sup>®</sup>, Araçoiaba da Serra, Brasil).

As misturas salínica (**Tabela 2**) e vitamínica (**Tabela 3**) foram preparadas sob encomenda pela Rhoster<sup>®</sup> (Rhoster<sup>®</sup>, Araçoiaba da Serra, Brasil). Além das rações produzidas em nosso laboratório, a ração comercial CR-1 (Nuvilab<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil) foi utilizada durante os períodos de crescimento de todos os animais (**ANEXOS III, IV e V**)

**Tabela 1:** Composição das rações produzidas *in house* (normoproteica e hipoproteica)

<b>Constituintes</b>	<b>Ração Normoprotéica</b> (g/kg de ração)	<b>Ração Hipoprotéica</b> (g/kg de ração)
Caseína (85% pureza)	120	20
Sacarose	100	100
Óleo de milho	80	80
Mistura salínica	35	35
Mistura vitamínica	10	10
Fibra alimentar (celulose)	10	10
Bitartarato de colina	2,5	2,5
Metionina	1,5	1,5
Tert-butilhidroquinona	0,008	0,008
Amido de milho	640,992	740,992

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

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

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

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

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Adaptação dos animais

Animais da linhagem isogênica BALB/c foram transferidos individualmente para gaioleiros metabólicos. Cada gaioleiro foi habitado por apenas um animal durante os períodos de adaptação e de indução à desnutrição. Na fase de adaptação, todos os animais receberam ração normoproteica e água *ad libitum*, sendo avaliados individualmente a cada 48 horas com relação à sua massa corpórea e ao seu consumo de ração. Esse período durou 10 dias e teve como principal objetivo adaptar o animal ao seu novo habitat.

### 3.2.2 Indução à desnutrição

Após o período de adaptação (item 3.2.1), os animais foram divididos em grupos controle e desnutrido, os quais receberam rações isocalóricas contendo, respectivamente, 12% e 2% de proteína por um período de 5 semanas. Ambos os grupos receberam água *ad libitum* e quantidade de ração previamente estabelecida durante o período de adaptação. O período de indução à desnutrição teve duração de 35 dias e o peso e consumo de ração de cada animal foram avaliados a cada 3 dias (FOCK, BLATT, et al., 2010; FOCK, ROGERO, et al., 2010).

### 3.2.3 Obtenção de amostras sanguíneas e hemograma

As amostras sanguíneas foram obtidas a partir de punção do plexo axilar dos camundongos controles e desnutridos, os quais foram previamente anestesiados com cloridrato de quetamina (100 mg/Kg de peso, Ketamina<sup>®</sup>, Cristália, São Paulo, Brasil), associado ao cloridrato de xilazina (10 mg/Kg de peso, Rompun<sup>®</sup>, Bayer HealthCare Animal Health, Leverkusen, Alemanha), por via intramuscular. As amostras foram coletadas com uma pipeta de transferência e divididas em dois tubos do tipo Eppendorf: a) um tubo contendo EDTA (sal potássico do ácido etileno diaminotetracético) a 10% na proporção de 10 µL para cada 1,0 mL de sangue periférico para a realização do hemograma e b) um tubo sem anticoagulante para obtenção de soro, através da centrifugação da amostra a 2000 g por 10 minutos a 4°C, para a dosagem das proteínas totais, albumina e pré-albumina. O soro foi dividido em alíquotas e congelado a -40°C até o momento de sua análise. Após a coleta das amostras sanguíneas, os animais anestesiados foram eutanasiados por decapitação.

O hemograma foi realizado a partir do sangue total. A análise do volume de hematócrito, a dosagem de hemoglobina e as contagens globais de hemácias, leucócitos e plaquetas foram determinadas pelo analisador automático de células sanguíneas ABC Vet (ABX Diagnostics<sup>®</sup>, Horiba, Kyoto, Japão).

A contagem diferencial de leucócitos foi determinada a partir da preparação de extensões sanguíneas coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). As extensões coradas foram analisadas por microscopia óptica e foram contados, no mínimo, 200 leucócitos.

### 3.2.4 Determinação das concentrações de proteínas totais, albumina e pré-albumina séricas

A determinação de proteínas totais foi realizada pelo método do Biureto (GORNALL et al., 1949) e a determinação de albumina pelo método do Verde de Bromo Cresol (RODKEY, 1965; DOUMAS et al., 1971), utilizando-se “kits” comerciais da Labtest<sup>®</sup> (Labtest Diagnóstica SA, Lagoa Santa, Brasil). Os testes foram processados em triplicata e as leituras realizadas no espectrofotômetro EL800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek<sup>®</sup> Instrumentals, Winooski, EUA). A pré-albumina sérica foi quantificada por nefelometria automatizada, utilizando-se os reagentes comerciais N-ANTISORO pré-albumina<sup>®</sup> (Dade Behring, Marburg, USA), seguindo a metodologia indicada pelo fabricante.

### 3.2.5 Obtenção de células da MO e realização de mielograma

Após a eutanásia (item 3.2.3), os fêmures de cada animal foram seccionados entre as articulações fêmur-ilíaca e fêmur-tibial. Com o auxílio de agulha e seringa, foi feita a lavagem das cavidades femorais com 4,0 mL de meio de cultura cada. O meio de cultura utilizado para obtenção de células da MO e cultivo de CTMs foi o meio Dulbecco modificado (DMEM) baixa glicose (Cultilab<sup>®</sup>, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Cultilab<sup>®</sup>, Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA) e 2 mM de glutamina (GLUT) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA). Neste trabalho, este meio de cultura foi denominado de “meio de células tronco mesenquimais” ou “meio CTM”.

Posteriormente, as suspensões celulares foram centrifugadas (1500 rpm por 10 minutos), os sobrenadantes foram desprezados e as células foram cuidadosamente ressuspensas em 1,0 mL do meio CTM. Separou-se uma alíquota da suspensão celular do fêmur para realização do mielograma e o material remanescente foi destinado para a caracterização das CTMs. O material foi mantido imerso em gelo, por um breve período de tempo, até a sua utilização.

Todos os procedimentos de coleta e cultivo celular foram realizados em fluxo laminar bidirecional para a manutenção da esterilidade dos materiais e evitar a contaminação das culturas celulares.

### 3.2.6 Avaliação histopatológica medular

Para a obtenção do material histológico, os animais de ambos os grupos foram anestesiados e submetidos à eutanásia conforme descrito no item 3.2.3, com posterior retirada do esterno. Os esternos foram colocados dentro de cassetes, permanecendo imersos sob agitação constante em paraformaldeído 4%, durante 24 horas, para sua fixação. Posteriormente, o cassete foi transferido para uma solução de EDTA 10%, pH 7,4 durante 7 dias, para a descalcificação do osso. Os tecidos foram emblocados em parafina e os cortes de 5  $\mu$ m foram corados por hematoxilina e eosina (H/E). As preparações histológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

### 3.2.7 Isolamento e cultivo de CTMs

O isolamento das CTMs dos animais pertencentes aos dois grupos foi realizado seguindo a metodologia originalmente descrita por Friedenstein (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Essa metodologia baseia-se na capacidade que as CTMs têm em aderir ao plástico em meio com baixa concentração de glicose, formando culturas celulares relativamente isentas de CTHs e de outras células

aderentes que necessitam de altas concentrações de glicose para sua sobrevivência (COLTER et al., 2000).

As CTMs de animais controle e desnutridos foram cultivadas e acondicionadas em atmosfera umidificada (95%), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento e morfologia das CTMs foram monitorados a cada 48 horas em microscópio invertido e o meio de cultura foi trocado no 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após seu isolamento da MO (item 3.2.7).

As CTMs isoladas e diretamente cultivadas em 0, 0,6, 2 ou 10 mM de GLUT, por 14 dias, foram utilizadas nos experimentos referentes a expressão de NFκB e STAT-3 e a produção de citocinas por essas células.

### 3.2.8 Contagem de CFU-F e análise da confluência celular de CTM

Para a contagem de CFU-F, foi contabilizado o número de colônias com mais de 50 células fibroblastóides. Para ambos os grupos, plaqueou-se o mesmo número de células (1x10<sup>6</sup> células/mL). A confluência celular e a contagem de CFU-F foram avaliadas nos 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias de cultivo das CTMs obtidas dos dois grupos de animais.

### 3.2.9 Identificação das CTMs

As CTMs foram caracterizadas por citometria de fluxo, bem como pela capacidade de diferenciação para as linhagens condrogênica, adipogênica e osteogênica.

Para a confirmação do fenótipo da CTM, as culturas celulares foram centrifugadas por 10 minutos a 300 g em temperatura ambiente. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet celular ressuspenso em 400 µL de PBS (solução tampão fosfato salina), pH 7,2 e 2 a 5 µL de anticorpo para cada 1 x 10<sup>6</sup> células/mL. Foi realizada incubação por 20 minutos, em temperatura de ambiente. Posteriormente, o sedimento celular foi centrifugado por 10 minutos a 300 g, na

mesma temperatura. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 500  $\mu\text{L}$  de PBS e foi realizada centrifugação por 10 minutos a 300 g a temperatura ambiente. Após nova lavagem, adicionou-se 400  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,2 e foram realizadas as aquisições em citômetro de fluxo. Os anticorpos anti-CD14 (Catálogo 5577195, BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA), -CD34 (Catálogo 560233, BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA), -CD45 (Catálogo 553087, BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA), -CD90 (Catálogo 561404, BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA), -CD271 (Catálogo 557195, BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA) e -Sca1 (Catálogo 553333, BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA) foram utilizados para a caracterização das CTM. Após a marcação com os anticorpos, o perfil fenotípico dessas células foi obtido por citometria de fluxo (FACScan<sup>®</sup>, BECTON DICKSON, San Jose, EUA). Como controle, utilizou-se a marcação para o isotipo de cada cadeia dos anticorpos adotados.

A confirmação da multipotencialidade das CTMs, utilizando testes de diferenciação *in vitro*, também é necessária para a identificação deste tipo celular. Para tanto, foi utilizado o kit *Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification*<sup>®</sup> (Catálogo SC010 - R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), composto de meios de diferenciação celular para as linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, além dos reagentes necessários para caracterizar por imunocitoquímica estes tipos celulares. As CTM obtidas conforme descrito no item 3.2.5 foram tripsinizadas, plaqueadas em placas de 24 poços e submetidas à diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos.

Para a diferenciação em adipócitos, plaqueou-se  $3,7 \times 10^4$  células por poço. Essas células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura para CTM (fornecido no kit). Após esse período, todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, foi adicionado 0,5 mL de meio de indução  $\alpha$ -MEM contendo 10% de SBF e 1% de suplemento adipogênico (fornecido no kit). O período de diferenciação das CTMs em adipócitos foi de 14 dias. Posteriormente, avaliou-se a morfologia dos adipócitos obtidos por microscopia de contraste de fase, utilizando-se a coloração de oil red.

Para a diferenciação em condrócitos, plaqueou-se  $2,5 \times 10^5$  células por tubo. Essas células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura para CTM (fornecido no kit). Após esse período, todo o meio de cultura foi removido e, a seguir,

foi adicionado 0,5 mL de meio de indução DMEM/F-12 contendo 10% de SBF e 1% de suplemento condrogênico (fornecido no kit). O período de diferenciação das CTMs em condrócitos foi de 21 dias.

Para a diferenciação em osteoblastos, plaqueou-se  $7,4 \times 10^3$  células por poço previamente tratados com 1  $\mu\text{g/mL}$  de fibronectina. Essas células foram cultivadas por 24 horas em meio de cultura para CTM (fornecido no kit). Após esse período, todo o meio de cultura foi removido e, a seguir, foi adicionado 0,5 mL de meio de indução  $\alpha$ -MEM contendo 10% de SBF e 5% de suplemento osteogênico (fornecido no kit). O período de diferenciação das CTMs em osteoblastos foi de 14 dias. Posteriormente, avaliou-se a morfologia dos osteoblastos obtidos por microscopia de contraste de fase, utilizando-se a coloração de vermelho de alizarina. Além disso, a diferenciação das CTMs em osteoblastos foi confirmada através da imunocitoquímica utilizando o anticorpo osteopontina.

### 3.2.10 Ensaio para a avaliação do ciclo celular em CTMs por citometria de fluxo

As CTMs foram isoladas da MO de animais controles e desnutridos (item 3.2.7) sendo que após esse período, essas células foram fixadas com 2% paraformaldeído por 20 minutos e permeabilizadas com 0,1% de Triton X-100 e Citrato de sódio por 15 minutos. Em seguida, as CTMs foram tratadas com 4 mg/mL de RNase por 45 minutos a 37°C. Para a marcação do DNA, as células foram incubadas com 5  $\mu\text{l}$  de Iodeto de Propídio (Catálogo 556463, BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA) por 20 minutos protegidas da luz. As células foram então ressuspensas com 250  $\mu\text{L}$  de PBS para aquisição dos dados por citometria de fluxo (FACScan<sup>®</sup>, BECTON DICKSON, San Jose, EUA). A análise do ciclo celular foi realizada quantificando-se a porcentagem das regiões sub-G0/G1, G1/G0 e S/G2/M, utilizando-se os programas CELLQuest<sup>®</sup> (versão 3.4, BECTON DICKSON, San Jose, EUA) e ModFit 3.0.

### 3.2.11 Determinação da expressão de CDC25A, CDC42, CDK2, c-MYC, PCNA e P27 em CTMs por Western Blot

As CTMs isoladas de animais controles e desnutridos (item 3.2.5) foram utilizadas para determinação da expressão de CDC25a, CDC42, CDK2, PCNA, P27 e c-Myc pela técnica de Western Blot.

$1 \times 10^6$  CTMs foram ressuspensas em 150  $\mu\text{L}$  de tampão RIPA<sup>®</sup> gelado (25mM TrisHCl pH7,6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sódio, 0,1% sódio dodecil sulfato, Pierce) (Pierce, Rockford, EUA), contendo inibidores de fosfatase e proteases (1mM PMSF, 50 mM NaF, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptina e 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinina). As amostras foram sonicadas por 1 minuto e centrifugadas por 15 minutos a 14000 rpm e a 4°C para peletizar os restos celulares. Separou-se uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  para a quantificação de proteínas e os 130  $\mu\text{L}$  restantes foram misturados ao tampão Laemmli (3x concentrado, 100mM Tris.HCL, pH 6,8, 5% 2-mercaptoetanol (v/v), 2% SDS, 20% glicerol, 0,01% azul de bromofenol). Para a quantificação de proteínas, foi utilizado um kit comercial (BCATM protein assay kit<sup>®</sup>, Pierce, Rockford, EUA) que baseia-se no método de Bradford (BRADFORD, 1976).

Posteriormente, foi adicionado tampão Laemmli 5x concentrado (Tris HCl 1M pH 6,8, 0,01% azul de bromofenol, 10% SDS, 50% glicerol, 10% mercaptoetanol) ao sobrenadante na proporção de 4 partes de amostra para 1 parte de tampão. Essa solução foi aquecida a 95°C por 5 minutos para desnaturar as proteínas, e armazenada a -40°C até o seu uso.

Após a quantificação das proteínas totais, realizou-se uma eletroforese em SDS-PAGE, utilizando um mini gel de poli-acrilamida a 10%. Um padrão de baixo peso molecular (BioRad<sup>®</sup>, Philadelphia, EUA) foi usado para a comparação dos pesos das frações separadas. Foram adicionados 20  $\mu\text{g}$  de proteínas das amostras e do padrão de peso molecular em cada poço. A eletroforese foi executada a 120 V em tampão de corrida (25 mM Trizma base, 192 mM glicina, 0,1% SDS e pH 8,3) até que as amostras percorressem todo o gel.

Após a separação, a etapa de transferência das proteínas para uma membrana de fluoreto polivinidileno (PVDF) foi realizada em uma cuba de eletroforese contendo tampão de transferência (25 mM Trizma base, 192 mM glicina,

20% de metanol e pH 8,3), a 30V por 2 horas. Posteriormente, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos para a verificação da eficácia da transferência. A seguir, a membrana foi lavada com água destilada para retirar o corante.

Em seguida, a membrana foi tratada com tampão de bloqueio (5% de leite em pó em TBST (PBS suplementado com 0,1% Tween 20) por 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação constante. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST .

Para a sondagem das proteínas (imunoblot), a membrana foi incubada *overnight* a 4°C e sob agitação constante, com os seguintes anticorpos primários: anti-CDC25a (Catálogo 3652, Cell Signalling), anti-CDC42 (Catálogo 2462, Cell Signalling), anti-CDK2 (Catálogo 610145, BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA), anti-cMyc (Catálogo SC-788, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA), anti-PCNA (Catálogo SC-56, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e anti-P27 (Catálogo 610242, BD Pharmingen, BECTON DICKSON, San Jose, EUA). Todos esses anticorpos foram diluídos 1:1000 em uma solução de leite em pó a 3% em TBST.

Posteriormente, a membrana foi novamente lavada e incubada por 2 horas com o anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com biotina, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) numa diluição de 1:10000 em TBST. Após a incubação, a membrana foi lavada novamente.

A revelação foi feita por quimioluminescência, utilizando o kit de revelação ECL (ECL Plus Western Blotting Detection Reagents<sup>®</sup>, Amersham Biosciences, Pittsburgh, EUA). As aquisições e análise das imagens foram feitas no equipamento ImagiQuanti 400<sup>®</sup> (GE Healthcare, Pittsburgh, EUA). A  $\beta$ -actina foi utilizada como padrão para a quantificação das bandas formadas (3:1.000.000).

### 3.2.12 Ensaio de MTT para CTMs medulares cultivadas em diferentes concentrações de GLUT

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTT, que baseia-se na capacidade das células viáveis de reduzirem metabolicamente o sal de MTT

(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio), por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica, em cristais de formazan de cor azul-púrpura, que se acumula no citoplasma celular (MOSMANN, 1983). Dessa forma, o ensaio de MTT avalia a atividade mitocondrial representativa de células viáveis pela quantificação da atividade da desidrogenase.

Após 24 horas de exposição das CTMs a diferentes concentrações de GLUT (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA) (0, 0,6, 2 e 10 mM), aspirou-se o meio de cultura, adicionou-se 100 µL da solução de MTT (5 mg/mL em PBS) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA) por poço da placa e incubou-se as placas por 2 horas a 37°C. Posteriormente, aspirou-se a solução de MTT e adicionou-se 100 µL de isopropanol por poço para a dissolução dos cristais de formazan. Finalmente, as placas foram incubadas *overnight*, em temperatura ambiente, e a absorbância dos cristais de formazan dissolvidos em isopropanol foi medida a 570 nm. A leitura foi realizada no espectrofotômetro EL800 Universal Microplate Reader (Bio-Tek<sup>®</sup> Instrumentals, Winooski, EUA).

### 3.2.13 Determinação da expressão de NFκB (total e fosforilado) e STAT-3 (total e fosforilado) por Western Blot

Após 14 dias de cultivo em diferentes concentrações de GLUT (0, 0,6, 2 e 10 mM), determinou-se por Western Blot (item 3.2.11) a expressão de NFκB (total e fosforilado) e STAT-3 (total e fosforilado) em CTMs obtidas de animais controles e desnutridos.

Os anticorpos anti-NFκB [total (Catálogo SC-33039, Sant Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e fosforilado (Catálogo SC-372, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA)] e anti-STAT3 [total (Catálogo SC-482, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA) e fosforilado (Catálogo SC-8001, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, EUA)] foram diluídos em TBST nas seguintes concentrações: 1:1000 (anti-NFκB total), 10:1000 (anti-NFκB fosforilado), 4:1000 (anti-STAT3 total) e 4:1000 (anti-STAT3 fosforilado). O anticorpo secundário (anti IgG de coelho conjugado com biotina, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido) foi diluído 1:10000 em TBST.

As membranas foram reveladas e as imagens adquiridas conforme descrito anteriormente (item 3.2.11).

#### 3.2.14 Avaliação do efeito da GLUT sobre a produção de citocinas por CTMs

Visando investigar se a suplementação de GLUT seria capaz de imunomodular as CTMs obtidas dos dois grupos, essas células foram cultivadas em meio Dulbecco modificado (DMEM) baixa glicose (Cultilab<sup>®</sup>, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Cultilab<sup>®</sup>, Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, St. Louis, EUA). Esse meio foi suplementado com diferentes concentrações de GLUT (0, 0,6, 2 e 10 mM) por 14 dias. Após esse período, os sobrenadantes foram recolhidos e acondicionados em uma temperatura de -40°C. Os sobrenadantes gerados receberam no nome de “meio condicionado de CTM controle (CTMct)” ou “meio condicionado de CTM desnutrido (CTMdesn)”, dentre eles: CTMct 0mM GLUT, CTMct 0,6mM GLUT, CTMct 2mM GLUT, CTMct 10mM GLUT, CTMdesn 0mM GLUT, CTMdesn 0,6mM GLUT, CTMdesn 2mM GLUT, CTMdesn 10mM GLUT.

As citocinas (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) foram dosadas por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Quantikine<sup>®</sup> ELISA, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), seguindo as orientações do fabricante.

#### 3.2.15 Avaliação da proliferação de células mononucleares esplênicas e da sua produção de citocinas quando cultivadas na presença de sobrenadantes de CTMs

Após eutanásia de animais controles (item 3.2.3), o baço foi retirado em condições assépticas e colocado em 10 mL de meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2 mM de GLUT. O órgão foi rompido com auxílio de uma agulha, seu conteúdo intra-capsular foi ressuspenso no meio acima citado e sua cápsula foi descartada. O conteúdo intra-capsular foi recolhido em um tubo e decantado por

15 minutos a 4°C. Em um outro tubo, foram adicionados 3 mL de Ficoll Histopaque (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). Após a decantação, o sobrenadante foi adicionado vagarosamente ao tubo contendo Ficoll, que foi centrifugado a 1350 rpm a 4°C por 30 minutos. Em seguida, a camada de células mononucleares do baço foi retirada com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferida para um outro tubo, no qual foram adicionados 10 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 2 mM de GLUT. Esse tubo foi centrifugado por 5 minutos a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuscitado em 1 mL de meio de cultura para a contagem do número de células em câmara de Neubauer. As células mononucleares foram plaqueadas em uma placa de 96 poços na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL de sobrenadante de CTMs obtidas dos animais controles e desnutridos previamente cultivadas em diferentes concentrações de GLUT (0, 0,6, 2 e 10 mM). Após o plaqueamento, estimulou-se, ou não, essas células com 1,25 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) por 3 dias (FOCK, et al 2007).

Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e acondicionados a temperatura de -40°C para a determinação da produção de citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-17) por ELISA (item 3.2.14) e a proliferação dessas células foi determinada pelo ensaio de MTT (item 3.2.12).

### 3.2.16 Avaliação da proliferação da linhagem de macrófagos Raw 264.7 e da sua produção de citocinas quando cultivadas na presença de sobrenadante de CTMs

Nessa etapa, foram utilizados macrófagos da linhagem Raw 264.7 (*mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*). Essas células foram cultivadas em meio de cultura Dulbecco modificado (DMEM) alta glicose (Cultilab®, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Cultilab®, Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA), 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e 2mM de GLUT (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA). Essas células foram cultivadas em atmosfera umidificada (95%), a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e o seu meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Quando próximas a confluência, as Raw foram tripsinizadas e plaqueadas em placa de 96 poços, na concentração de  $5 \times 10^5$  células/mL de sobrenadantes de CTMs obtidos dos animais

de ambos os grupos e previamente cultivadas por 14 dias em diferentes concentrações de GLUT (0, 0,6, 2 e 10 mM). Após o plaqueamento, estimulou-se, ou não, essas células com 1,25 µg/mL de LPS (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) por 3 dias.

Após esse período, os sobrenadantes foram coletados e acondicionados a temperatura de -40°C para a determinação da produção de citocinas (IL-10, IL-12 e TNF-α) por ELISA (item 3.2.14) e a proliferação dessas células foi determinada através do ensaio de MTT (item 3.2.12).

### 3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo programa GraphPad Prism 6 para Mac OS X (GraphPad Software Inc<sup>®</sup>, San Diego, USA). Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de homocedasticidade da amostra e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva Gaussiana. Quando foram analisados dois grupos, os dados classificados em paramétricos foram submetidos à análise estatística do teste t de *Student* e os dados classificados como não paramétricos foram submetidos à análise estatística *Mann-Whitney*. Quando comparou-se a ação da glutamina em diferentes concentrações nos grupos controle e experimental, os dados foram submetidos à análise estatística *Two-way* ANOVA. O nível de significância adotado foi de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

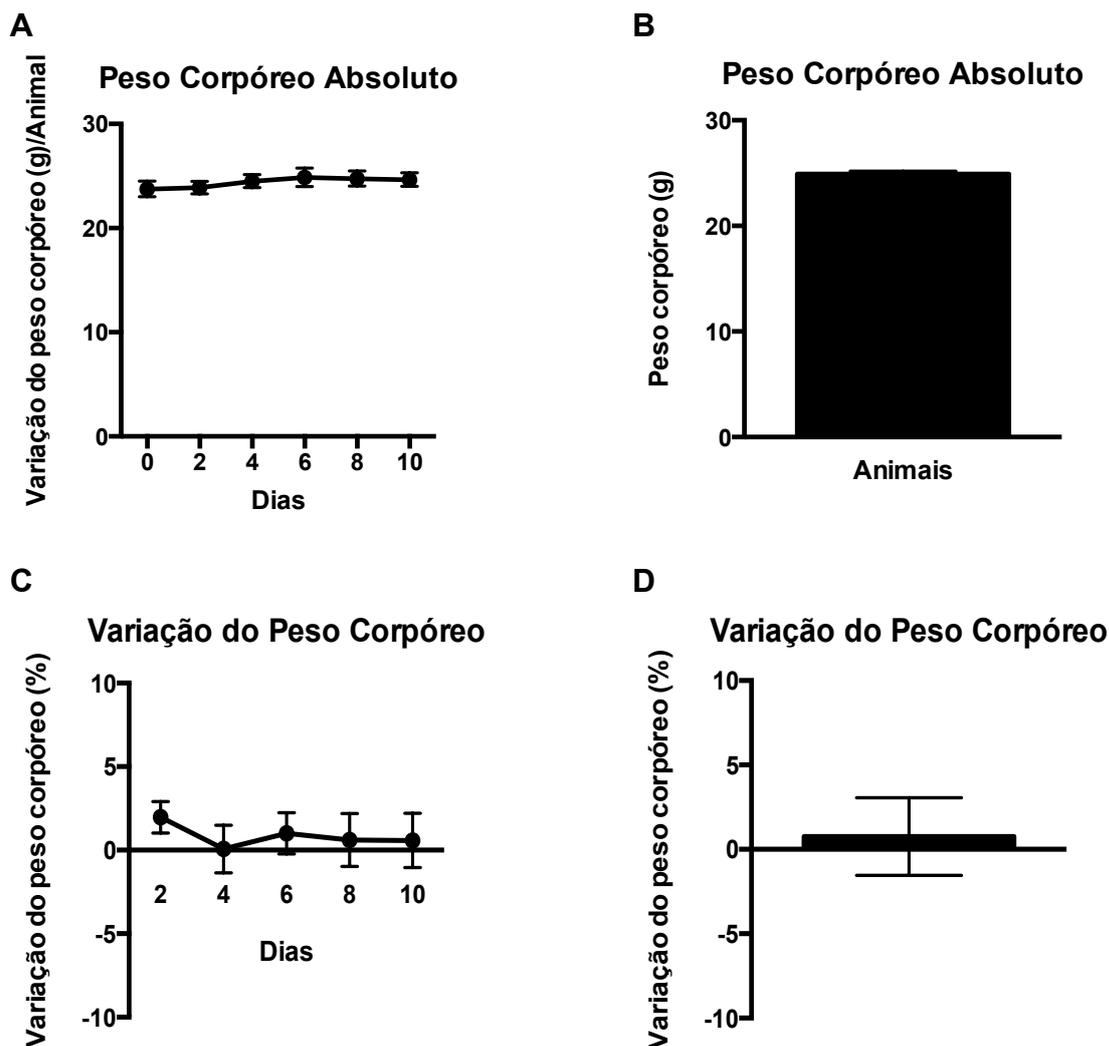
### 4.1 PERÍODO DE ADAPTAÇÃO

Camundongos BALB/c da mesma ninhada vivem em conjunto com seus irmãos de prole em um único gaioleiro e são alimentados com ração normoprotéica comercial (CR-1 Nuvilab<sup>®</sup>) (**Anexos III, IV e V**) e água *ad libitum*. No início do período de adaptação, os animais foram transferidos para gaioleiros metabólicos individuais com o objetivo de adaptá-los ao seu novo ambiente. No decorrer da adaptação, todos os animais receberam ração normoproteica contendo 12% de proteína (**Tabela 1**) e água *ad libitum*. O peso corpóreo e os consumos de ração e proteína foram acompanhados a cada 48 horas ao longo desse período, que teve duração de 10 dias.

#### 4.1.1 Avaliação da variação do peso corpóreo

Acompanhou-se o peso corpóreo dos animais a cada 2 dias ao longo do período de adaptação. Estimou-se também o percentual da variação do peso através da relação entre o peso do animal na data inicial e ao término desse período.

Conforme mostra o **Gráfico 1**, ainda que tenha havido um aumento sutil no peso corpóreo dos animais ao longo do período de adaptação (**Gráfico 1A**), a variação média do peso não foi significativa (**Gráfico 1C**). Os **Gráficos 1B e 1D** indicam, respectivamente, a média geométrica e intervalo de confiança 95% (IC95%) do peso corpóreo e a sua variação ao término dessa etapa.



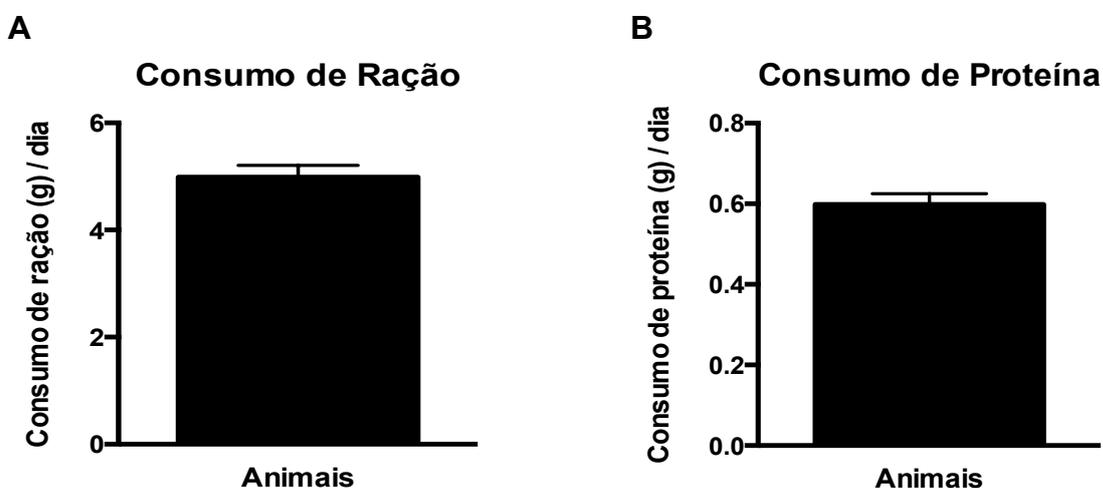
**Gráfico 1.** Peso corporal dos animais no período de adaptação. Resultados do peso corporal absoluto (A e B) dos animais ( $n=72$ ) e sua variação (C e D) ao longo (A e C) e ao término (B e D) do período de 10 dias de adaptação, representados pela média geométrica e IC95%.  $n$  representa o número de animais avaliados.

#### 4.1.2 Determinação dos consumos de ração e de proteínas

A determinação do consumo de ração diário ao longo do período de adaptação serviu como base para o estabelecimento da quantidade de alimento que foi fornecido aos animais durante a etapa de indução à desnutrição, evitando assim, períodos de jejum ou desperdício de ração, propiciando a robustez do modelo experimental de desnutrição. Além disso, o monitoramento do consumo diário de ração permite a determinação do consumo diário de proteína. Conforme descrito na seção **Materiais e Métodos**, realiza-se a dosagem do conteúdo protéico para cada

lote de ração produzido e fornecido aos animais.

A partir da porcentagem de proteína presente nas rações utilizadas calculou-se o consumo diário de proteína pelos animais. A porcentagem de proteína presente na ração normoprotéica é de 12% (**Tabela 1**). Portanto, se um animal consumiu, por exemplo, 5 gramas de ração por dia, seu consumo de proteína equivale a 0,6 gramas, já que esse valor corresponde a 12% das 5 gramas de ração ingerida. O **Gráfico 2** indica as quantidades médias de ração e proteína consumidas diariamente ao longo do período de adaptação.



**Gráfico 2.** Consumo diário de ração e proteína ao longo do período de adaptação. Resultados representam as quantidades médias de (A) ração e (B) proteína ingeridas por dia pelos animais ( $n=72$ ) ao longo do período de adaptação, representadas pela média  $\pm$  desvio padrão da média.  $n$  representa o número de animais avaliados.

#### 4.2 PERÍODO DE INDUÇÃO À DESNUTRIÇÃO

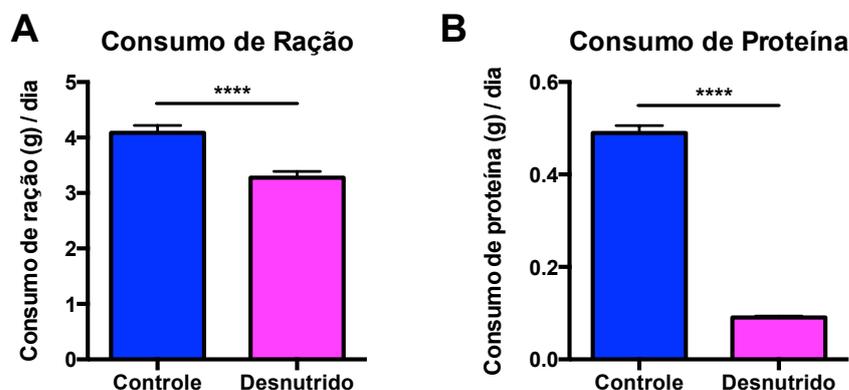
Após o término da adaptação, dividiu-se os animais em dois grupos, controle e desnutrido, que receberam rações isocalóricas contendo, respectivamente 12% (normoproteica) e 2% (hipoproteica) de proteína (**Tabela 1**) durante todo o período de indução a desnutrição.

Nessa etapa, foi oferecido aos animais dos grupos controle e desnutrido quantidades determinadas de ração, as quais foram previamente estabelecidas durante a sua adaptação (**Gráfico 2**). Portanto, o fornecimento de quantidades pré-

estabelecidas de ração associado ao uso de dois tipos diferentes de ração (normo- / hipoproteica) induz a desnutrição em animais que recebem ração com baixo teor protéico.

#### 4.2.1 Determinação dos consumos de ração e de proteínas

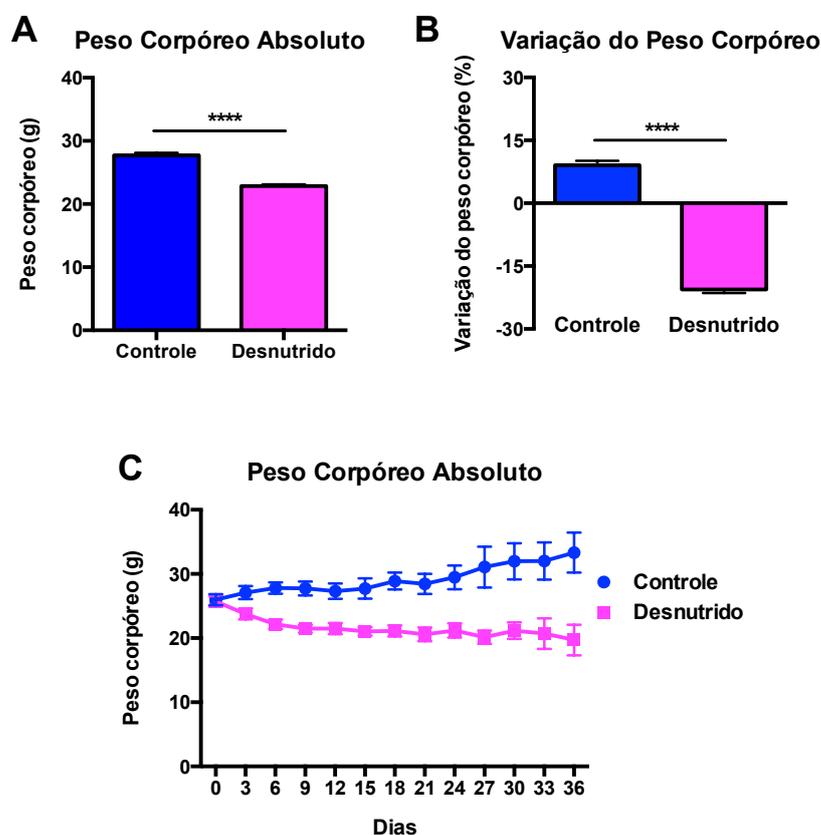
Ao longo do período de indução à desnutrição monitorou-se, a cada 3 dias, os consumos diário de ração e proteína dos animais pertencentes aos grupos controle e desnutrido. Animais desnutridos consumiram uma quantidade significativamente menor de ração em relação aos seus controles. Conforme mencionado anteriormente, calculou-se a ingestão diária de proteína pelos animais a partir do conteúdo proteico presente nas rações utilizadas. Animais desnutridos consumiram uma quantidade significativamente menor de proteínas em relação aos seus controles (**Gráfico 3**). Dessa forma, o tipo de desnutrição induzido pode ser classificado como desnutrição proteico-energética (DPE).



**Gráfico 3.** Consumo diário de ração e proteínas durante o período de adaptação. (A) Consumo diário de ração dos grupos controle (n=36) e desnutrido (n=36). (B) Consumo diário de proteína dos grupos controle (n=36) e desnutrido (n=36). Resultados representados em média geométrica e IC95%, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

#### 4.2.2 Avaliação da variação de peso corpóreo

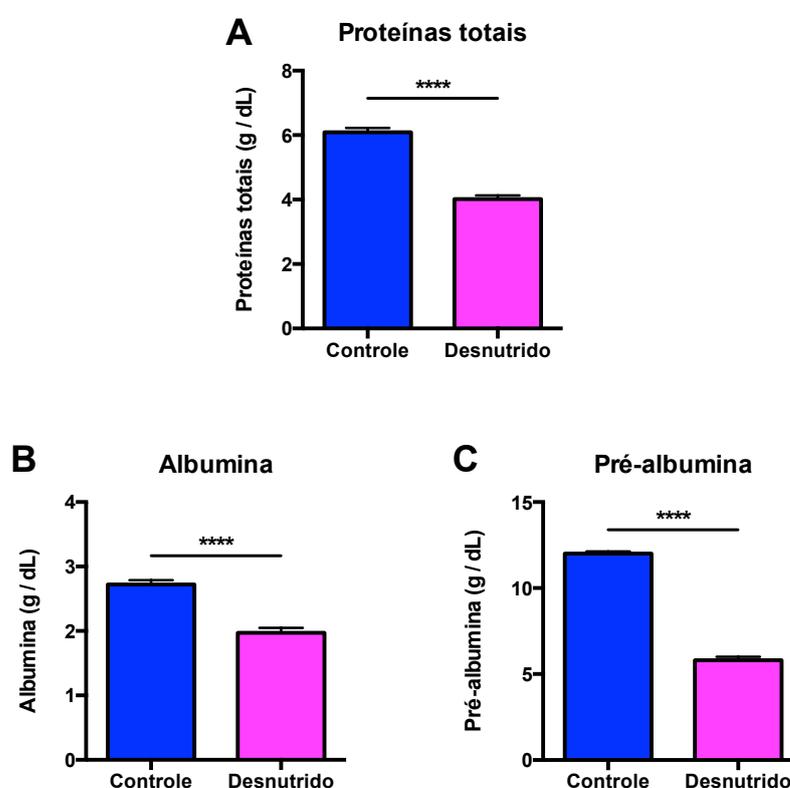
Ao longo do período de indução à desnutrição monitorou-se, a cada 3 dias, o peso corpóreo absoluto dos animais pertencentes aos grupos controle e desnutrido. De acordo com os resultados demonstrados na **Figura 4A**, os animais desnutridos apresentaram peso absoluto significativamente menor em comparação aos controles. Além disso, o percentual da variação do peso foi determinado pela relação entre o peso do animal na data inicial e final do período da DPE. Enquanto os animais controle ganharam peso durante a DPE, a dieta hipoproteica reduziu o peso corporal dos animais desnutridos (**Figura 4B**). Ademais, nota-se uma diminuição gradual do peso corpóreo dos animais desnutridos ao longo da DPE (**Figura 4C**).



**Gráfico 4.** Peso corpóreo absoluto e variação do peso ao longo do período de indução à desnutrição. (A) Peso corpóreo absoluto dos grupos controle (n=36) e desnutrido (n=36) ao final da indução à DPE. Resultados expressos em média geométrica e IC95%, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (B) Variação do peso corpóreo dos grupos controle (n=36) e desnutrido (n=36). Resultados expressos em média geométrica e IC95%, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (C) Variação de peso corpóreo dos grupos controle (n = 36) e desnutrido (n = 36) ao longo do período de indução à desnutrição. Resultados expressos em média geométrica e IC95%. *n* representa o número de animais avaliados.

### 4.3 ANÁLISE DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROTEÍNAS TOTAIS, ALBUMINA E PRÉ-ALBUMINA

Após o período de indução à DPE, os animais foram sacrificados e determinou-se as concentrações séricas de proteínas totais, albumina e pré-albumina. Animais desnutridos apresentaram uma redução significativa nas concentração de proteínas totais (**Gráfico 5A**) albumina (**Gráfico 5B**) e pré-albumina (**Gráfico 5C**) em relação aos seus controles.



**Gráfico 5.** Concentração sérica de proteínas totais, albumina e pré-albumina. (A) Concentração sérica de proteínas totais dos grupos controle (n=10) e desnutrido (n=10). (B) Concentração sérica de albumina dos grupos controle (n=10) e desnutrido (n=10). (C) Concentração sérica de pré-albumina dos grupos controle (n=10) e desnutrido (n=10). Resultados expressos em média geométrica e IC95%. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . *n* representa o número de animais avaliados.

Portanto, de acordo com o consenso estabelecido pela ASPEN e pela AAND (WHITE et al., 2012) previamente citado, pode-se concluir que os animais que receberam ração hipoprotéica estão desnutridos, uma vez que apresentaram sinais

e sintomas clínicos de DPE, como ingestão insuficiente de nutrientes, perda involuntária de peso, perda de massa muscular e caquexia.

#### 4.4 PERFIL HEMATOLÓGICO

A dieta hipoproteica gerou alterações no eritrograma dos animais desnutridos. Observou-se uma redução significativa no número de hemácias, no percentual de hematócrito e na concentração de hemoglobina nos animais desnutridos em relação aos seus controles. Os animais desnutridos apresentaram leucopenia, com redução significativa dos valores absolutos de neutrófilos, linfócitos e monócitos. Não houve redução significativa no número de plaquetas nos animais desnutridos em relação aos seus controles. Eosinófilos e basófilos foram raramente encontrados nos animais de ambos os grupos (**Tabela 4**).

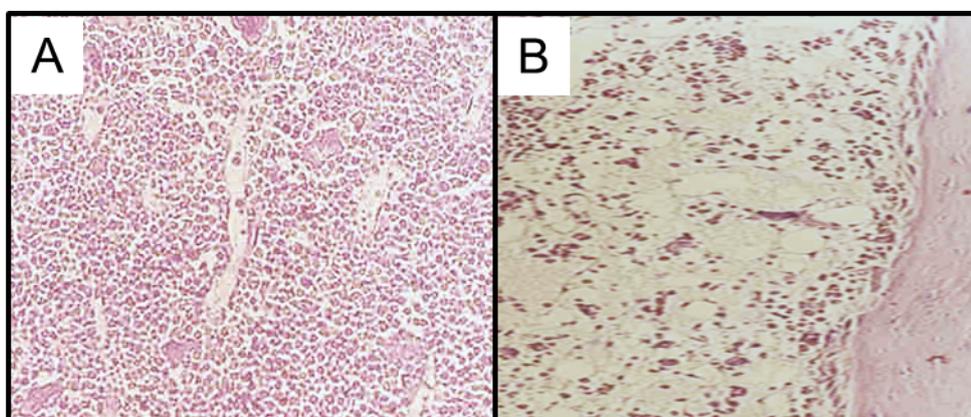
**Tabela 4.** Hemograma. Valores comparativos dos perfis eritrocitário, leucocitário e plaquetário dos animais controles e desnutridos

Parâmetros	Grupo Controle (n=10)	Grupo Desnutrido (n=10)
<b>Eritrograma</b>		
Hemácias ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	7,6 $\pm$ 0,1	6,9 $\pm$ 0,3**
Hemoglobina (g/dL)	13,8 $\pm$ 1,11	10,1 $\pm$ 1,01*
Hematócrito (%)	40,2 $\pm$ 3,14	36,8 $\pm$ 2,28****
<b>Leucograma</b>		
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	2367,3 $\pm$ 92,2	1041,8 $\pm$ 291,8****
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	262,4 $\pm$ 50,8	117,4 $\pm$ 37,1****
Linfócitos (/mm <sup>3</sup> )	1951,0 $\pm$ 76,7	866,0 $\pm$ 36,7****
Monócitos (/mm <sup>3</sup> )	37,10 $\pm$ 18,94	9,40 $\pm$ 9,72***
Plaquetas ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	586,8 $\pm$ 151,8	491,4 $\pm$ 100,1

**Tabela 4.** Hemograma. Valores comparativos dos perfis eritrocitário, leucocitário e plaquetário dos animais controles e desnutridos, representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . *n* representa o número de animais avaliados.

#### 4.5 ANÁLISE HISTOLÓGICA DA MO

Após a eutanásia dos animais, realizou-se a análise histológica da MO com o objetivo de identificar possíveis modificações na morfologia tecidual decorrentes da DPE. De acordo com as fotomicrografias obtidas (**Figura 2**), enquanto a MO dos animais controles apresentou-se normocelular, com populações celulares heterogêneas em diferentes estágios de maturação (**Figura 2A**), a MO dos animais desnutridos mostrou-se hipocelularizada, com depleção em todas as linhagens hemopoéticas e seios venosos dilatados (**Figura 2B**).



**Figura 2.** Análise histológica da MO. Fotomicrografias representativas de cortes histológicos de MO do grupo controle (A) e desnutrido (B). H/E, magnitude óptica 10x.

#### 4.6 CELULARIDADE DA MO E MIELOGRAMA

Avaliou-se, após o término do período da DPE, a celularidade da MO e a contagem diferencial das células medulares dos animais controles e desnutridos. Observou-se uma redução significativa na contagem de células totais da MO dos animais desnutridos em relação aos seus controles. Além disso, a análise diferencial demonstrou uma redução significativa de células das linhagens granulocítica e eritróide. Não houve diferença significativa quanto a contagem diferencial de linfócitos e monócitos (**Tabela 5**).

**Tabela 5.** Celularidade da MO e mielograma

Parâmetros	Grupo Controle (n=5)	Grupo Desnutrido (n=5)
Células totais nucleadas ( $10^7/\text{mm}^3$ )	2,35 ± 0,35	1,61 ± 0,18*
Blastos ( $10^5/\text{mm}^3$ )	9,4 ± 0,91	6,1 ± 0,91*
Granulócitos		
Formas jovens ( $10^5/\text{mm}^3$ )	4,1 ± 0,3	2,2 ± 0,2*
Formas em anel ( $10^5/\text{mm}^3$ )	15,9 ± 2,7	9,6 ± 1,6*
Formas segmentadas ( $10^5/\text{mm}^3$ )	115,4 ± 1,6	87,8 ± 2,1**
Eosinófilos ( $10^5/\text{mm}^3$ )	8,1 ± 1,7	4,4 ± 1,2*
Eritroblastos Jovens ( $10^5/\text{mm}^3$ )	10,3 ± 1,2	7,4 ± 0,9**
Eritroblastos Maduros ( $10^5/\text{mm}^3$ )	44,6 ± 6,8	22,2 ± 2,6*
Linfócitos ( $10^5/\text{mm}^3$ )	33,2 ± 13,2	19,1 ± 2,1
Monócitos ( $10^5/\text{mm}^3$ )	1,7 ± 0,5	0,7 ± 0,4

**Tabela 5.** Celularidade da MO e mielograma. Resultados comparativos dos valores absolutos da celularidade da MO e das suas diferentes células hemopoéticas em animais controle (n=5) e desnutrido (n=5), expressos em média ± desvio padrão da média. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,005$ . *n* representa o número de animais avaliados.

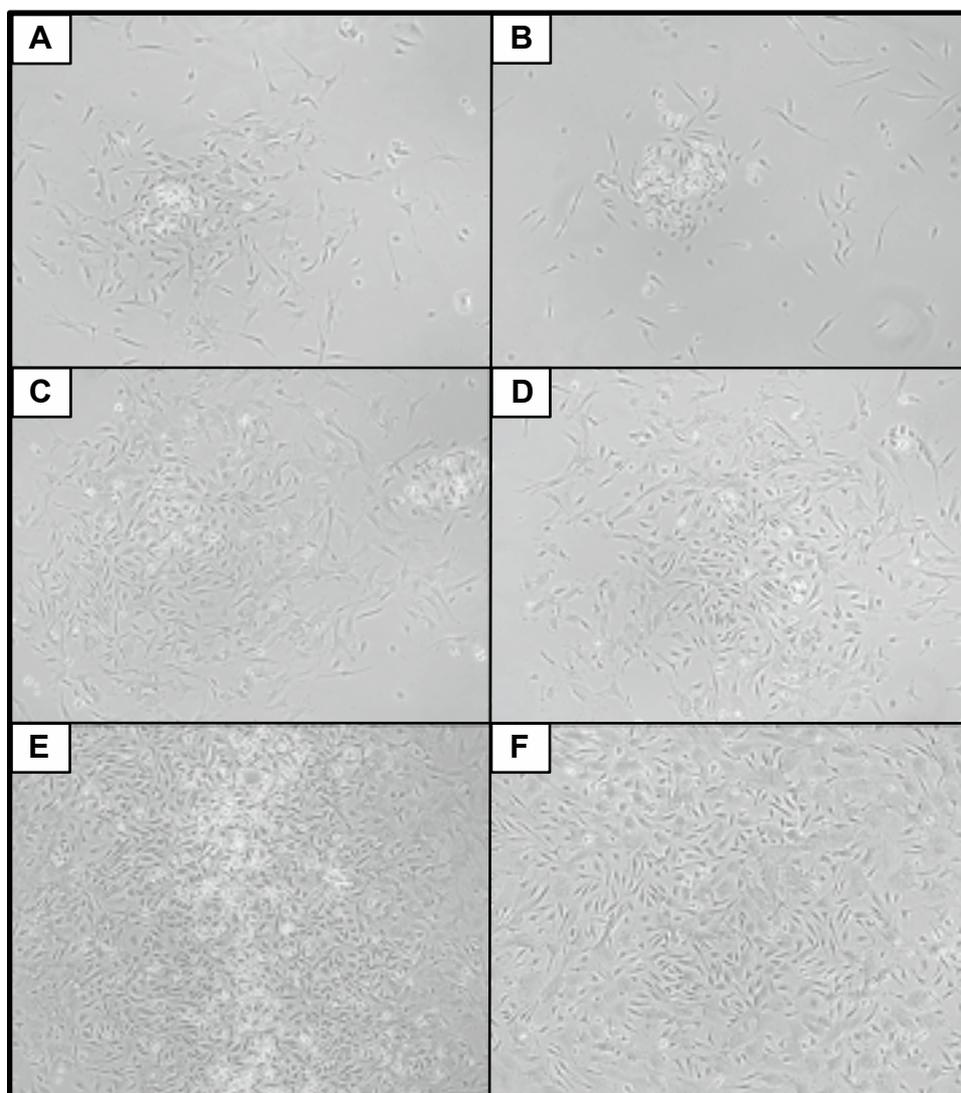
#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO DA CÉLULA TRONCO MESENQUIMAL MEDULAR

As CTMs foram caracterizadas a partir dos seguintes critérios: morfologia e confluência celular, capacidade de formar CFU-F, potencial de diferenciação e imunofenotipagem.

##### 4.7.1 Morfologia das CTMs

A fim de investigar possíveis diferenças morfológicas entre CTMs isoladas dos animais controle (CTMct) e desnutridos (CTMdesn), observou-se, em microscópio óptico invertido, a morfologia dessas células cultivadas após 3, 7 e 14 dias desde a sua coleta. Para ambos os grupos, plaqueou-se o mesmo número de células ( $1 \times 10^6$  células/mL) e o dia do plaqueamento foi considerado como dia 0.

Conforme as fotomicrografias a seguir, células de ambos os grupos apresentaram morfologia fusiforme (*fibroblast-like*) características de CTMs. A DPE não afetou a morfologia das CTM dos grupos controle e desnutrido nos dias especificados (**Figura 3**).

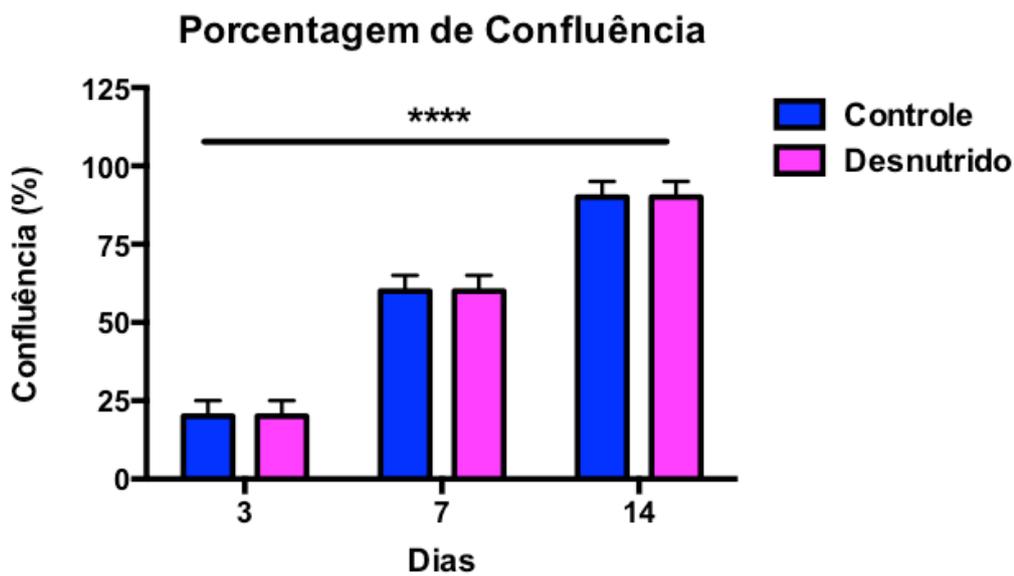


**Figura 3.** Fotomicrografias representativas de CTMs durante o cultivo celular. Fotomicrografias das células tronco mesenquimais cultivadas após 3 (A e B), 7 (C e D) e 14 (E e F) dias desde o seu plaqueamento. CTMct (A, C e E) e CTMdesn (B, D e F) não apresentaram diferenças morfológicas entre si. Magnitude óptica 10x.

#### 4.7.2 Estimativa da porcentagem de confluência celular

A porcentagem de confluência das CTMs isoladas de animais controle e desnutrido foi estimada a partir da observação dessas células, em microscópio

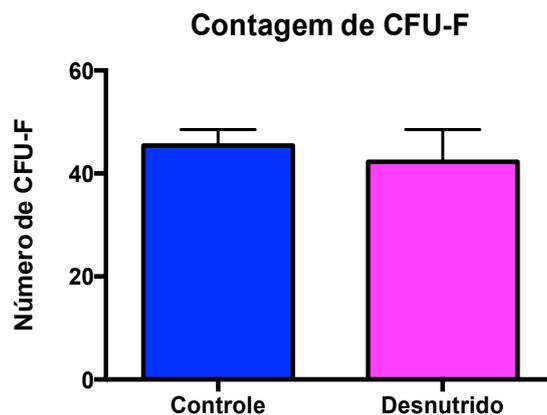
óptico invertido, nos 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após o plaqueamento. Para essa estimativa, foi plaqueado o mesmo número de células ( $1 \times 10^6$  células/mL), sendo que o dia do plaqueamento foi considerado como dia 0. A porcentagem estimada da confluência de CTM foi similar aos dois grupos (**Gráfico 6**).



**Gráfico 6.** Porcentagem de confluência estimada das CTMs. Porcentagem estimada da confluência de CTM obtidas de animais controles ( $n=3$ ) e desnutridos ( $n=3$ ) nos 3<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias após o plaqueamento. Resultados expressos pela média  $\pm$  desvio padrão da média, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

#### 4.7.3 Contagem de CFU-F

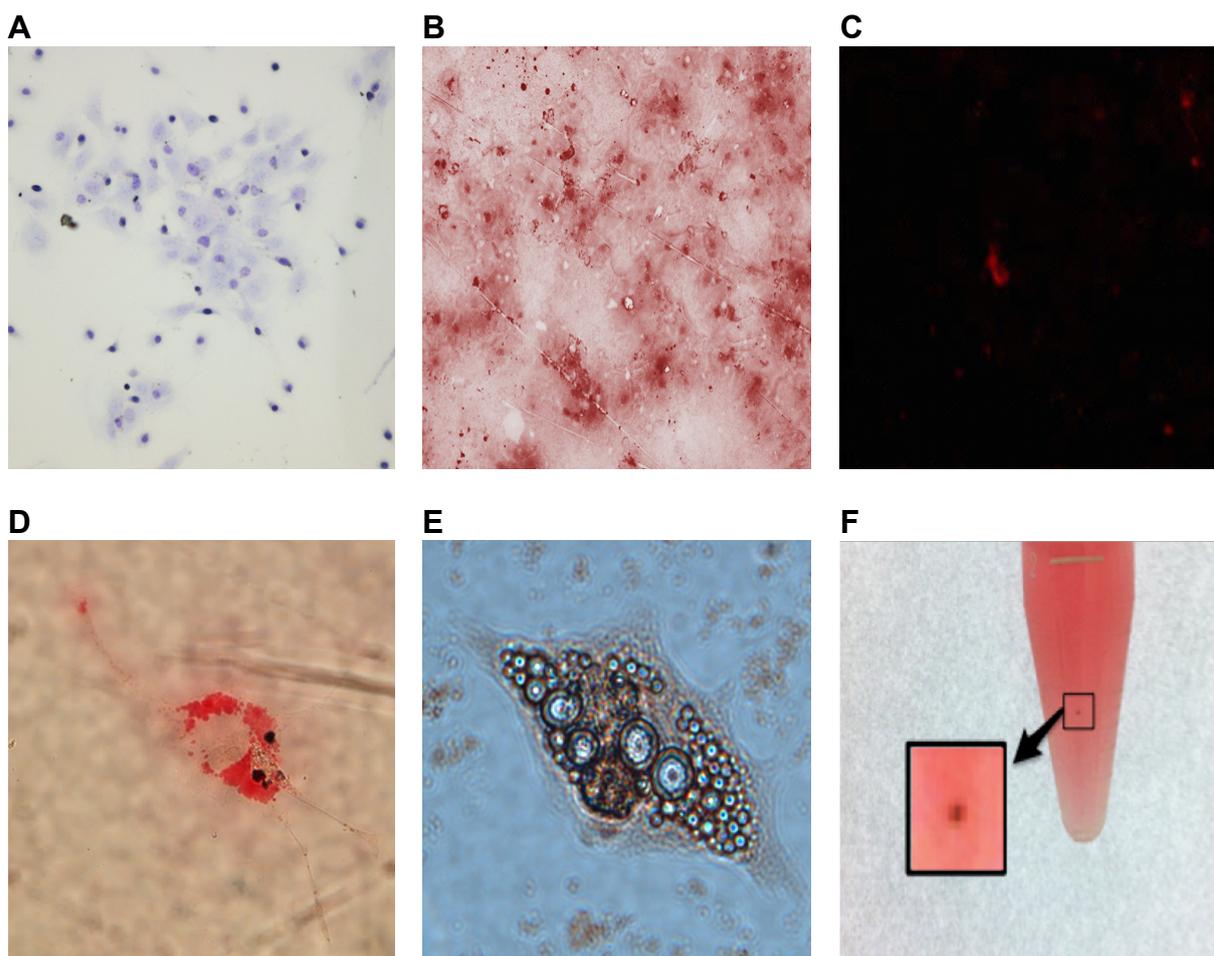
Para a contagem de CFU-F, quantificou-se aglomerados celulares de CTMct e CTMdesn contendo mais de 50 células fibroblastóides em microscópio de contraste de fase no 14<sup>o</sup> dia de cultivo (**Gráfico 7**). Para ambos os grupos, plaqueou-se o mesmo número de células ( $1 \times 10^6$  células/mL). Não houve diferença significativa quanto ao número de CFU-F entre os grupos controle e desnutrido.



**Gráfico 7.** Contagem de CFU-F. Resultados da contagem de CFU-F de CTMct (n=5) e CTMdesn (n=5), representadas pela média  $\pm$  desvio padrão da média,  $p>0,05$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

#### 4.7.4 Potencial de diferenciação de CTMs

O potencial de diferenciação de CTMs em adipócitos, condrócitos e osteoblastos foi avaliado. As CTMs mostraram-se capazes de se diferenciar nesses três tipos celulares (**Figura 4**).



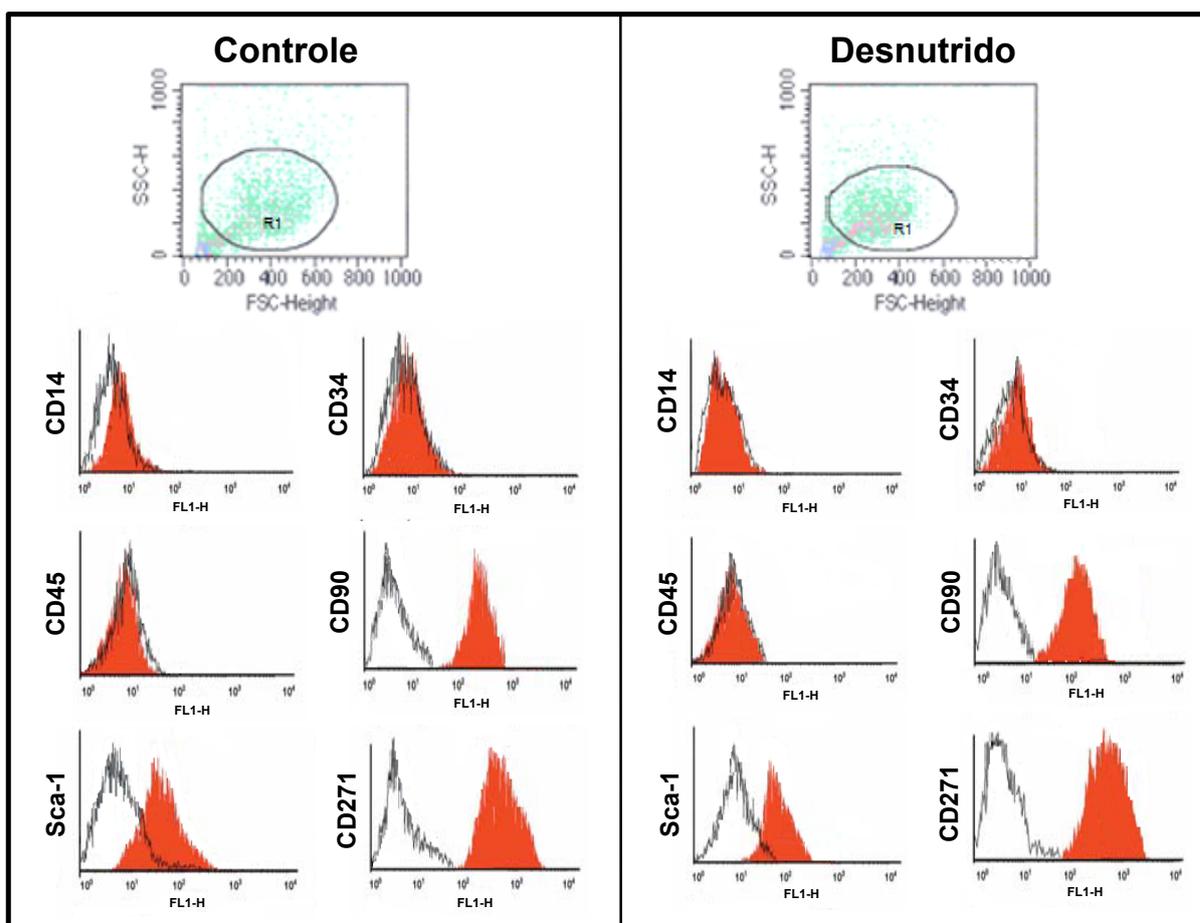
**Figura 4.** Fotomicrografias representativas dos testes de diferenciação *in vitro* das CTM em osteoblastos, adipócitos e condrócitos. **(A)** Fotomicrografia representativa de osteoblastos corados pelo método May-Grünwald-Giemsa modificado. Magnitude óptica 10x. **(B)** Fotomicrografia representativa de osteoblastos corados com vermelho da alizarina. Magnitude óptica 10x. **(C)** Fotomicrografia representativa de osteoblastos marcados com anticorpo anti-osteopontina. Magnitude óptica 10x. **(D)** Fotomicrografia representativa de adipócitos corados com *oil red*. Magnitude óptica 40x. **(E)** Fotomicrografia representativa de adipócito marcado com anticorpo FABP4. Magnitude óptica 40x. **(F)** Fotomicrografia representativa de pellet de condrócitos. Magnitude óptica 10x.

#### 4.7.5 Imunofenotipagem das CTMs

Para a caracterização imunofenotípica das CTMs, CTMct e CTMdesn foram marcadas para CD14, CD34, CD45, CD90, CD271 e Sca1.

As células provenientes de ambos os grupos, não apresentaram diferenças estatísticas e apresentaram intensidade de fluorescência similares para todos os marcadores testados, indicando que a DPE não alterou o perfil fenotípico das

mesmas. De acordo com os histogramas a seguir, as CTMs não apresentaram marcação para CD14, CD34 e CD45. Por outro lado, essas células foram positivamente marcadas com CD90, Sca-1 e CD271 (**Figura 5, Tabela 6**). Portanto, as CTMs apresentaram fenótipo característico das mesmas.



**Figura 5.** Imunofenotipagem das CTMs. Histogramas obtidos por citometria de fluxo (FACScan<sup>®</sup>, BECTON DICKSON, San Jose, CA) resultantes da imunofenotipagem da população total de CTMct e CTMdesn. Resultado de um experimento representativo de três experimentos independentes.

**Tabela 6.** Valores comparativos da porcentagem da marcação imunofenotípica de CTMs obtidas dos grupos controle e desnutrido.

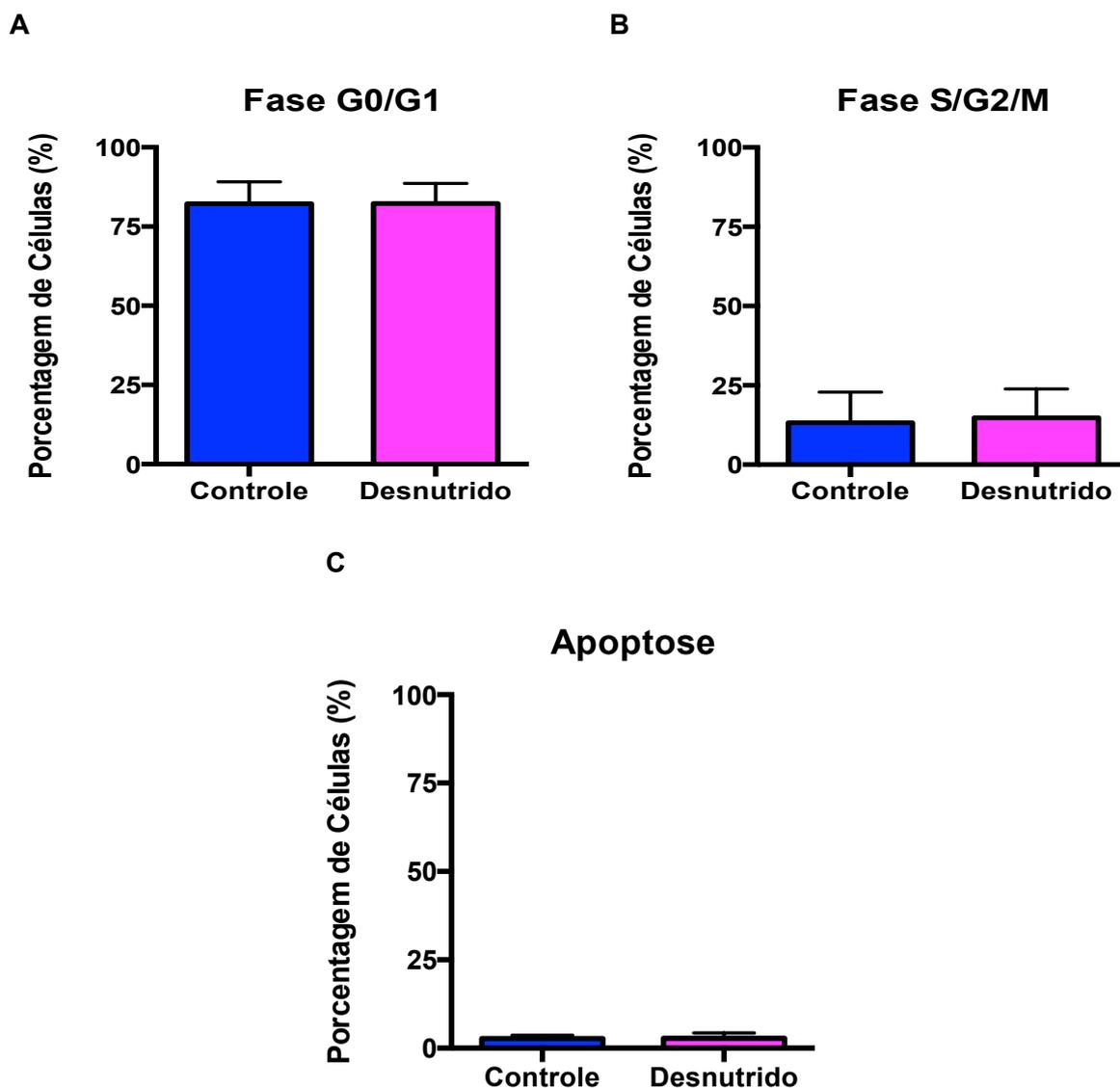
Anticorpo	%	
	Controle (n = 3)	Desnutrido (n = 3)
CD14	0,16 ± 0,003	0,08 ± 0,03
CD34	2,1 ± 0,3	1,1 ± 0,12
CD45	0,06 ± 0,02	0,2 ± 0,1
CD90	97,9 ± 0,6	98,1 ± 0,6
Sca-1	92,9 ± 0,6	90,2 ± 2,1
CD271	76,1 ± 0,5	72,1 ± 0,12

**Tabela 6.** Valores comparativos da porcentagem da marcação imunofenotípica de CTMs obtidas dos grupos controle e desnutrido. Resultados representados pela média ± desvio padrão da média,  $p > 0,05$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

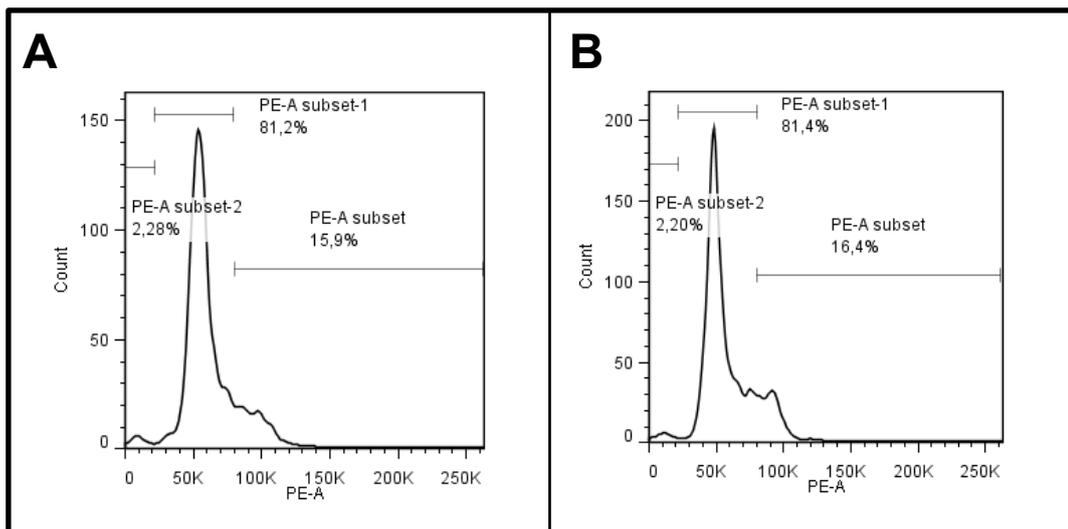
#### 4.8 AVALIAÇÃO DO CICLO CELULAR E DA APOPTOSE DE CTMs

##### 4.8.1 Influência da DPE sobre o ciclo celular e apoptose de CTMs

Buscando identificar se a DPE teria alguma influência na progressão do ciclo celular das CTMs, quantificou-se a porcentagem de células nas fases G1 e G2 do ciclo celular. Além disso, verificou-se a viabilidade dessas células frente à DPE. Conforme mostra o **Gráficos 8A** e **8B**, não houve diferença significativa na porcentagem de CTM em G0/G1 e S/G2/M entre os grupos avaliados. Ademais, a DPE não induziu apoptose em CTMs provenientes dos dois grupos (**Gráfico 8C**). A **Figura 6** mostra um histograma representativo de cada grupo referente ao ciclo celular e à apoptose.



**Gráfico 8.** Ciclo celular e apoptose de CTMs. Resultados das porcentagens de CTMct (n=5) e CTMdesn (n=5) em **(A)** G0/G1, **(B)** S/G2/M e **(C)** apoptose, expressas pela média  $\pm$  desvio padrão da média,  $p > 0,05$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

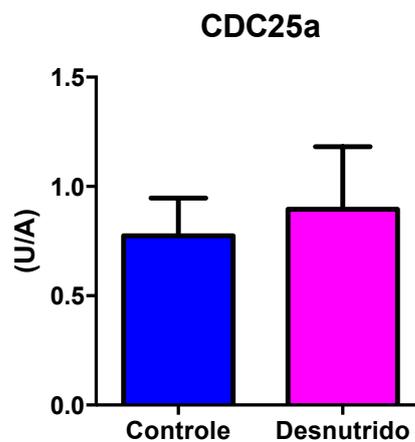
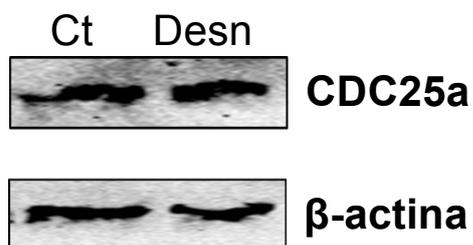


**Figura 6.** Histograma referente ao ciclo celular e apoptose de (A) CTMct e (B) CTMdesn. Resultado de um experimento representativo de três experimentos independentes. Histogramas obtidos por citometria de fluxo (FACScan<sup>®</sup>, BECTON DICKSON, San Jose, CA).

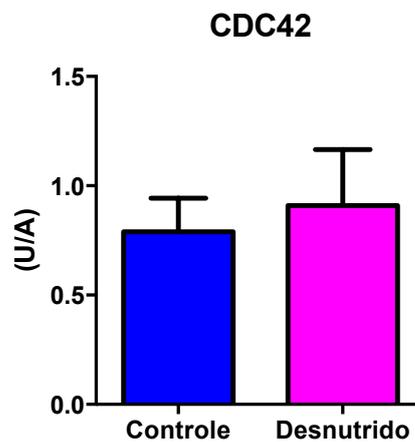
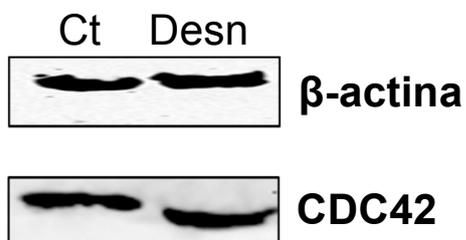
#### 4.8.2 Influência da DPE sobre a expressão de proteínas relacionadas a progressão do ciclo celular em CTMs

A expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular CDC25a, CDC42, CDK2, PCNA, p27 e c-Myc foi determinada em CTMct e CTMdesn com o objetivo de investigar se a DPE teria algum efeito sobre o ciclo celular dessas células. Não houve diferença significativa quanto a expressão dessas proteínas entre os dois grupos (**Figuras 7 e 8; Tabela 7**).

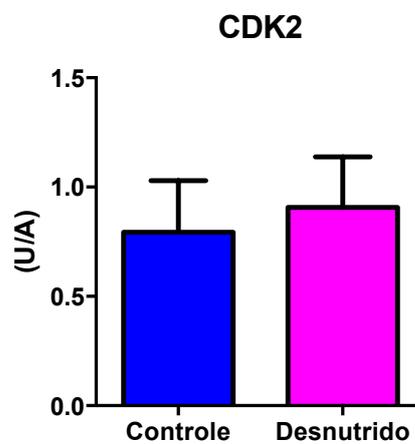
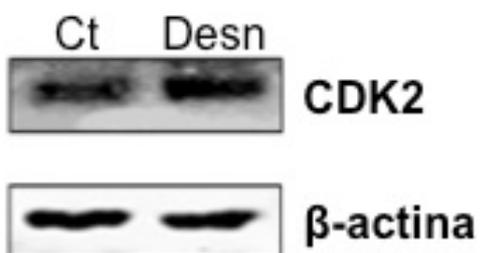
A



B

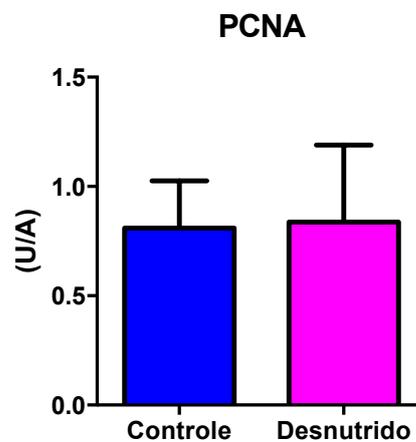
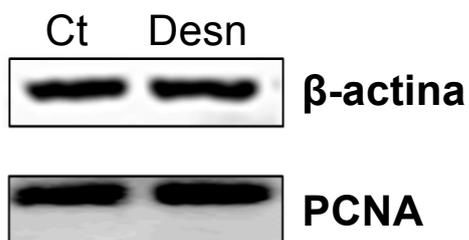


C

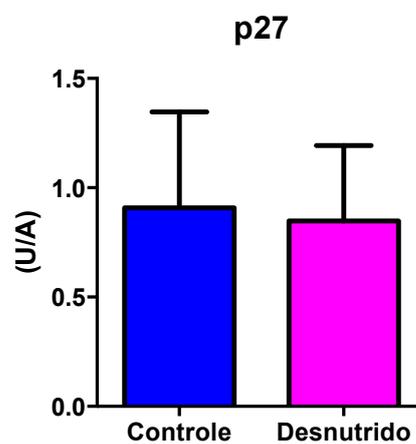
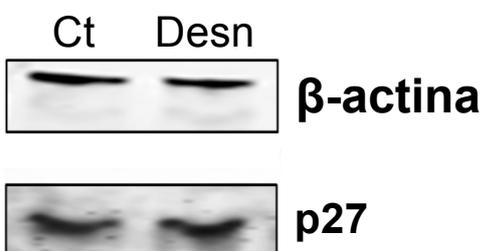


**Figura 7.** Expressão de CDC25a (A), CDC42 (B) e CDK2 (C) em CTMct (n 3) e CTMdesn (n=3). Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média,  $p > 0,05$ . *n* representa o número de animais avaliados.

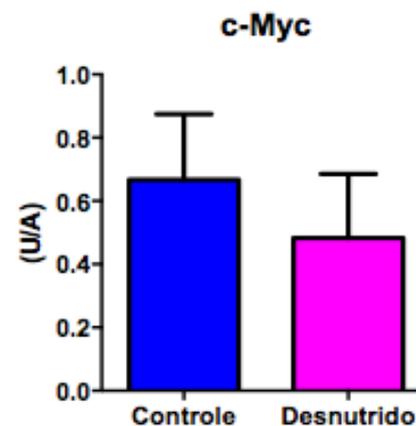
A



B



C



**Figura 8.** Expressão de PCNA (A), p27 (B) e c-Myc (C) em CTMct (n=3) e CTMdesn (n=3). Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média,  $p > 0,05$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

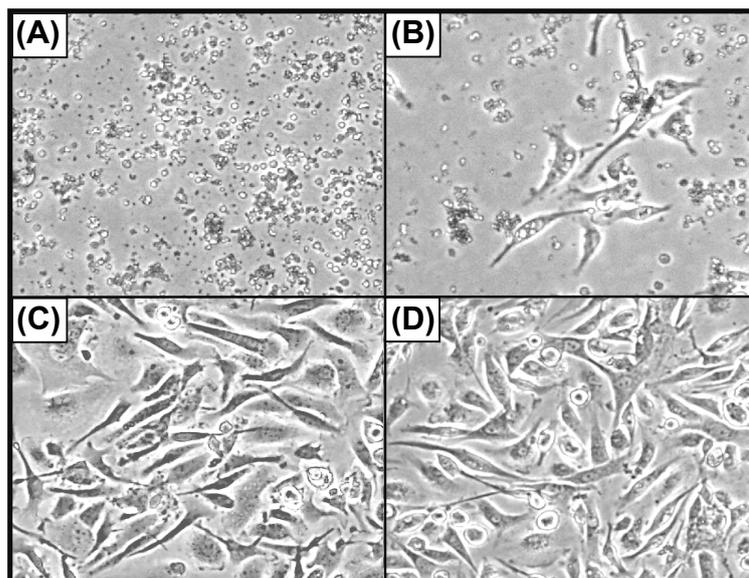
**Tabela 7.** Valores comparativos da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular em CTMct e CTMdesn

<b>Anticorpo</b>	<b>Controle (n=3)</b>	<b>Desnutrido (n=3)</b>
CDC25a	0,77 ± 0,06	0,89 ± 0,09
CDC42	0,79 ± 0,05	0,91 ± 0,09
CDK2	0,79 ± 0,09	0,91 ± 0,09
PCNA	0,81 ± 0,08	0,83 ± 0,12
p27	0,92 ± 0,13	0,84 ± 0,12
c-Myc	0,67 ± 0,19	0,49 ± 0,21

**Tabela 7.** Valores comparativos da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular em CTMct e CTMdesn. Resultados representados pela média ± desvio padrão da média. *n* representa o número de animais avaliados.

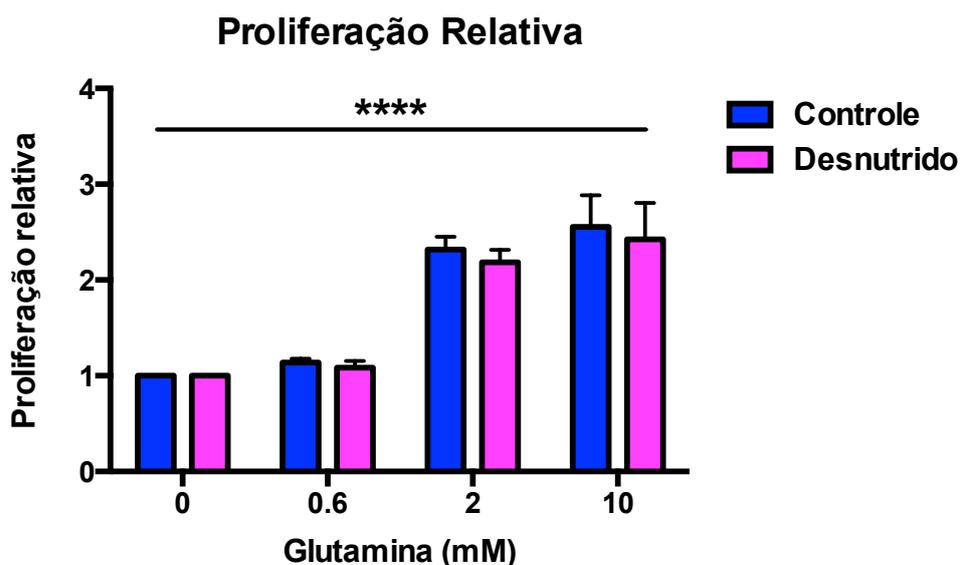
#### 4.9 A INFLUÊNCIA DA GLUT SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CTMs

Observou-se a morfologia e a proliferação, em microscópio óptico invertido, de CTMct cultivadas nas concentrações de 0, 0,6, 2 e 10mM de GLUT (**Figura 9**). Quanto maior a concentração de GLUT, maior a proliferação dessas células.



**Figura 9.** Fotomicrografias representativas de CTMs cultivadas em diferentes concentrações de glutamina. Fotomicrografias de CTMct cultivadas com (A) 0mM, (B) 0,6mM, (C) 2mM e (D) 10mM de GLUT após 14 dias em cultura (magnitude óptica 20x).

O efeito de diferentes concentrações de GLUT (0, 0,6, 2 e 10mM) sobre a proliferação de CTMct e CTMdesn foi avaliada pelo ensaio de MTT (**Gráfico 9**). A suplementação de GLUT possui efeito significativo sobre a proliferação de CTMs de ambos os grupos, sendo que quanto maior a concentração de GLUT, maior a proliferação das CTMs. A DPE não exerce efeito sobre a proliferação dessas células nas concentrações testadas em relação aos seus respectivos controles.

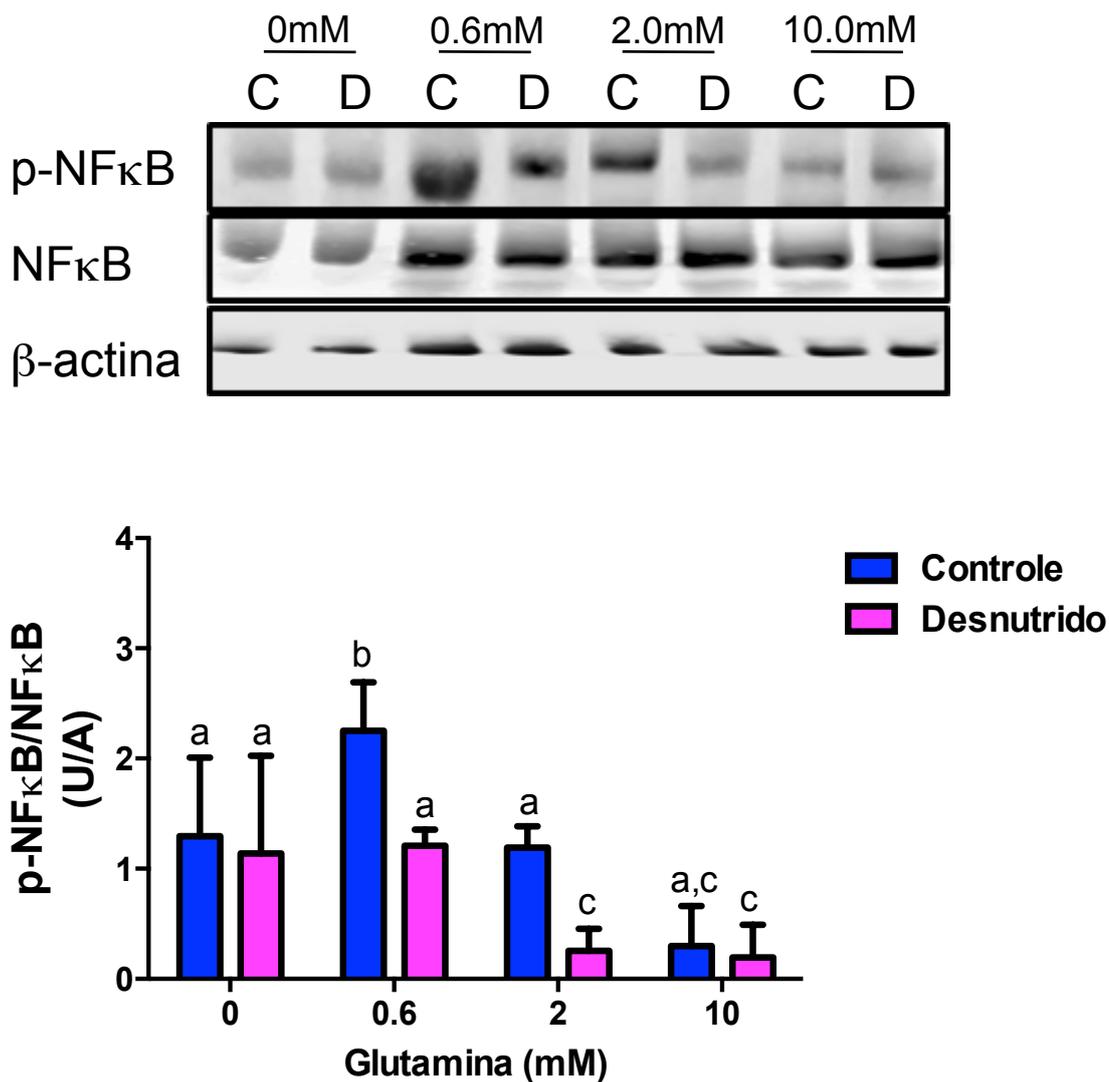


**Gráfico 9.** Proliferação relativa de CTMs. Proliferação relativa de CTMct (n=3) e CTMdesn (n=3), expressa pela média  $\pm$  desvio padrão da média, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

#### 4.10 A INFLUÊNCIA DA GLUT SOBRE A EXPRESSÃO DE NF $\kappa$ B E STAT-3 EM CTMs

##### 4.10.1 Influência da GLUT sobre a expressão de NF $\kappa$ B total e fosforilado em CTMct e CTMdesn

A **Figura 10** mostra o efeito de diferentes concentrações de GLUT (0, 0,6, 2 e 10mM) sobre a expressão de NF $\kappa$ B total e fosforilado em CTMct e CTMdesn. As bandas foram quantificadas e determinou-se a relação entre as porções fosforilada e total de NF $\kappa$ B (p-NF $\kappa$ B / NF $\kappa$ B). De forma geral, a suplementação de GLUT (\*\* $p < 0,0005$ ) e a desnutrição (\*  $p < 0,05$ ) modificam significativamente a expressão de p-NF $\kappa$ B em CTMct e CTMdesn. De acordo com os resultados apresentados na **Figura 10**, 0,6mM e 2mM de GLUT diminuem significativamente a fosforilação do NF $\kappa$ B em CTMdes em relação aos seu controle (**Figura 10; Tabela 8**).



**Figura 10.** Expressão e quantificação de NFκB total e fosforilado em CTMs. Resultados da expressão e quantificação de NFκB em CTMct (n=3) e CTMdesn (n=3) cultivadas com 0, 0,6, 2 e 10mM de GLUT. A razão entre a porção fosforilada e a total é representada pela média ± desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos tratados com diferentes concentrações de GLUT. *n* representa o número de animais avaliados.

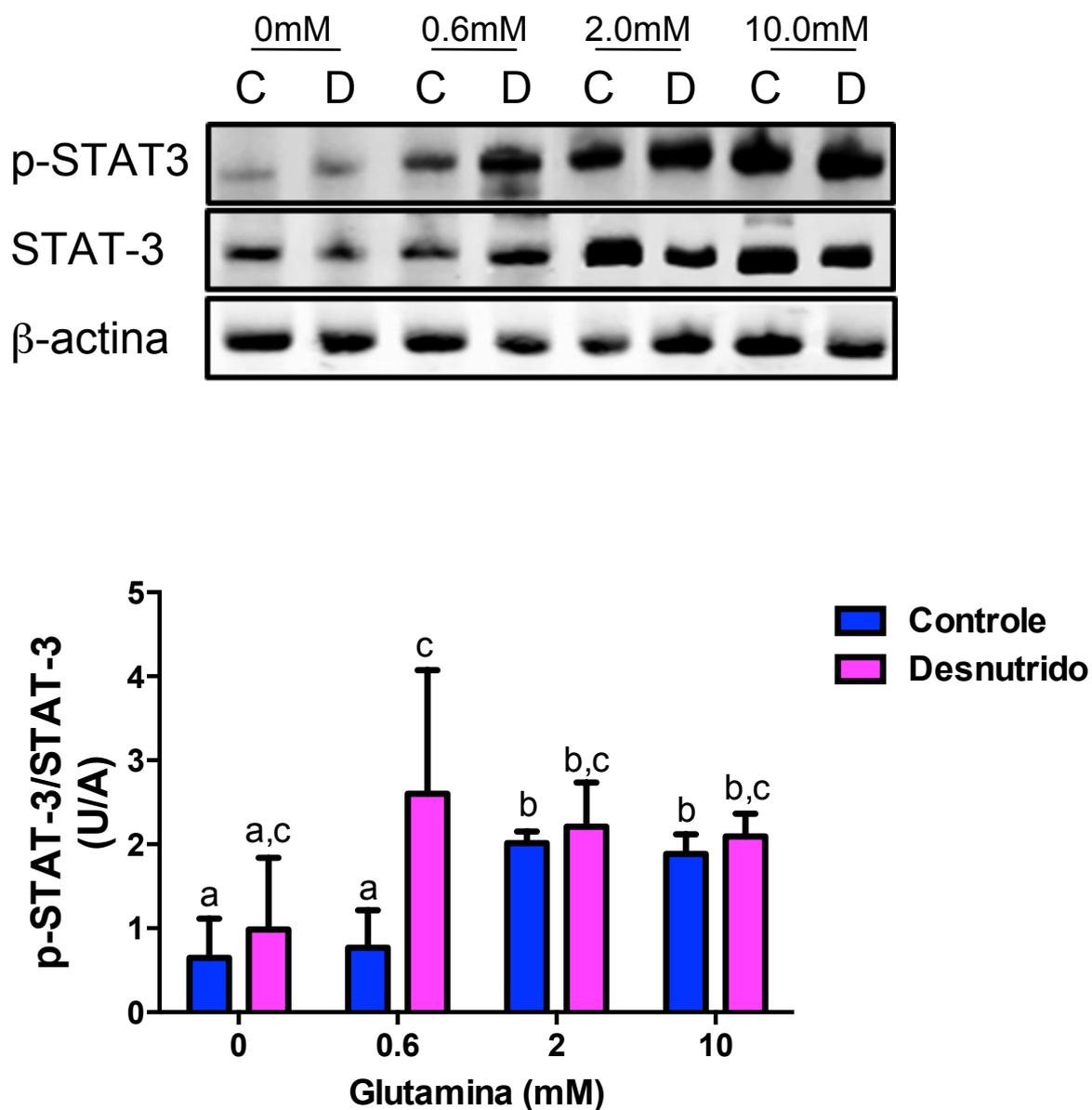
**Tabela 8.** Valores comparativos da razão da expressão de NFκB total e fosforilado em CTMct e CTMdesn

GLUT (mM)	Controle (n = 3)	Desnutrido (n = 3)
0	1,29 ± 0,71	1,34 ± 0,89
0,6mM	2,25 ± 0,44	1,21 ± 0,15*
2mM	1,19 ± 0,19	0,25 ± 0,19**
10mM	0,29 ± 0,36	0,19 ± 0,29

**Tabela 8.** Valores comparativos da razão da expressão de NFκB total e fosforilado em CTMct e CTMdesn. Resultados representados pela média ± desvio padrão da média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

#### 4.10.2 Influência da GLUT sobre a expressão de STAT-3 total e fosforilado em CTMct e CTMdesn

A **Figura 11** mostra o efeito de diferentes concentrações de GLUT (0, 0,6, 2 e 10mM) sobre a expressão de STAT-3 total e fosforilado em CTMct e CTMdesn. As bandas foram quantificadas e determinou-se a relação entre as porções fosforilada e total de STAT-3 ( $p$ -STAT3 / STAT3). De forma geral, a suplementação de GLUT (\*  $p < 0,05$ ) e a desnutrição (\*  $p < 0,05$ ) modificam significativamente a expressão de  $p$ -STAT3 em CTMct e CTMdesn. De acordo com os resultados apresentados na **Figura 11**, 0,6mM de GLUT aumenta significativamente a fosforilação do STAT-3 em CTMdes em relação aos seu controle (**Figura 11; Tabela 9**).



**Figura 11.** Expressão e quantificação de STAT-3 total e fosforilado em CTMs. Resultados da expressão e quantificação de Stat-3 total e fosforilado em CTMct (n=3) e CTMdesn (n=3) cultivadas com 0, 0,6, 2 e 10mm de GLUT. A razão entre a porção fosforilada e a total é representada pela média  $\pm$  desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos tratados com diferentes concentrações de GLUT. *n* representa o número de animais avaliados.

**Tabela 9.** Valores comparativos da razão da expressão de STAT-3 total e fosforilado em CTMct e CTMdesn

GLUT (mM)	Controle (n = 3)	Desnutrido (n = 3)
0	0,65 ± 0,47	0,98 ± 0,85
0,6mM	0,77 ± 0,45	2,12 ± 0,72*
2mM	2,01 ± 0,14	2,2 ± 0,52
10mM	1,88 ± 0,23	2,09 ± 0,27

**Tabela 9.** Valores comparativos da razão da expressão de STAT-3 total e fosforilado em CTMct (n=3) e CTMdesn (n=3). Resultados representados pela média ± desvio padrão da média, \*  $p < 0,05$ . *n* representa o número de animais avaliados.

#### 4.11 INFLUÊNCIA DA GLUT SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELAS CTMs

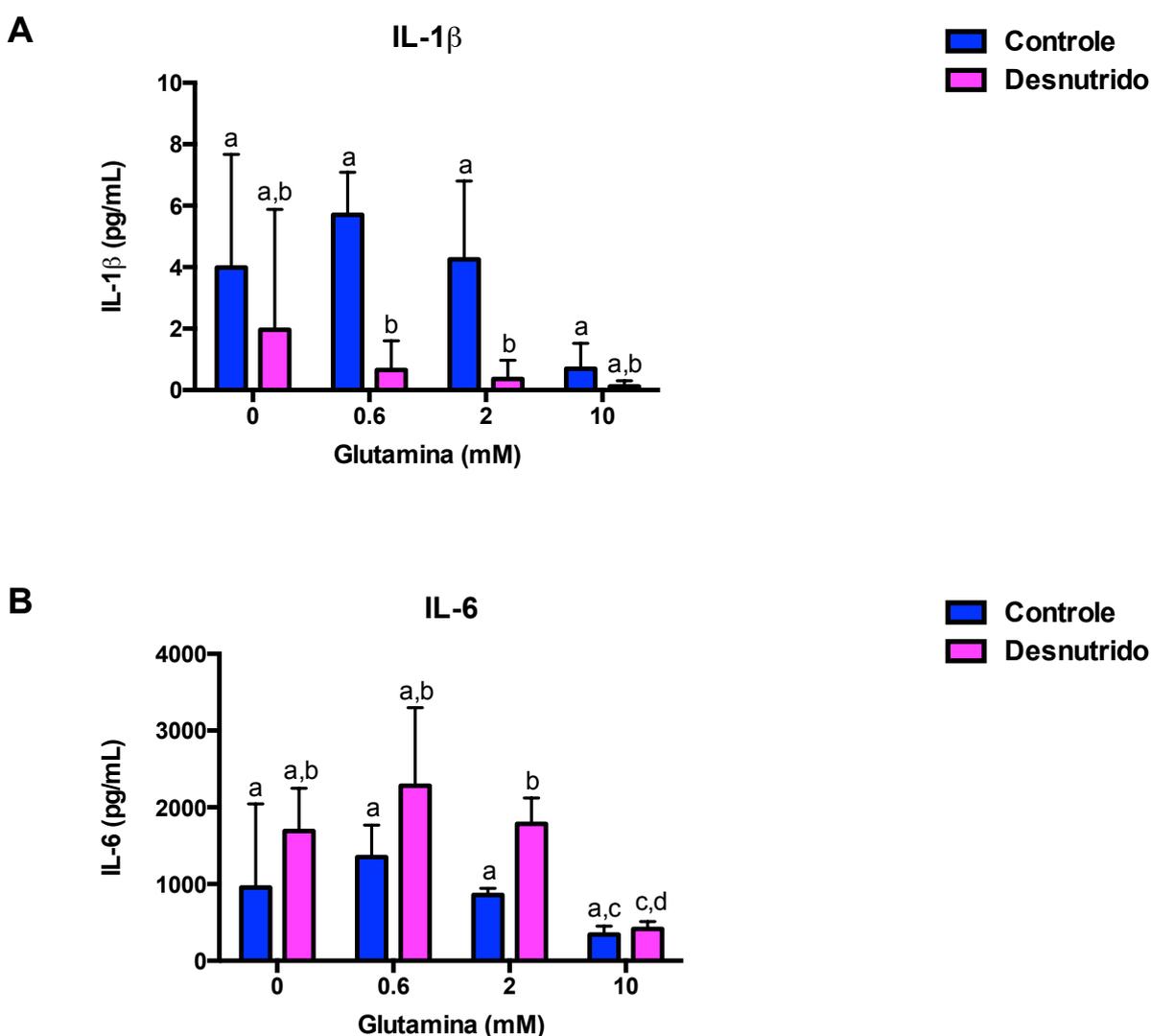
CTMct e CTMdes foram cultivadas em diferentes concentrações de GLUT (0, 0,6, 2 e 10 mM) por 14 dias. Após esse período, estimulou-se essas células com LPS e determinou-se a produção de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  pelas mesmas. As CTMs de ambos os grupos produzem IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  em níveis detectáveis (**Gráficos 10, 11 e 12**). Por outro lado, IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4 e TNF- $\alpha$  não foram detectadas nos sobrenadantes de CTMs provenientes dos dois grupos.

As CTMdes produziram quantidades significativamente menores de IL-1 $\beta$  quando suplementadas com 0,6 e 2 mM de GLUT em relação aos seus respectivos controles (**Gráfico 10A**). As CTMdes cultivadas na ausência de GLUT produziram significativamente mais IL-6 do que quando cultivadas com 10 mM desse aminoácido. Por outro lado, quando suplementadas com 2 mM de GLUT, essas células aumentaram significativamente sua produção de IL-6 (**Gráfico 10B**).

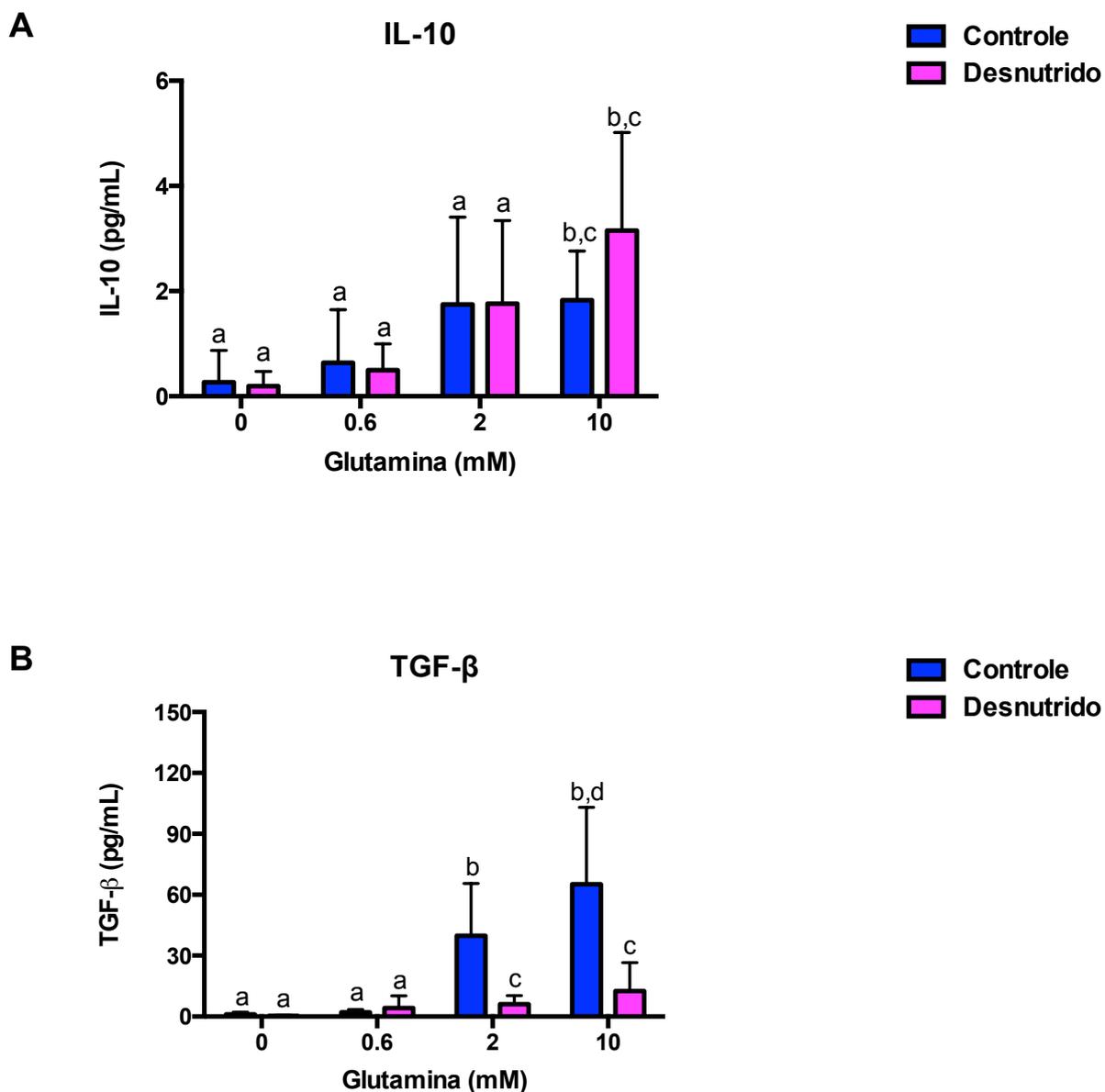
As CTM de ambos os grupos cultivadas na ausência de GLUT aumentam significativamente a sua produção de IL-10 quando cultivadas com 10 mM desse aminoácido (**Gráfico 11A**). As CTMct produziram significativamente mais TGF- $\beta$  quando cultivadas com 2 mM e 10 mM de GLUT em comparação a quando foram cultivadas na ausência desse aminoácido. As CTMdesn aumentaram significativamente a produção dessa citocina somente quando cultivadas com 2 mM

de GLUT. Além disso, a DPE diminuiu significativamente a produção de TGF- $\beta$ , evidenciado quando as CTMdesn foram cultivadas com 2 mM e 10 mM desse aminoácido (**Gráfico 11B**). A GLUT e a DPE não foram capazes de alterar de forma significativa a produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  pelas CTMs provenientes dos grupos controle e desnutrido (**Gráficos 12A e 12B**).

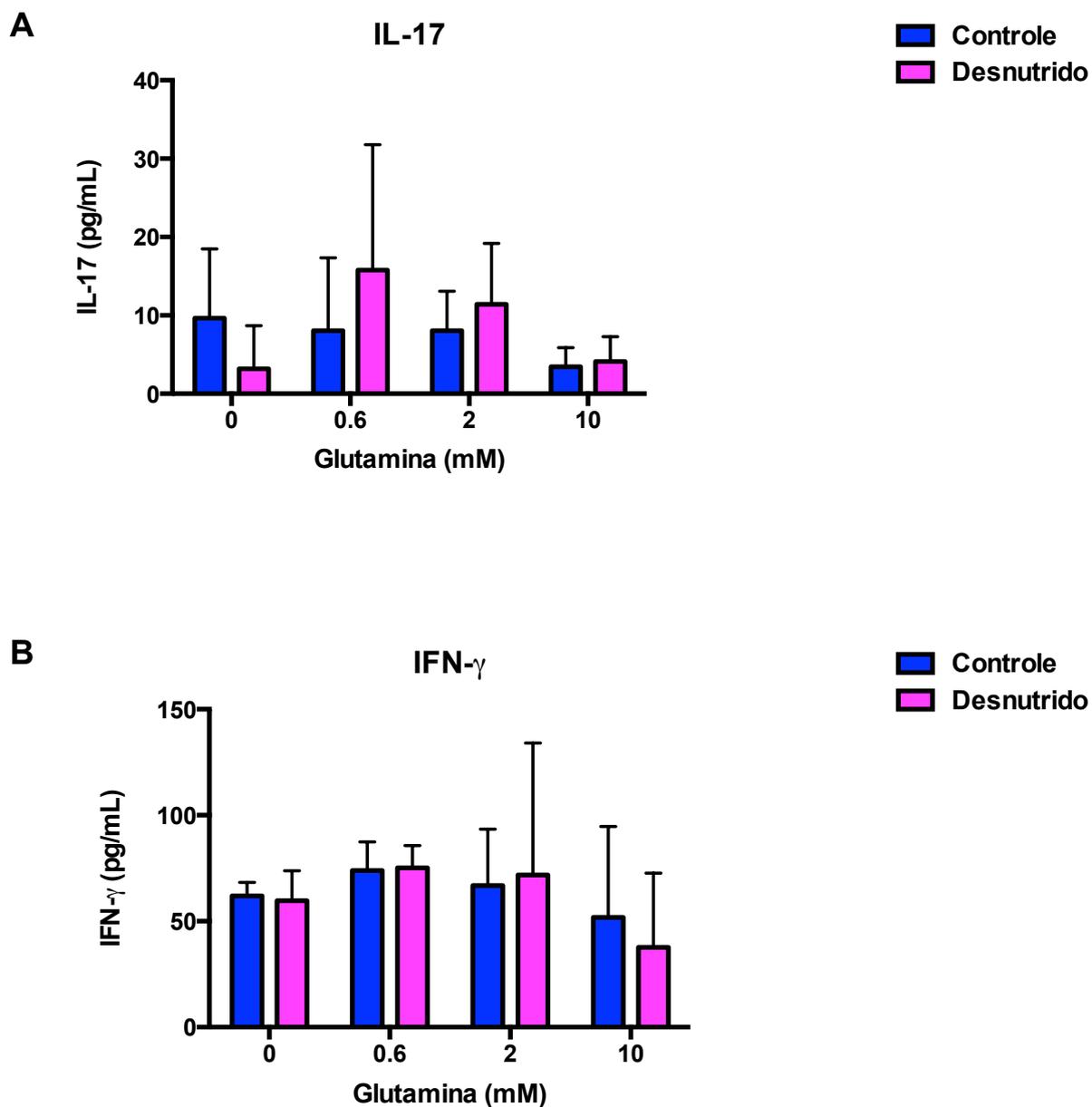
A **Tabela 10** apresenta as concentrações de GLUT capazes de alterar significativamente a produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$  em CTMs obtidas dos dois grupos.



**Gráfico 10.** Produção de IL-1 $\beta$  e IL-6 por CTMct e CTMdesn em diferentes concentrações de GLUT. Resultados da produção de (A) IL-1 $\beta$  e (B) IL-6 por CTMct (n=5) e CTMdesn (n=5) cultivadas com 0, 0,6, 2 e 10mM de GLUT, expressa pela média  $\pm$  desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos. *n* representa o número de animais avaliados.



**Gráfico 11.** Produção de IL-10 e TGF- $\beta$  por CTMct e CTMdesn em diferentes concentrações de GLUT. Resultados da produção de (A) IL-10 e (B) TGF- $\beta$  por CTMct ( $n=5$ ) e CTMdesn ( $n=5$ ) cultivadas com 0, 0,6, 2 e 10mM de GLUT, expressa pela média  $\pm$  desvio padrão da média. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos.  $n$  representa o número de animais avaliados.



**Gráfico 12.** Produção de IL-17 e IFN- $\gamma$  por CTMct e CTMdesn em diferentes concentrações de GLUT. Resultados da produção de (A) IL-17 e (B) IFN- $\gamma$  por CTMct ( $n=5$ ) e CTMdesn ( $n=5$ ) cultivadas com 0, 0,6, 2 e 10mM de GLUT, expressa pela média  $\pm$  desvio padrão da média,  $p>0,05$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

**Tabela 10.** Produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  por CTMs em diferentes concentrações de GLUT

Citocina	[GLUT]	Controle (n = 5)	Desnutrido (n = 5)
IL-1 $\beta$	0,6mM	5,70 $\pm$ 1,38	0,65 $\pm$ 0,95***
	2mM	4,25 $\pm$ 2,55	0,36 $\pm$ 0,61*
IL-6	2mM	859,3 $\pm$ 86,51	1785 $\pm$ 337,6**
	0mM $\rightarrow$ 10mM	---	*
IL-10	0mM $\rightarrow$ 10mM	*	*
TGF- $\beta$	2mM	39,85 $\pm$ 26,15	4,85 $\pm$ 4,54*
	10mM	65,23 $\pm$ 37,83	12,58 $\pm$ 13,49*
	0mM $\rightarrow$ 2mM	*	*
	0mM $\rightarrow$ 10mM	*	---

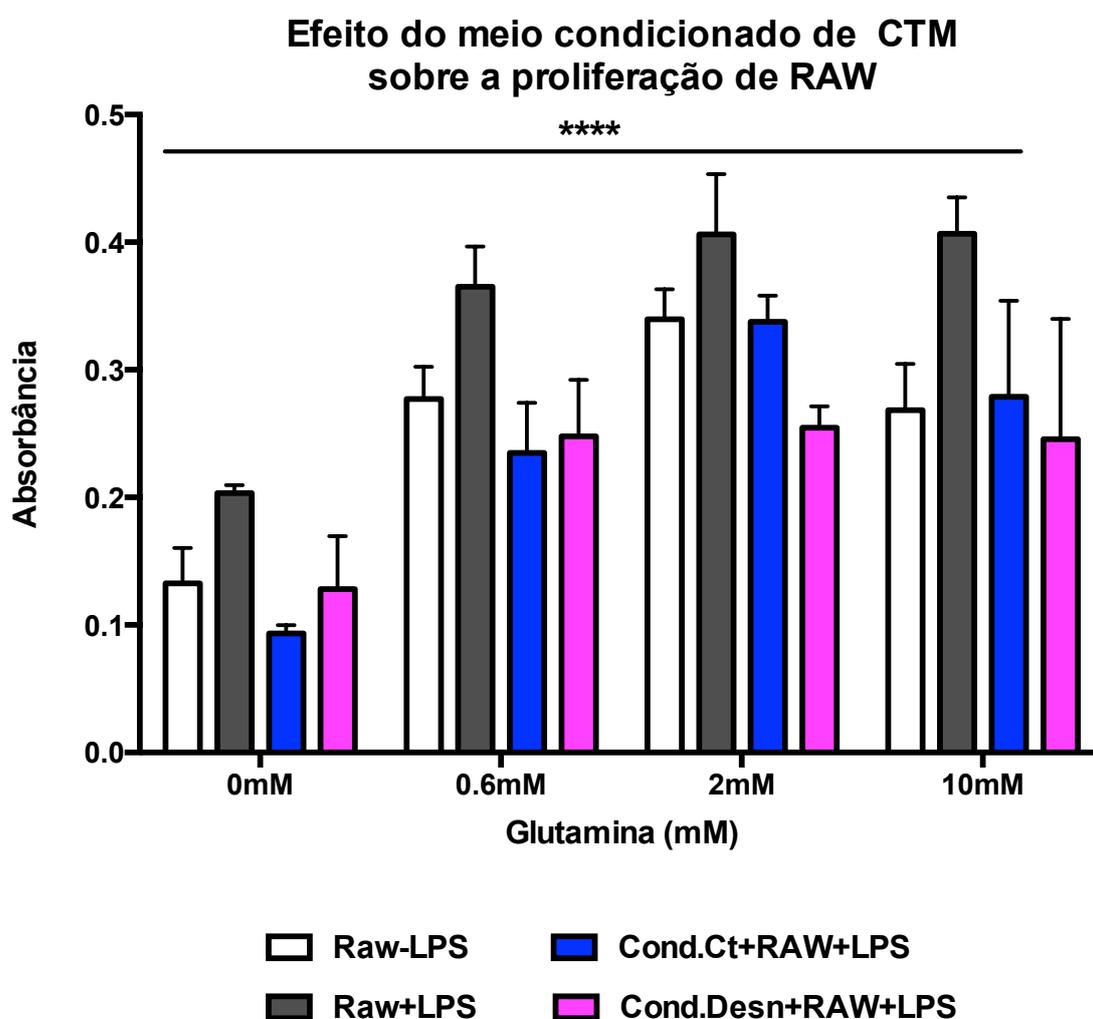
**Tabela 10.** Produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  por CTMs em diferentes concentrações de GLUT. Valores comparativos da produção de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TGF- $\beta$  por CTMct (n=5) e CTMdesn (n=5), representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ .  $n$  representa o número de animais avaliados.

#### 4.12 INFLUÊNCIA DO MEIO CONDICIONADO DE CTMs SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE MACRÓFAGOS DA LINHAGEM RAW 264,7 E SUA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Macrófagos da linhagem Raw 264,7 foram cultivados no meio condicionado de CTMs e estimulados com LPS por 3 dias. Após esse período, avaliou-se a proliferação dessas células por MTT, bem como sua produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  por ELISA.

De acordo com o **Gráfico 13**, os macrófagos cultivados com e sem LPS tiveram sua proliferação significativamente aumentada quando cultivados com 0,6 mM, 2 mM e 10 mM de GLUT em comparação aos cultivados na ausência desse aminoácido. O estímulo com LPS acarretou um aumento significativo na proliferação de macrófagos cultivados em todas as concentrações de GLUT testadas em relação àqueles cultivados sem LPS. Os meios condicionados CTMct 0,6, 2 e 10 mM GLUT aumentaram a proliferação de macrófagos de forma

significativa em relação aos cultivados com meio CTMct 0 mM GLUT. Os meios condicionados CTMdesn 0,6 e 2 mM GLUT aumentaram a proliferação dessas células de forma significativa em relação aos cultivados com meio CTMdesn 0 mM GLUT. Os macrófagos cultivados com CTMct/desn 0 mM GLUT, CTMct/desn 0,6 mM GLUT e CTMdesn 2 mM GLUT proliferaram significativamente menos quando comparados àqueles cultivados na ausência de meio condicionado nas mesmas concentrações de GLUT. O meio condicionado CTMdesn 2 mM GLUT diminuiu de forma significativa a proliferação dessas células em comparação ao meio CTMct 2 mM GLUT. A **Tabela 11** apresenta as condições de cultura de RAW capazes de afetar de forma significativa a sua proliferação.



**Gráfico 13.** Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a proliferação de macrófagos da linhagem Raw 264,7. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Tabela 11.** Proliferação de macrófagos Raw 264,7 em meio condicionado de CTMs

Condição de cultura	[GLUT]	<i>p</i>
(-) LPS	0mM → 0,6mM	**
	0mM → 2mM	***
	0mM → 10mM	***
(+) LPS	0mM → 0,6mM	***
	0mM → 2mM	***
	0mM → 10mM	***
(-) LPS / (+) LPS	0mM	*
	0,6mM	*
	2mM	*
	10mM	**
(+) LPS / Cond. CT	0mM → 0,6mM	**
	0mM → 2mM	**
	0mM → 10mM	*
	0,6mM → 2mM	*
(+) LPS / Cond. DESN	0mM → 0,6mM	*
	0mM → 2mM	**
Cond. CT / Cond. DESN	2mM	**

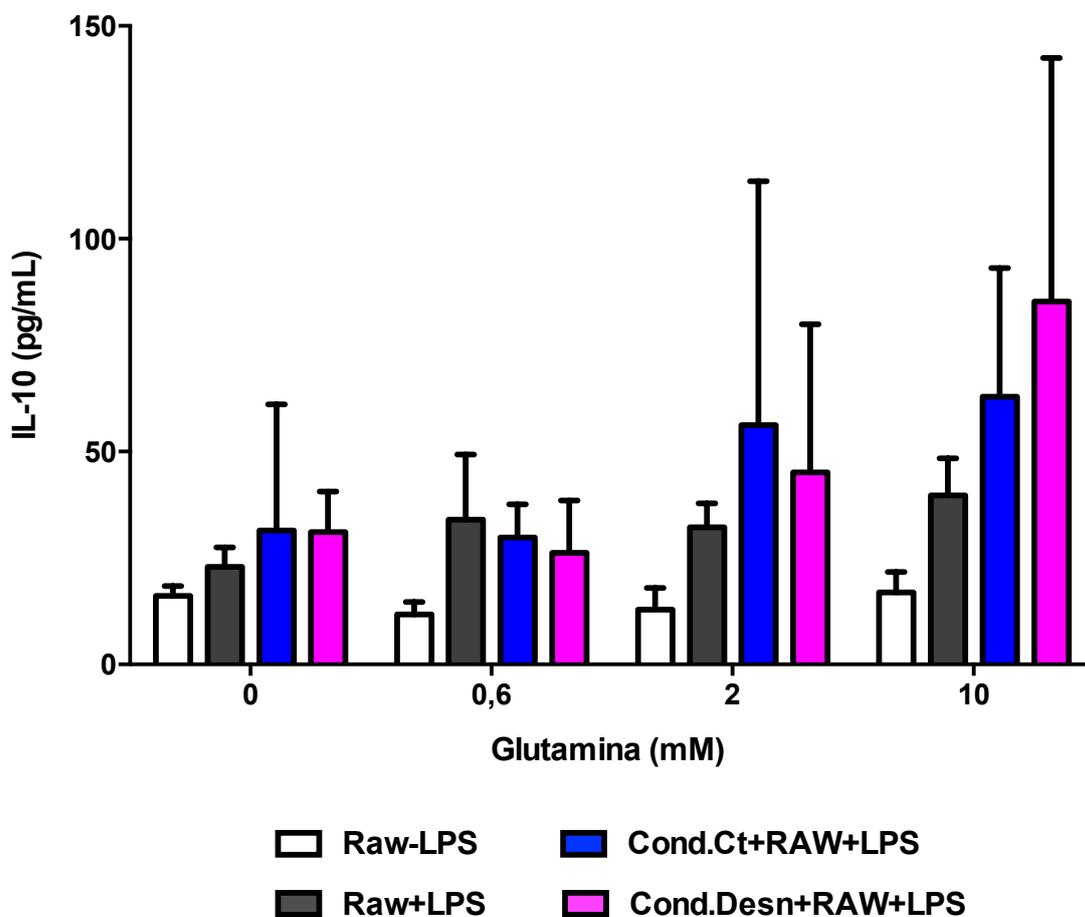
**Tabela 11.** Proliferação de macrófagos Raw 264,7 em meio condicionado de CTMs. Condições de cultura de macrófagos da linhagem Raw 264,7 que induziram diferenças estatisticamente significativas na proliferação dessas células. Valores significativos para  $p < 0,05$ , sendo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ .

Macrófagos da linhagem Raw 264,7 foram cultivados nos meios condicionados de CTMs e estimulados com LPS por 3 dias. Após esse período, avaliou-se a produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  por essas células (**Gráfico 14; Tabela 12**).

Conforme o **Gráfico 14**, os macrófagos estimulados com LPS e cultivados em 2 mM e 10 mM de GLUT produziram IL-10 em quantidades significativamente maiores em relação àqueles estimulados e cultivados em 0 e 0,6 mM desse aminoácido. O LPS aumentou significativamente a produção de IL-10 por

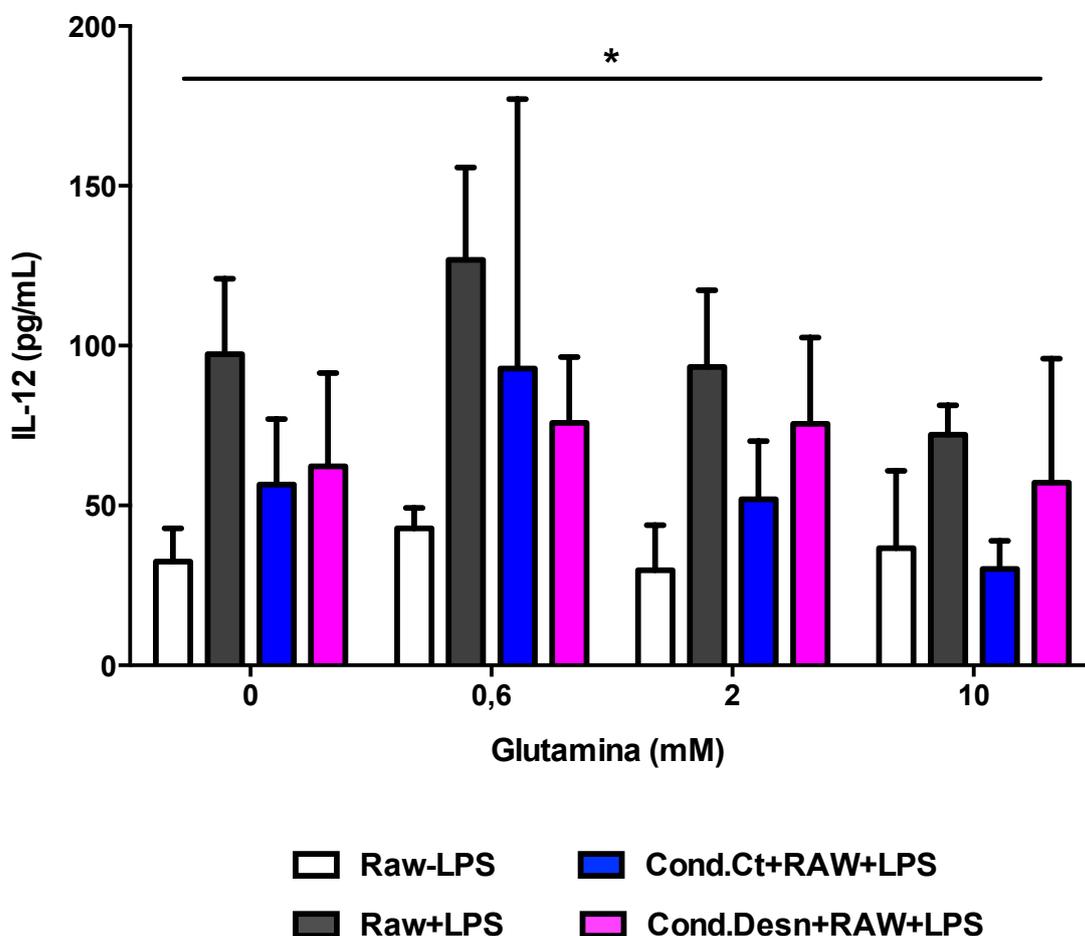
macrófagos estimulados em comparação aos não estimulados somente quando foram cultivados em 2 mM e 10 mM de GLUT. Nenhum dos meios condicionados de CTMct e CTMdesn testados alteraram de forma significativa a produção de IL-10 por macrófagos estimulados com LPS.

### Efeito do meio condicionado de CTM sobre a produção de IL-10 por RAW



**Gráfico 14.** Efeito do meio condicionado de CTM sobre a produção de IL-10 por macrófagos Raw 264,7. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes,  $p > 0,05$ .

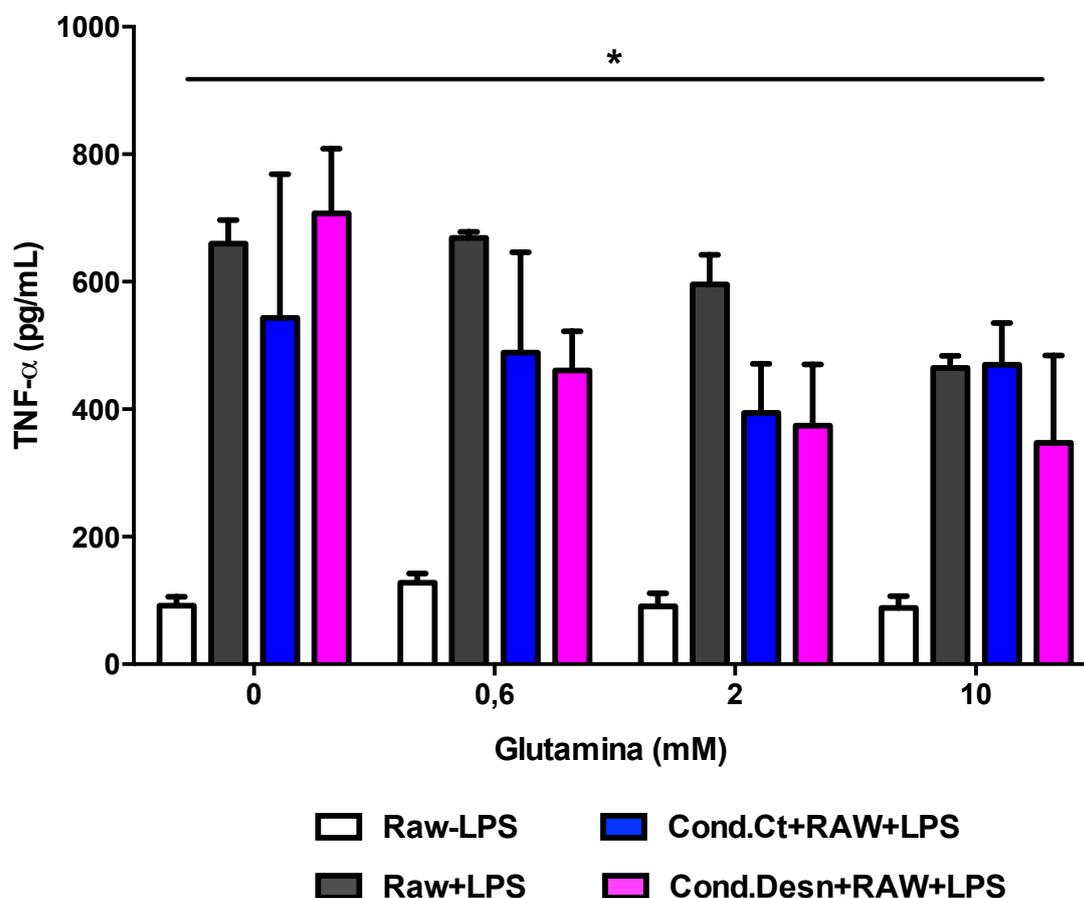
### Efeito do meio condicionado de CTM sobre a produção de IL-12 por RAW



**Gráfico 15.** Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a produção de IL-12 por macrófagos Raw 264,7. Resultados representados a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes, \*  $p < 0,05$ .

De acordo com o **Gráfico 16**, os macrófagos que receberam o estímulo com LPS produziram uma quantidade significativamente maior de IL-12, em relação àqueles não estimulados, somente quando cultivados com 0 mM, 0,6 mM e 2 mM de GLUT. O meio condicionado CTMct 10 mM GLUT induziu uma redução significativa na produção dessa citocina em comparação aos macrófagos cultivados na mesma concentração de GLUT, porém na ausência do meio condicionado.

### Efeito do meio condicionado de CTM sobre a produção de TNF- $\alpha$ por RAW



**Gráfico 16.** Efeito do meio condicionado de CTM sobre a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos Raw 264,7. Resultados representam a média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes, \*  $p < 0,05$ .

Em macrófagos não estimulados, notou-se maior produção de TNF- $\alpha$  quando cultivados em 0,6 mM de GLUT em relação às outras concentrações testadas (**Gráfico 16**). O estímulo com LPS aumentou de forma significativa a produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos cultivados em todas as concentrações de GLUT testadas. Entretanto, a produção dessa citocina pelas Raw estimuladas com LPS foi significativamente menor quando cultivados em 10 mM de GLUT.

O meio CTMct 2 mM GLUT foi o único dos meios condicionados obtidos de CTMct que reduziu significativamente a produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos estimulados com LPS. Os meios CTMdes 0,6 mM GLUT e CTMdesn 2 mM GLUT

induziram uma redução significativa na produção de TNF- $\alpha$  por macrófagos em relação àqueles cultivados nestas mesmas concentrações de GLUT, porém na ausência do meio condicionado.

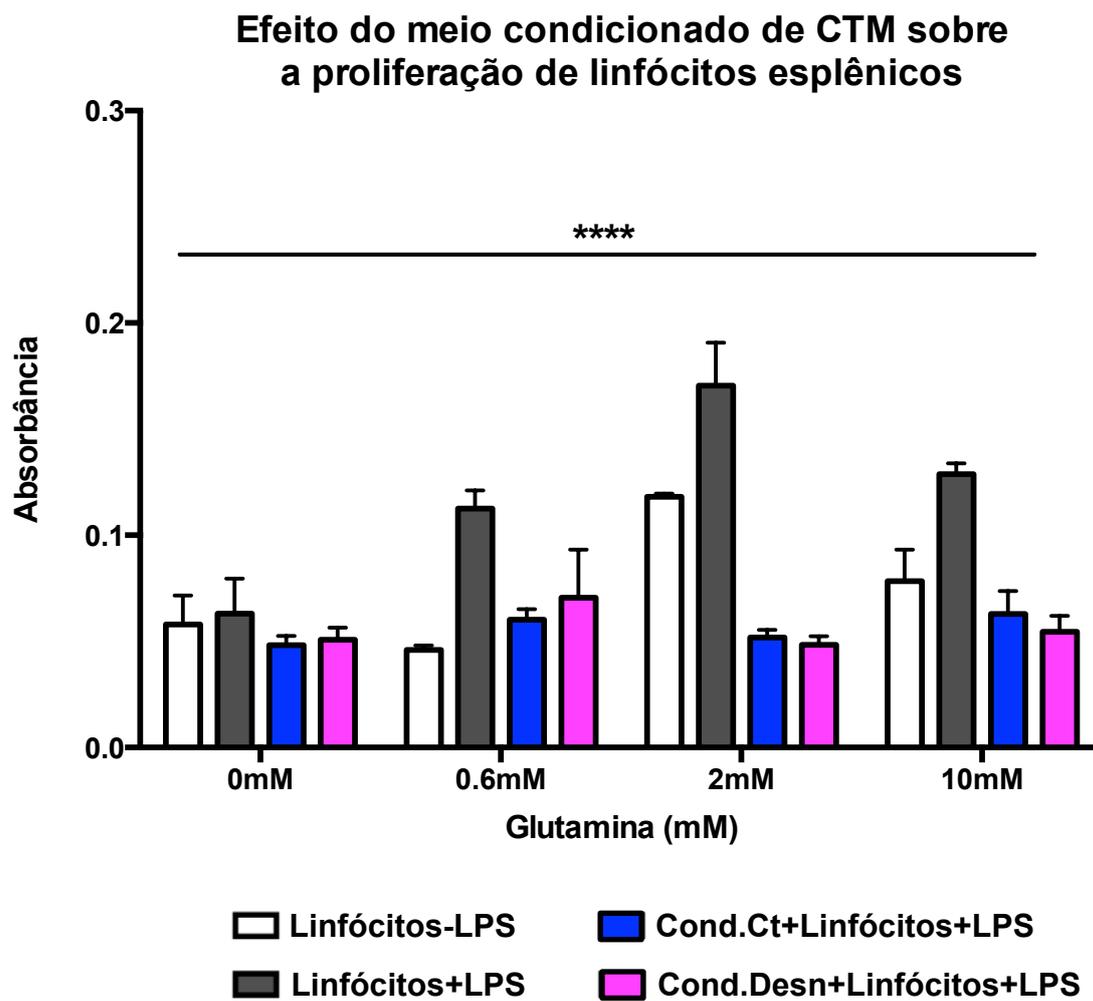
**Tabela 12.** Produção de IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos Raw 264,7 em meio condicionado de CTMs

Citocina	Condição de cultura	[GLUT]	<i>p</i>	
IL-10	(+) LPS	0mM → 2mM	*	
		0mM → 10mM	*	
	(-) LPS / (+) LPS	2mM	*	
		10mM	*	
IL-12	(-) LPS / (+) LPS	0mM	*	
		0,6mM	**	
		2mM	*	
	(+) LPS / Cond. CT	10mM	**	
TNF- $\alpha$	(-) LPS	0mM → 0,6mM	*	
		(+) LPS	0mM → 10mM	**
	(+) LPS	0,6mM → 10mM	****	
		2mM → 10mM	*	
		(-) LPS / (+) LPS	0mM	****
			0,6mM	****
	2mM		****	
	10mM		****	
	(+) LPS / Cond. CT	2mM	*	
	(+) LPS / Cond.	0,6mM	**	
DESN	2mM	*		

**Tabela 12.** Produção de IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos Raw 264,7 em meio condicionado de CTMs. Condições de cultura de macrófagos da linhagem Raw 264,7 que induziram diferenças estatisticamente significativas na produção de IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  por essas células. Valores significativos para  $p < 0,05$ , sendo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

#### 4.13 INFLUÊNCIA DO MEIO CONDICIONADO DE CTMs SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS ESPLÊNICOS E SUA PRODUÇÃO DE CITOCINAS

De acordo com o **Gráfico 17**, os linfócitos esplênicos não estimulados com LPS e cultivados em 2 mM de GLUT apresentaram proliferação significativamente maior do que os cultivados sem estímulo e nas outras concentrações desse aminoácido. Os linfócitos estimulados com LPS proliferaram de forma significativamente maior quando cultivados em 0,6 mM, 2 mM e 10 mM de GLUT em relação àqueles também estimulados, porém cultivados na ausência desse aminoácido. Além disso, a proliferação dessas células foi significativamente maior quando estimuladas e cultivadas em 0,6 mM, 2 mM e 10 mM de GLUT em comparação àquelas cultivadas na ausência de estímulo. Houve uma diminuição significativa na proliferação dos linfócitos esplênicos estimulados e cultivados com CTMct 0,6 mM GLUT, CTMct 2 mM GLUT e CTMct 10 mM GLUT em relação aos seus respectivos controles, os quais também receberam o estímulo, porém foram cultivados na ausência do meio condicionado. O mesmo foi observado quando cultivou-se linfócitos esplênicos estimulados com CTMdesn 2 mM GLUT e CTMdesn 10 mM GLUT. Não houve diferença significativa na proliferação de linfócitos cultivados com CTMct 0, 0,6, 2 e 10 mM GLUT em relação aos cultivados com CTMdesn 0, 0,6, 2 e 10 mM GLUT. A **Tabela 13** apresenta as condições de cultura dos linfócitos capazes de afetar de forma significativa a sua proliferação.



**Gráfico 17.** Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a proliferação de linfócitos esplênicos. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

**Tabela 13.** Proliferação de linfócitos esplênicos em meio condicionado de CTMs

Condição de cultura	[GLUT]	<i>p</i>
(-) LPS	0mM → 2mM	**
(+) LPS	0mM → 0,6mM	*
	0mM → 2mM	**
	0mM → 10mM	*
(-) LPS / (+) LPS	0,6mM	**
	2mM	*
	10mM	*
(+) LPS / Cond. CT	0,6mM	***
	2mM	***
	10mM	*
(+) LPS / Cond. DESN	2mM	***
	10mM	**

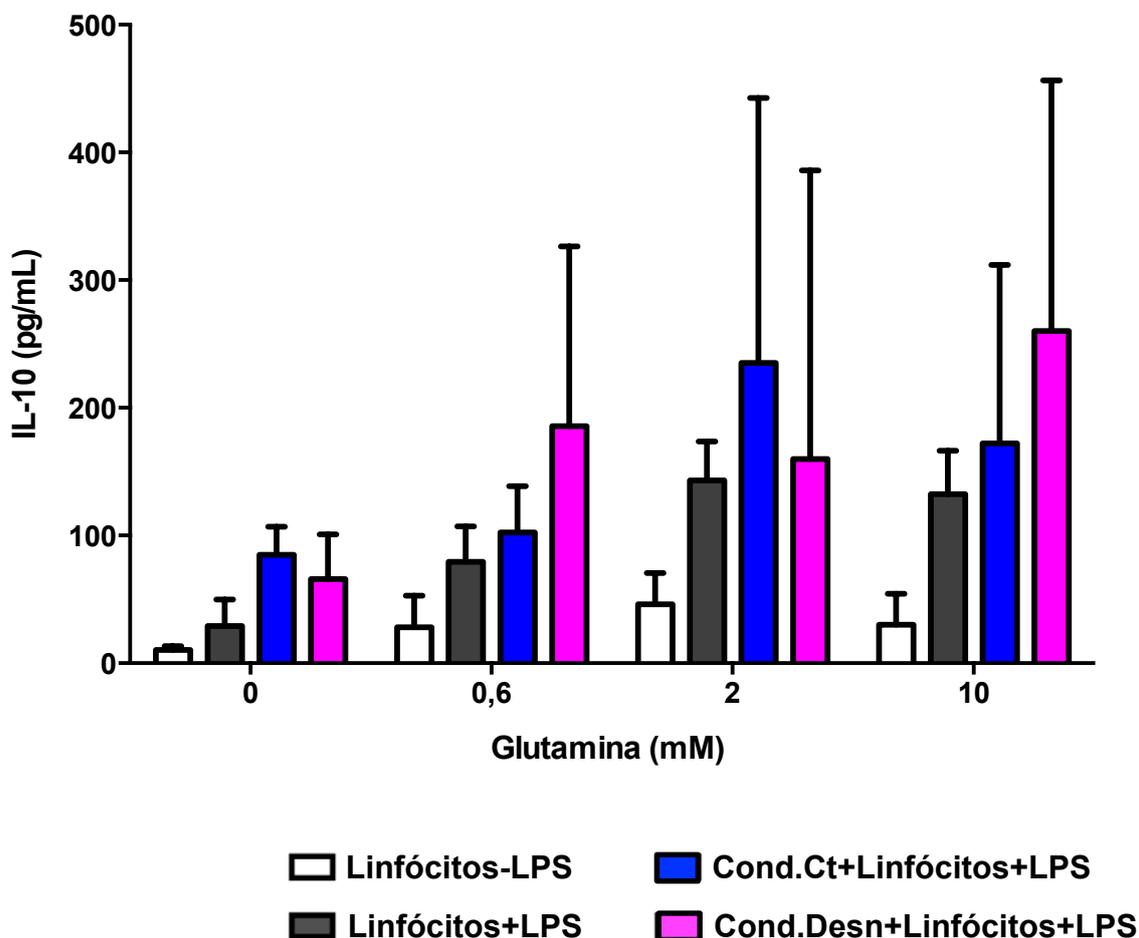
**Tabela 13.** Proliferação de linfócitos esplênicos em meio condicionado de CTMs. Condições de cultura de linfócitos esplênicos que induziram diferenças estatisticamente significativas na proliferação dessas células, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,0005$ .

Os linfócitos esplênicos foram cultivados nos meios condicionados de CTMs e estimulados com LPS por 3 dias. Após esse período, avaliou-se a produção das citocinas IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$  por essas células (**Gráficos 18, 19 e 20; Tabela 14**).

De acordo com o **Gráfico 18**, as concentrações de GLUT testadas não influenciaram na produção de IL-10 pelos linfócitos esplênicos não estimulados com LPS. Já os linfócitos esplênicos estimulados com LPS e cultivados em 2 mM e 10 mM de GLUT produziram IL-10 em quantidades significativamente maiores em relação àqueles estimulados e cultivados em 0 e 0,6 mM desse aminoácido. Além disso, os linfócitos esplênicos estimulados com LPS e cultivados em 2 mM e 10 mM de GLUT também produziram uma quantidade significativamente de IL-10 em relação àqueles não estimulados e cultivados nestas mesmas concentrações deste aminoácido.

Em relação ao efeito dos meios condicionados obtidos de CTMct sobre a produção de IL-10 pelos os linfócitos esplênicos estimulados com LPS, observou-se um aumento significativo na sua secreção apenas quando cultivadas em 0 mM GLUT, sendo esta a única concentração a ter efeito sobre a produção desta citocina. Já os meios CTMdes 0, 0,6, 2 e 10 mM GLUT não apresentaram efeito na produção de IL-10 em relação aos seus respectivos controles (Linfócitos esplênicos + LPS) (**Gráfico 18**).

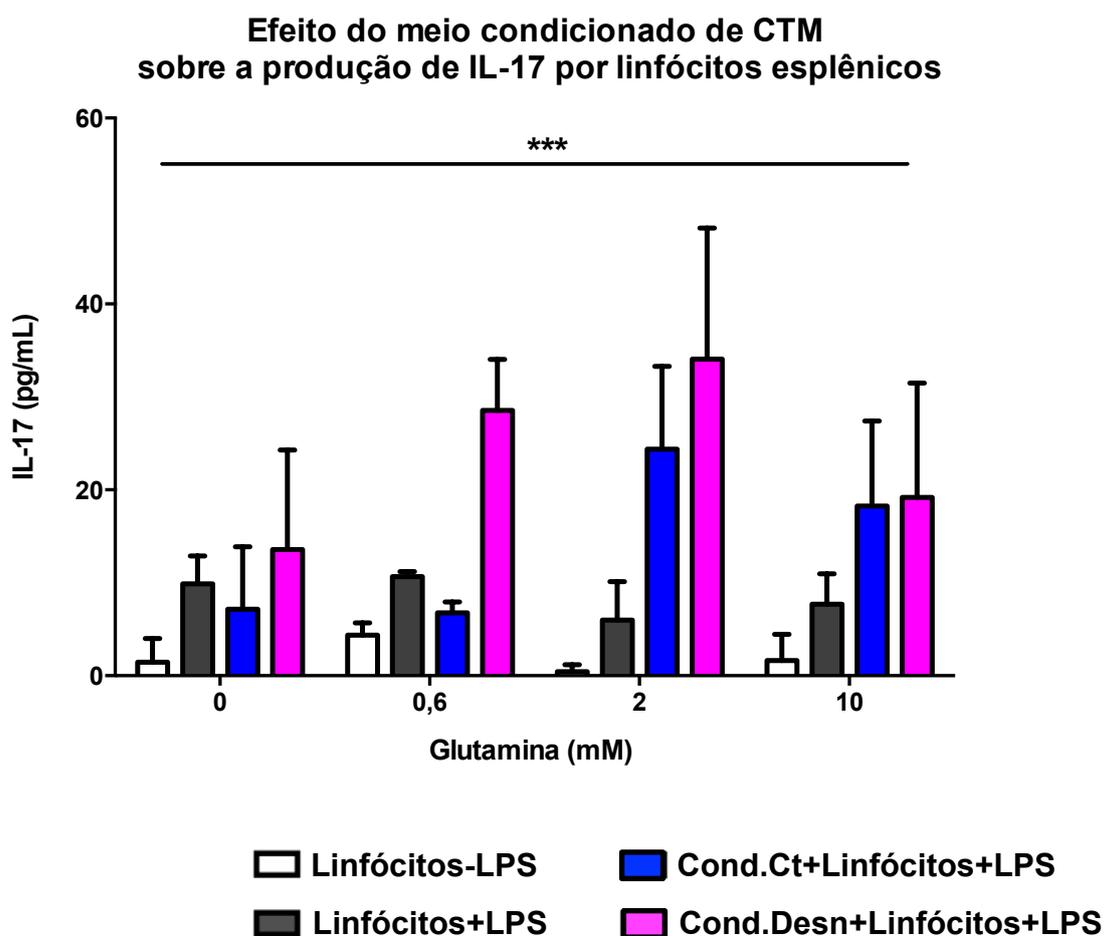
### Efeito do meio condicionado de CTM sobre a produção de IL-10 por esplenócitos



**Gráfico 18.** Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a produção de IL-10 por linfócitos esplênicos. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes,  $p > 0,05$ .

De acordo com o **Gráfico 19**, os linfócitos esplênicos estimulados com LPS apresentaram um aumento significativo na produção de IL-17 em relação àqueles não estimulados. Observou-se uma diminuição significativa na produção de IL-17 por essas células quando cultivadas no meio CTMct 0,6 mM GLUT. Por outro lado, o meio CTMct 2 mM GLUT aumentou significativamente a produção dessa citocina.

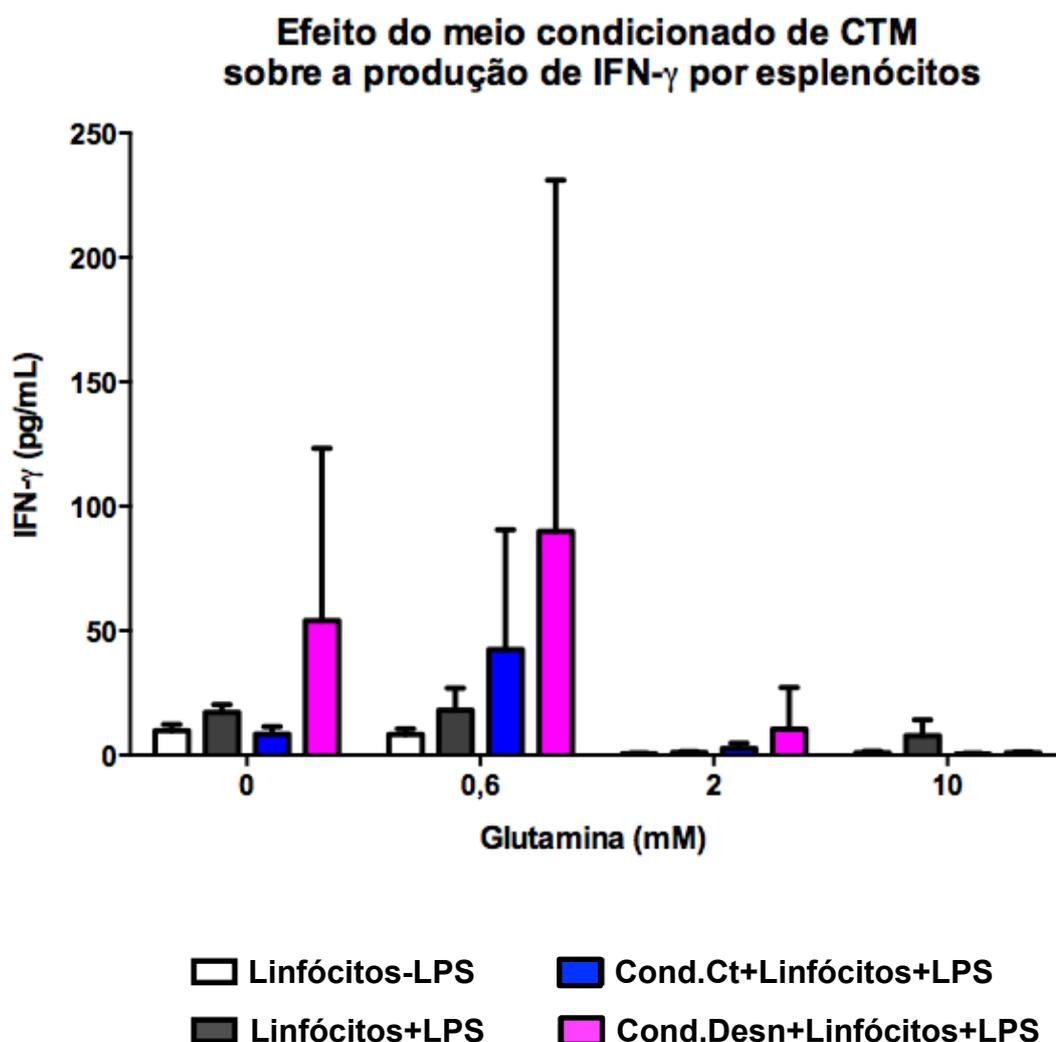
Os linfócitos esplênicos estimulados com LPS e cultivados nos meios CTMdesn 0,6 e 2 mM GLUT produziram uma quantidade significativamente maior de IL-17 em relação aos seus respectivos controles (Linfócitos esplênicos + LPS + 0,6 e 2 mM GLUT). Adicionalmente, observou-se que essas células, quando cultivadas no meio CTMdesn 0,6 mM GLUT, produziram mais IL-17 que as células cultivadas com CTMct 0,6 mM GLUT (**Gráfico 19**).



**Gráfico 19.** Efeito do meio condicionado de CTMs sobre a produção de IL-17 por linfócitos esplênicos. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes, \*\*\*  $p < 0,0005$ .

Observou-se uma menor produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos esplênicos não estimulados e cultivados em 2 mM e 10 mM de GLUT em relação àqueles cultivados em 0 e em 0,6 mM desse aminoácido (**Gráfico 20**). O estímulo com LPS gerou um aumento na produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos esplênicos apenas quando cultivados em 0 mM GLUT.

Dentre os meios CTMct testados, o único que reduziu a produção de IFN- $\gamma$  em relação ao seu controle foi o meio CTMct 0 mM GLUT. Nesta mesma concentração, pode-se observar um aumento significativo na produção de IFN- $\gamma$  pelos linfócitos esplênicos estimulados com LPS e cultivados com meio CTMdesn em relação aos cultivados com meio CTMct.



**Gráfico 20.** Efeito do meio condicionado de CTM sobre a produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos esplênicos. Resultados representados pela média  $\pm$  desvio padrão da média de 3 experimentos independentes,  $p > 0,05$ .

**Tabela 14.** Produção de IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$  por linfócitos esplênicos em meio condicionado de CTMs

	Condição de cultura	[GLUT]	p
<b>Citocina</b>			
IL-10	(+) LPS	0mM $\rightarrow$ 2mM	**
		0mM $\rightarrow$ 10mM	*
	(-) LPS / (+) LPS	2mM	*
		10mM	*
	(+) LPS / Cond. CT	0mM	*
IL-17	(-) LPS / (+) LPS	0mM	*
		0,6mM	**
		2mM	*
		10mM	*
	(+) LPS / Cond. CT	0,6mM	**
		2mM	*
	(+) LPS / Cond. DESN	0,6mM	**
		2mM	*
	Cond. CT / Cond. DESN	0,6mM	**
	IFN- $\gamma$	(-) LPS	0mM $\rightarrow$ 2mM
0mM $\rightarrow$ 10mM			**
(+) LPS		0mM $\rightarrow$ 2mM	**
(-) LPS / (+) LPS		0mM	*
(+) LPS / Cond. CT		0mM	*

**Tabela 14.** Produção de IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$  por linfócitos esplênicos em meio condicionado de CTMs. Condições de cultura de linfócitos esplênicos que induziram diferenças estatisticamente significativas na produção de IL-10, IL-17 e IFN- $\gamma$  por essas células. Valores significativos para  $p < 0,05$ , sendo \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,005$ .

## 5. DISCUSSÃO

A desnutrição, em seus diversos graus, é considerada um grave problema de saúde pública que prevalece em regiões em desenvolvimento, ainda que não esteja restrita somente a estes locais (SCHOFIELD e ASHWORTH, 1996).

Apesar do Brasil apresentar índices decrescentes de desnutrição, devido a implementação de programas de combate à fome e transferência de renda, como o Programa Fome Zero e o Programa Bolsa Família, um estudo recente de Wolf e Barros Filho indica que quase 70% das famílias beneficiadas relataram um aumento no consumo de alimentos altamente calóricos, mas de baixo valor nutricional. Dessa maneira, a implantação desses programas sem a devida orientação nutricional resulta em escolhas alimentares inadequadas pela maioria dos seus beneficiários (WOLF e BARROS FILHO ADE, 2014).

A desnutrição é causada por dietas quanti ou qualitativamente inadequadas decorrentes da falta de acesso aos alimentos e de distúrbios alimentares, bem como por patologias que alteram a biodisponibilidade de nutrientes e/ou que aumentam a necessidade de aporte dos mesmos para a manutenção da homeostase do organismo (CHANDRA, 1991; WATERLOW et al., 1996).

A combinação de vários graus de privação protéica – com diversos graus de deficiência calórica total – constitui a base das modificações metabólicas que acometem o organismo na desnutrição proteico-energética (DPE) (WATERLOW et al., 1996). Caso o suprimento de nutrientes seja persistentemente menor, o organismo perde a sua capacidade adaptativa, o que pode levar a falência de tecidos e órgãos (STINNETT, 1983). Portanto, as consequências da DPE são dependentes da sua causa, intensidade, e duração (DE ANGELIS, 1986).

A DPE não causa somente consequências momentâneas para o organismo. Um menor consumo de energia e proteínas de boa qualidade pode desencadear uma série de fenômenos fisiológicos para garantir a sobrevivência, mas que são deletérios a longo prazo (COZZOLINO e COMINETTI, 2013). Por exemplo, a DPE gera uma situação de estresse no organismo, com alterações na síntese de adrenalina, noradrenalina, cortisol e hormônio adrenocorticotrófico. Estas alterações metabólicas causam malformação em vasos e provocam alterações permanentes no

metabolismo intermediário, levando à menor oxidação de gordura e danos na síntese muscular e óssea. A longo prazo, a DPE pode favorecer o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis, como diabetes, hipertensão e obesidade. De fato, existe uma correlação entre DPE na infância e obesidade na idade adulta, principalmente em mulheres (FLORENCIO et al., 2008; FERREIRA et al., 2009; COZZOLINO e COMINETTI, 2013).

O consumo adequado de nutrientes é essencial para a função adequada do sistema imunológico (CHANDRA, 1983). Em linhas gerais, a resposta imune dá-se pela síntese, expressão e secreção de compostos proteicos por células imunológicas, que, por sua vez, são originadas a partir do processo de hemopoese, e/ou ainda, pelo seu contato direto com outros tipos celulares co-localizadas às células imunológicas.

Constituintes da dieta, tanto macro quanto micronutrientes, participam da regulação do sistema imune em resposta a alterações nutricionais (CORTHESEY-THEULAZ et al., 2005). Os efeitos mais importantes da dieta sobre o organismo ocorrem a nível molecular e podem ser tanto benéficos quanto prejudiciais, envolvendo diversos órgãos em seus mais variados – e complexos – níveis de regulação (HIRSCH e EVANS, 2005). Em vista disso, uma nutrição balanceada é fundamental para uma resposta imune adequada, que é orquestrada pela fina interação dos sistemas imune inato e adaptativo.

A desnutrição compromete a resposta imune, pois provoca alterações morfofuncionais em tecidos e órgãos linfo-hemopoéticos, essenciais para ontogenia e maturação de células imunológicas, e modifica a resposta efetora de células das imunidades inata e adaptativa, aumentando assim a susceptibilidade do indivíduo desnutrido a agentes infecciosos (BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000; XAVIER et al., 2007). Portanto, a associação desnutrição-infecção é responsável pelos altos índices de morbidade e mortalidade (CHISTI et al., 2013).

O binômio desnutrição-infecção pode ser abordado sob diferentes aspectos: a desnutrição modificando os mecanismos de defesa do organismo, a infecção agravando o estado carencial previamente instalado, ou ainda, a doença desencadeando a desnutrição. A desnutrição e a infecção podem interagir de forma sinérgica, no caso de agentes infecciosos extracelulares, ou antagônica, quando esses agentes, em sua maioria intracelulares, dependem de sistemas enzimáticos e

metabólicos do hospedeiro (RODRIGUEZ et al., 2011; PAPIER et al., 2014). Conseqüentemente, a terapia nutricional pode trazer resultados benéficos ou não para o organismo dependendo do agente infeccioso.

A literatura contém inúmeros estudos sobre a DPE em seres humanos que foram desenvolvidos buscando compreender a inter-relação doença-desnutrição e, mesmo com muitas descobertas sobre o assunto, os mecanismos envolvidos em todo esse processo ainda não estão totalmente esclarecidos. A maioria dos estudos dos efeitos dos nutrientes sobre o sistema imunológico provém de modelos animais. Entretanto, a experimentação animal apresenta uma gama de situações distintas: diferença entre as espécies, isogenicidade ou não das espécies, sexo, idade, tipos e formas de desnutrição. Assim, torna-se difícil definir o modo exato pelo qual a desnutrição modula a resposta imune do organismo.

Visto que buscamos investigar a influência da L-glutamina (GLUT) sobre aspectos imunomodulatórios das CTMs, a funcionalidade do modelo experimental murino de desnutrição é de extrema importância para o êxito desse trabalho. Com a intenção de aumentar a homogeneidade dos grupos e diminuir a variabilidade genética, utilizou-se camundongos da linhagem BALB/c isogênica. Para diminuir interferências causadas por alterações hormonais características de fêmeas durante o ciclo estral, foram utilizados camundongos machos no modelo experimental. Outra característica importante é a idade destes animais, pois, tanto em animais como em humanos, ocorrem importantes modificações fisiológicas na hematopoese em função da idade. Portanto, foram utilizados camundongos adultos jovens pois estes já atingiram a maturidade hematológica. Optou-se por utilizar uma estreita faixa de idade (45-60 dias), objetivando reduzir variáveis indesejadas relativas às idades baixa ou avançada desses animais (BANNERMAN, 1983; FOCK, 2005).

Quando fornecidos pelo biotério, os camundongos foram entregues em gaioleiros, contendo mais de um animal em cada, e alimentados com ração comercial CR-1 Nuvilab® (**Anexo 2**) e água *ad libitum*. No início da adaptação, os mesmos foram transferidos para gaioleiros metabólicos onde viveram individualmente e passaram a consumir ração normoprotéica produzida *in house* (**Tabela 1**). Optou-se por substituir a ração comercial pela *in house* com o intuito de controlar de forma mais rígida a composição nutricional da ração fornecida durante a adaptação, uma vez que a ração comercial pode apresentar variações na sua

composição de acordo com o lote fabricado. O período de adaptação, que teve duração de dez dias, é essencial para ambientar os camundongos ao seu novo habitat. Como demonstrado em nossos resultados, não houve variação significativa no peso dos animais ao longo do período de adaptação, bem como no consumo de ração e consequentemente de proteína.

Após o término do período de adaptação, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos para o início da indução à desnutrição: controle e desnutrido, os quais receberam, respectivamente, ração normoproteica ou hipoproteica. Como já comentado anteriormente, as rações utilizadas são isocalóricas (3601,0 kcal/kg), diferindo apenas no teor proteico definido pela quantidade de caseína adicionada. A caseína, uma proteína com alto valor biológico, fornece em torno de 80% de fósforo, então, para que a deficiência desse sal fosse suprida na ração hipoprotéica (que contém teor mais baixo de caseína), a composição da mistura salínica foi corrigida de acordo com a porcentagem de caseína de cada lote utilizado no preparo da ração (REEVES et al., 1993). Essas rações foram produzidas em nosso laboratório considerando os teores de vitaminas, ácidos graxos e sais minerais necessários para fornecer uma dieta adequada, restringindo-se apenas a quantidade de proteína na ração hipoproteica (REEVES et al., 1993; REEVES, 1997).

O período de duração da etapa de indução à desnutrição foi definido previamente pelo nosso grupo por ensaios de padronização do modelo murino experimental de desnutrição. A variação do peso dos camundongos que receberam ração hipoprotéica ao longo de cinco ou nove semanas foi similar (dados não demonstrados) (HASTREITER, 2014). Dessa forma, optou-se por um período de desnutrição de cinco semanas por uma questão de otimização de tempo experimental. De acordo com a literatura, o período de cinco semanas para o camundongo tem grandeza semelhante a dois anos para o homem (QUINN, 2005). Por conseguinte, a desnutrição induzida no modelo experimental pode ser considerada crônica.

Ao longo do período de indução à desnutrição, o consumo de ração pelos animais que receberam ração hipoproteica (grupo desnutrido) foi significativamente menor em relação àqueles que receberam ração normoproteica (grupo controle). Consequentemente, animais desnutridos consumiram menos calorias diárias que

seus respectivos controles. Uma vez que o teor proteico da ração hipoproteica (2% proteína) é menor que o da ração normoproteica (12% de proteína), animais desnutridos consumiram uma quantidade diária de proteínas significativamente menor em relação aos seus controles. Assim sendo, pode-se classificar a desnutrição induzida no modelo experimental como desnutrição proteico-energética (DPE).

As informações da literatura são conflitantes com relação a dietas hipoproteicas e ao consumo de ração; alguns trabalhos mostram aumento de consumo (COLOMBO et al., 1992; WHITE et al., 1998; NAKAJIMA et al., 2014), enquanto outros relatam comportamento anorético dos animais (BECK et al., 1989; MERCER et al., 1994). Este comportamento anorético que leva à redução na ingestão de ração hipoproteica era esperado, visto que esta reação é habitual em outros trabalhos realizados por nosso grupo (BORELLI et al., 2004; BORELLI et al., 2007; FOCK et al., 2007; FOCK et al., 2008; BORELLI et al., 2009; FOCK, BLATT, et al., 2010; FOCK, ROGERO, et al., 2010; FOCK et al., 2012) e pode ser explicada por alterações nas concentrações plasmáticas de aminoácidos de cadeia ramificada (leucina, valina e isoleucina), os quais influenciam na regulação do centro da fome (FERRO-LUZZI e SPADONI, 1978). A diminuição no consumo da ração hipoprotéica, que culmina em uma redução acentuada no peso corporal dos animais dos grupos desnutrido, não é exclusiva deste estudo, uma vez que outros trabalhos já demonstraram o mesmo (BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000).

Com a ingestão de uma dieta balanceada, o organismo encontra-se em balanço nitrogenado. A desnutrição pode desequilibrar esse balanço, tornando-o negativo, desencadeando a perda de peso frequentemente observada em indivíduos desnutridos (MERCER et al., 1994; WESTERTERP-PLANTENGA et al., 2009). Durante estados de privação proteica, ocorre depleção da musculatura esquelética e liberação de aminoácidos provenientes do catabolismo muscular (MALAFAIA et al., 2009). Esses aminoácidos liberados são direcionados para o fígado com o propósito da gliconeogênese e/ou podem ser usados na síntese proteica (CARPENTIER et al., 1982). Além disso, quadros de carência nutricional podem induzir a degradação de tecido adiposo para a sustentação do metabolismo energético (GROVER e EE, 2009). Por conseguinte, o organismo perde peso.

Ao longo do período de desnutrição, observou-se uma diminuição significativa no peso corpóreo, bem como no consumo de ração e conseqüentemente de proteínas. A perda de aproximadamente 20% do peso corpóreo inicial pelos animais do grupo desnutrido, associados aos valores do hemograma, da concentração de proteínas totais e da albumina e pré-albumina séricas, mostraram-se como bons indicadores na avaliação da desnutrição proteico-energética.

Em relação aos dados hematológicos, os animais desnutridos apresentaram redução quantitativa e significativa tanto no compartimento periférico quanto no central. Em suma, esses animais apresentaram anemia, leucopenia e comprometimento medular, no qual observamos importante hipoplasia.

Os resultados dos leucogramas dos animais desnutridos mostraram uma diminuição quantitativa de leucócitos, linfócitos, neutrófilos e monócitos no sangue periférico. Esta leucopenia pode, em parte, ser responsável pelo comprometimento tanto da imunidade inata, quanto da adquirida, conforme descrito em trabalhos anteriores do nosso grupo (FOCK et al., 2007; FOCK, BLATT, et al., 2010; FOCK, ROGERO, et al., 2010).

Desta forma, o comprometimento hemopoético encontrado no grupo desnutrido pode ser decorrente da hipoplasia medular observada, que corrobora com o menor número de células nucleadas na MO desses animais. A hipoplasia medular resultante da DPE pode ser justificada pela baixa disponibilidade de substrato, que compromete a síntese proteica necessária para a proliferação celular adequada, e por mudanças na proporção de proteínas constitutivas do compartimento medular estromal, que alteram o microambiente medular responsável pela regulação de CTHs (BORELLI et al., 1995; VITURI et al., 2000; XAVIER et al., 2007).

Além disso, a DPE pode alterar o processo de diferenciação de CTMs e, conseqüentemente, alterar a formação dos microambientes indutíveis da hematopoese, de forma a prejudicar a formação do compartimento estromal medular e alterar o perfil de produção de citocinas, influenciando assim a hematopoese (CUNHA et al., 2013).

CTMs são células clonogênicas capazes de se diferenciar em tipos diversos tipos celulares constituintes do estroma medular (HOCKING e GIBRAN, 2010), onde

modulam a função de outras células presentes no microambiente onde se encontram. Intimamente relacionadas às CTHs, as CTMs apresentam-se distribuídas nos nichos hematopoéticos de forma que são responsáveis pela regulação direta e indireta das CTHs (MENDEZ-FERRER et al., 2015). Em vista disso, pode-se inferir que alterações significativas na função das CTMs poderiam prejudicar a hemopoese e, conseqüentemente, comprometer a ontogenia de células imunológicas.

A caracterização de CTMs ainda é complexa, pois, além de não haver um marcador específico para essas células, a expressão dos mesmos pode variar conforme a espécie (humano, camundongo) e entre as diferentes linhagens de camundongos (ANJOS-AFONSO e BONNET, 2011; BOXALL e JONES, 2012). Isto é um fator limitante na escolha da técnica para a identificação de CTMs. Dessa forma, estas células são atualmente caracterizadas por uma combinação de critérios físicos e fenotípicos, além de propriedades funcionais, como a confirmação de sua multipotencialidade, utilizando testes de diferenciação osteogênica, adipogênica e condrogênica. Devido à sua extensa plasticidade, a existência de subpopulações de CTMs justificaria a sua multipotencialidade e variedade fenotípica (BOXALL e JONES, 2012; PHINNEY, 2012). Portanto, para a caracterização das CTMs, utilizou-se como parâmetros a sua morfologia, seu potencial de diferenciação e seu perfil fenotípico. Por estarem inseridas no microambiente hemopoético, que pode ser alterado pela desnutrição, foi investigado se a DPE teria algum efeito sobre a morfologia, confluência, potencial de formar CFU-F e sobre o fenótipo das CTMs.

As CTM obtidas dos dois grupos apresentaram morfologia fusiforme fibroblastóide quando observadas em microscópio ótico invertido, típica dessas células (ABDALLAH e KASSEM, 2008), porém a DPE não alterou a morfologia ou a estimativa do percentual de confluência das mesmas. De acordo com a literatura (GOTHARD et al., 2013), CTMs têm a capacidade de formar colônias fibroblastóides. De fato, essas células foram capazes de formar colônias fibroblastóides, ainda que não tenham surgido diferenças significativas quanto ao número de colônias formadas entre as células provenientes de animais controles e desnutridos.

A imunofenotipagem de CTMs foi realizada para caracterizá-las e identificar possíveis efeitos da DPE sobre o fenótipo dessas células. Para isso, CTMs foram marcadas com um painel de anticorpos (anti-CD14, -CD34, -CD45, -CD90, -CD271 e -Sca1) e seu perfil fenotípico foi obtido por citometria de fluxo. De acordo os

resultados obtidos, CTMct e CTMdesn apresentaram marcações de intensidades similares, negativas ou fracamente positivas para CD14, CD34 e CD45, e positivas para CD90, Sca-1, e CD271.

É importante mencionar que um único marcador de superfície não é capaz de caracterizar individualmente as CTMs – ou qualquer outra célula – uma vez que o mesmo pode ser expresso por mais de um tipo celular. Isto posto, para a investigação do perfil fenotípico das CTMs, optou-se por utilizar um painel de marcadores específicos para essas células e que seria capaz de excluir outros tipos celulares. A marcação negativa para CD14, CD34 e CD45 indica, respectivamente, que as células analisadas não apresentam comprometimento para as linhagens monocítica, tronco hematopoética ou leucocitária. A marcação positiva para CD90, CD271 e Sca-1 corresponde especificamente à de CTMs, caracterizando essas células como tal. O perfil fenotípico encontrado associado à capacidade de diferenciação das células isoladas dos dois grupos em adipócitos, osteoblastos e condrócitos, permitem classificar as mesmas em CTMs, segundo critérios atualmente estabelecidos pela literatura.

Neste trabalho, optamos por trabalhar com CTMs em baixa passagem (P1), pois a manipulação *in vitro* dessas células resulta na perda da sua capacidade de proliferação e diferenciação, respectivamente, a partir da 3<sup>a</sup> e 6<sup>a</sup> passagens (BONAB et al., 2006; AYATOLLAHI et al., 2012).

A literatura relata que CTMs em cultura perdem a sua capacidade proliferativa sem necessariamente alterar a sua morfologia (AYATOLLAHI et al., 2012). Uma vez que não foram observadas diferenças entre a morfologia de CTMct e CTMdesn, buscou-se determinar se a DPE teria algum efeito sobre a proliferação dessas células. Para isso, avaliou-se a influência da DPE sobre o ciclo celular de CTMs, bem como a expressão de proteínas relacionadas com a progressão do ciclo celular. Além disso, verificou-se a viabilidade dessas células frente a DPE.

A porcentagem de CTMs em G0/G1, S/G2/M e em apoptose foram similares aos dois grupos, indicando que a DPE não teve efeito sobre a progressão do ciclo celular e sobre a viabilidade dessas células. Aproximadamente 80% das CTM de ambos os grupos encontraram-se nas fases G0/G1 e apenas 20% em S/G2/M. Menos de 3% do total das células estavam em apoptose.

Para se obter um panorama mais preciso quando a influência da DPE sobre a proliferação de CTMs, investigou-se a expressão das proteínas CDC25a, CDK2, PCNA, c-Myc, CDC42 e p27 em CTMct e CTMdesn.

CDC25a, CDK2 e PCNA são proteínas que induzem a progressão do ciclo celular. CDC25a e CDK2 são essenciais para a progressão da fase G1 para a fase S (BUSINO et al., 2004; SATYANARAYANA e KALDIS, 2009). A proteína PCNA atua sobre a replicação do DNA que ocorre na fase S (LEONARDI et al., 1992). c-Myc é um proto-oncogene capaz de induzir a proliferação celular uma vez que induz expressão de ciclinas e reduz a expressão de p21 (DOMINGUEZ-SOLA et al., 2007). CDC42 é uma enzima que regula a progressão do ciclo celular de diversas formas (CHIRCOP, 2014). P27 é uma proteína inibidora do ciclo celular em G1 (NAKAJIMA et al., 2014).

A DPE não induziu diferenças significativas na expressão de CDC25a, CDK2, PCNA, c-Myc, CDC42 e p27 em CTMs obtidas dos dois grupos. Até o presente momento, não existem estudos que relacionam a DPE com a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular em CTMs.

Considerando que CTMs promovem o estroma de suporte para a hemopoese, bem como apresentam capacidade imunorreguladoras (UCCELLI et al., 2008; SHI et al., 2010; BAIGUERA et al., 2012; YI e SONG, 2012) e uma vez que a GLUT possui propriedades imunomodulatórias, sendo o aminoácido mais consumido por CTMs (NEU et al., 2013) objetivamos avaliar a influência da GLUT sobre a capacidade imunomodulatória de CTMs.

A GLUT é o aminoácido mais abundante encontrado na corrente sanguínea (RENNIE et al., 1996; TAPIERO et al., 2002) e o mais consumido por CTMs (HIGUERA et al., 2012). A GLUT torna-se condicionalmente essencial em condições catabólicas (ADEVA et al., 2012), como na desnutrição, sendo utilizada como fonte alternativa de energia através da sua participação no processo de gliconeogênese (KRAFT et al., 2005). Dessa forma, investigou-se o efeito da GLUT sobre a morfologia e a proliferação de CTM. Para isso, foram testadas quatro concentrações desse aminoácido: 0, 0,6, 2 e 10 mM. A escolha pela concentração de 0,6 mM de GLUT durante o período de cultura celular deve-se ao fato dessa concentração corresponder àquela observada no plasma de animais adultos saudáveis. A concentração 2 mM é padrão em cultura de células e, apesar desse valor estar

acima da concentração fisiológica de GLUT *in vivo* (0,6 mM), experimentalmente 2 mM favoreceram o cultivo de células por períodos prolongados (24 – 72 horas) (EAGLE, 1955). A escolha da concentração de 10 mM, apesar de significativamente superior àquela utilizada em ensaios *in vitro* (2 mM) provém de estudos que verificaram efeitos opostos da GLUT sobre a expressão de genes que codificam para citocinas, por enterócitos e células mononucleares, quando as mesmas foram cultivadas em 2 mM desse aminoácido (WISCHMEYER et al., 2003; HUBERT-BURON et al., 2006).

Nossos dados demonstraram que CTMs cultivadas na ausência de GLUT apresentam morfologia alterada em relação àquelas cultivadas na presença desse aminoácido. Embora não tenha havido uma diferença significativa quanto a proliferação de CTMs obtidas de ambos os grupos e cultivadas na mesma concentração de GLUT, observou-se que quanto maior a concentração desse aminoácido, maior a proliferação dessas células. De fato, a literatura relata que a GLUT é um fator determinante para a proliferação dessas células, ainda que CTMs provenientes de diversas espécies necessitem de quantidades distintas desse aminoácido para a sua proliferação (SOTIROPOULOU et al., 2006).

As CTMs são capazes de modular o sistema imunológico através da secreção de citocinas e pelo seu contato direto com células imunológicas (BAIGUERA et al., 2012). Isto posto, optou-se em focar, neste trabalho, na avaliação do perfil de produção de citocinas, bem como na expressão dos fatores de transcrição NF $\kappa$ B e STAT-3, pois estão diretamente relacionados com a produção de citocinas em condições de estresse, como a DPE (DE OLIVEIRA et al., 2014; MELLO et al., 2014).

Para mimetizar uma condição de estresse imunológico, estimulou-se CTMct e CTMdesn com lipopolissacarídeo (LPS). O LPS é uma molécula encontrada na parede de bactérias Gram-negativas e amplamente utilizada em estudo das respostas inflamatória e imunológica pois tem a capacidade de ativar diversas células e induzir a produção de citocinas, bem como espécies reativas do oxigênio e nitrogênio. Este estímulo é dependente de vias de sinalização que culminam com a ativação direta de NF $\kappa$ B e indireta de STAT-3, através de citocinas produzidas pela via do NF $\kappa$ B (RIETSCHHEL et al., 1994; CAMPBELL et al., 2006).

Para a avaliação da expressão de NF $\kappa$ B e STAT-3 em CTMct e CTMdesn, previamente estimuladas com LPS e cultivadas em 0, 0,6, 2 e 10 mM de GLUT, utilizou-se como parâmetro a relação da porção fosforilada pela porção total desses fatores de transcrição. A fosforilação destes fatores levam a sua ativação e translocação para o núcleo, onde promovem a transcrição gênica e, conseqüentemente, a produção de citocinas.

Nossos resultados demonstraram que a GLUT modula a expressão das porções total e fosforilada do fator de transcrição NF $\kappa$ B em CTMct e CTMdesn. Em CTMct previamente estimuladas com LPS, observou-se um aumento significativo na relação p-NF $\kappa$ B/NF $\kappa$ B somente quando cultivadas em 0,6 mM de GLUT. Dessa forma, 0,6 mM de GLUT é a concentração que induziria uma maior produção de citocinas relacionadas com a ativação da via do NF $\kappa$ B. É interessante notar que 0,6 mM de GLUT corresponde àquela observada no plasma de animais adultos saudáveis. Por outro lado, observou-se uma redução significativa na relação p-NF $\kappa$ B/NF $\kappa$ B quando CTMs foram cultivadas em 2 e 10 mM de GLUT. Nessas concentrações, a expressão da porção fosforilada de NF $\kappa$ B em CTMdes chega a ser quase um quinto da sua porção total, indicando uma possível redução na produção de citocinas por CTMdes cultivadas nessas concentrações. Por conseguinte, a suplementação de GLUT em altas concentrações poderia comprometer a resposta imune de indivíduos desnutridos.

Em relação a expressão de STAT-3, também observamos ação da GLUT sobre a expressão das porções total e fosforilada desse fator. Em CTMct previamente estimuladas com LPS, observou-se um aumento significativo na relação p-STAT3/STAT3 quando cultivadas em 2 e 10 mM de GLUT. Portanto, essas concentrações poderiam provocar, em tese, um aumento na produção de citocinas relacionadas a via da STAT-3 por essas células. Além disso, a literatura descreve que a ativação de STAT-3 aumenta a produção de CCL2, ligante de CCR2 e CCR4, responsável pela atração de células imunológicas para o local de inflamação. Por outro lado, um aumento na porção fosforilada de STAT-3 reduz a produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , diminuindo assim a ativação autócrina de STAT-3 como uma forma de evitar um processo inflamatório acentuado. (FREEMAN e HOLLAND, 2009; KOK et al., 2009). Kanauchi e colaboradores apresentam indícios de que a GLUT poderia atuar inibindo a expressão de STAT-3 no microambiente

intestinal, diminuindo quadros pró-inflamatórios exarcebados (KANAUCHI et al., 2003).

Em CTMdesn, há um aumento significativo da expressão da porção fosforilada de STAT-3 quando cultivadas em 0,6, 2 e 10 mM de GLUT em relação a quando cultivadas na ausência desse aminoácido. Quando CTMdesn são cultivadas em uma concentração de GLUT corresponde àquela observada no plasma de animais adultos saudáveis (0,6mM), parece haver uma recuperação significativa na sua capacidade de produção de citocinas relacionadas a essa via. Esta concentração aumenta de forma significativa a expressão da porção fosforilada de STAT-3 por CTMdesn em relação ao seu controle. Recentemente, relatou-se um aumento na expressão de STAT-3 por linfócitos esplênicos provenientes de animais desnutridos (MELO et al., 2014), porém a literatura é escassa quanto ao efeito da desnutrição sobre a expressão desse fator em CTMs.

Buscando investigar a influência da GLUT sobre o perfil de produção de citocinas por CTMct e CTMdesn previamente estimuladas com LPS, avaliou-se a produção de IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  por essas células. Enquanto CTMct e CTMdesn foram capazes de produzir IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-17, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , essas células não produziram, ou produziram abaixo do nível de detecção do teste empregado, as citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, IL-4 e TNF- $\alpha$ .

Sabe-se que a estimulação de células por LPS resulta na ativação da IKK, a qual promove a fosforilação do inibidor do NF $\kappa$ B (I $\kappa$ B- $\alpha$ ). Este fato resulta na degradação do I $\kappa$ B- $\alpha$  e, subsequentemente, na liberação e translocação do NF $\kappa$ B para o núcleo, onde o NF $\kappa$ B - um fator de transcrição ubíquo que regula a transcrição de diversos genes envolvidos em respostas imunes e inflamatórias - promove a ativação do gene que codifica diversas citocinas pró-inflamatórias (BEUTLER, 2003; BEUTLER et al., 2006).

Nossos resultados demonstraram uma menor produção de IL-1 $\beta$  por CTMdesn em relação aos seu controles quando cultivadas em 0,6 e 2 mM de GLUT. Interessantemente, observamos que quanto maior a concentração de GLUT utilizada, menor a produção de IL-1 $\beta$  por CTMs de ambos os grupos. Conforme mencionado anteriormente, houve uma diminuição significativa na expressão da porção fosforilada de NF $\kappa$ B, quanto maior a concentração de GLUT, o que nos leva

a correlacionar que a diminuição na produção de IL-1 $\beta$  observada pode estar diretamente relacionada à diminuição da expressão da porção fosforilada do NF $\kappa$ B (RENARD et al., 1997; FITZGERALD et al., 2007).

Wischmeyer e colaboradores relataram que a suplementação com GLUT acima de 4 mM possui capacidade de diminuir a produção de citocinas pro-inflamatórias em células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro* com LPS. Por outro lado, Cruzat e colaboradores demonstraram, *in vivo*, que a suplementação com GLUT na forma livre ou como dipeptídeo diminui a liberação dessas citocinas imediatamente após o exercício físico intenso e que a razão GSH/GSSH no músculo sóleo e no fígado encontra-se aumentada (WISCHMEYER et al., 2003; CRUZAT e TIRAPEGUI, 2009).

O aumento na concentração de GLUT resultou em uma diminuição na produção de IL-1 $\beta$  e IL-6 por CTMs. Este resultado está de acordo com a redução observada na expressão de p-NF $\kappa$ B por CTMs uma vez que essas citocinas são produzidas em decorrência da ativação da via do NF $\kappa$ B (CORTEZ et al., 2013). Levando em conta o papel imunomodulador de CTMs, a redução na produção de IL-6 por essas células pode resultar na inibição do fator de transcrição STAT-3, diminuindo a produção de IL-17, essencial para a diferenciação de linfócitos T auxiliares em T<sub>H</sub>17, aumentando assim a susceptibilidade a infecções (MUDTER e NEURATH, 2007).

De fato, nota-se uma redução nos níveis de IL-17 quando CTMs são cultivadas em altas concentrações de GLUT, ainda que esses resultados não tenham sido estatisticamente significativos. Quando suplementadas com 10 mM de GLUT, CTMs obtidas dos dois grupos tendem a diminuir a produção de IFN- $\gamma$ . Visto que essa citocina é capaz de ativar diversas células do sistema imunológico (SCHOENBORN e WILSON, 2007), concentrações elevadas de GLUT poderiam prejudicar a resposta imune. Isto posto, a suplementação de GLUT, em concentrações acima da fisiológica, não seria recomendada pois poderia comprometer a resposta imune do indivíduo desnutrido. Entretanto, em situações onde existiria a necessidade de imunossuprimir o organismo, como por exemplo, nos casos de transplante, talvez a utilização da GLUT em associação com as CTMs poderia ser aventada.

Em conformidade com esses resultados, o aumento na concentração de GLUT induziu a produção de IL-10, uma citocina antiinflamatória que inibe a via do NF $\kappa$ B (FOCK et al., 2008). Da mesma forma, houve um aumento na produção de TGF- $\beta$  por CTM isoladas de ambos os grupos conforme a elevação na concentração de GLUT. Entretanto esse aumento foi menos evidente em CTMdesn. Dessa maneira, a DPE reduziu a produção de TGF- $\beta$  por CTMdes suplementadas com concentrações de GLUT maiores que a fisiológica. Uma vez que o TGF- $\beta$  regula a proliferação, diferenciação, migração e adesão celulares (NASSIRI et al., 2011; TRAVIS e SHEPPARD, 2014), pode-se inferir que essa diminuição poderia comprometer os mecanismos de defesa de indivíduos desnutridos.

Visto que CTM são capazes de modular células imunológicas através da secreção de citocinas, buscou-se identificar possíveis efeitos do sobrenadante de CTMct e CTMdes previamente cultivadas em 0, 0,6, 2 e 10 mM de GLUT sobre a proliferação de macrófagos e linfócitos esplênicos estimulados com LPS, bem como sobre a produção de citocinas por essas células.

O estímulo com LPS associado a suplementação de GLUT aumentou a proliferação de macrófagos e de linfócitos esplênicos em relação as células que não receberam o estímulo ou em comparação àquelas cultivadas na ausência desse aminoácido. Portanto, pode-se inferir que a GLUT é essencial para a proliferação dessas células, independente do quadro nutricional previamente instalado. De acordo com a literatura, a enzima MAPK fosfatase-1 estimula a proliferação de macrófagos e linfócitos (ZHANG et al., 2009; COMALADA et al., 2012). Visto que MAPK fosfatases podem ser ativadas pela GLUT e que essas enzimas inibem MAPK (KIM et al., 2015), como IKKs, essa via de sinalização pode estar relacionada não só ao aumento na proliferação de macrófagos e de linfócitos esplênicos, mas também com o efeito antiinflamatório observado quando CTMs são cultivadas em concentrações supra-fisiológicas de GLUT, mesmo na presença do estímulo com LPS.

Quando cultivados na presença dos meios condicionados provenientes de CTMct e CTMdesn, macrófagos e linfócitos estimulados com LPS apresentaram diminuição na sua proliferação. De acordo com os resultados obtidos, a redução na proliferação dessas células pode estar relacionada com a produção de TGF- $\beta$  por

CTMct e CTMdesn. Sabe-se que o TGF- $\beta$  induz a parada do ciclo celular em G1 pois estimula a síntese das proteínas p15 e p21 que, por sua vez, inibem a expressão de c-Myc, impedindo assim, a progressão do ciclo celular (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Em conformidade com os resultados obtidos referentes ao ciclo celular de CTMs, observa-se que a maioria das CTMct e CTMdes (aproximadamente 80% das células) encontram-se na fase G0/G1. Nossos resultados demonstraram, por exemplo, um aumento significativo na produção de TGF- $\beta$  em CTMct e CTMdesn quando cultivadas em 2 e 10 mM de GLUT. De fato, a proliferação de linfócitos estimulados com LPS foi significativamente reduzida quando cultivados na presença dos meios condicionados de CTMct e CTMdesn 2 e 10 mM GLUT em relação aos seus respectivos controles. Além disso, macrófagos cultivados com CTMdesn 2 mM GLUT proliferam significativamente menos do que quando cultivados com CTMct 2 mM GLUT.

Além de identificar possíveis efeitos dos meios condicionados de CTM sobre a proliferação de macrófagos e linfócitos esplênicos, investigou-se também a produção das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos e IL-10, IL-17 e INF- $\gamma$  por linfócitos esplênicos quando estimulados com LPS e cultivados com esses meios condicionados.

Macrófagos estimulados com LPS e cultivados na presença dos meios condicionados testados tendem a diminuir a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-12 e TNF- $\alpha$  e aumentar a produção da citocina antiinflamatória IL-10, em relação aos seus respectivos controles (macrófagos estimulados com LPS).

A IL-12 é uma citocina produzida por macrófagos em resposta a estímulos antigênicos, como o LPS. Em linhas gerais, essa citocina estimula a proliferação de linfócitos T e induz a sua diferenciação em linfócitos T<sub>H</sub>1, que produzem IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Essas duas citocinas podem atuar de forma parácrina em macrófagos, aumentando ainda mais a sua produção de citocinas pró-inflamatórias (HSIEH et al., 1993). A ligação do TNF- $\alpha$  ao seu receptor (TNFR), presente em diversos tipos celulares incluindo macrófagos, pode ativar a via do NF $\kappa$ B e gerar a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como estimular a proliferação e diferenciação celular via MAPK, ou ainda induzir apoptose celular via ativação de caspases (GAUR e AGGARWAL, 2003; KANT et al., 2011; DE OLIVEIRA et al., 2014).

Sabe-se que a IL-10 é uma citocina antiinflamatória pois inibe a via do NF $\kappa$ B e, conseqüentemente, a produção de citocinas pró-inflamatórias, diminui a produção de citocinas T<sub>H</sub>1, bem como reduz a expressão de moléculas co-estimulatórias por células apresentadoras de antígenos (DIJKSTRA et al., 2002; SATO et al., 2011). Portanto, a redução na produção de IL-12 e TNF- $\alpha$  por macrófagos estimulados com LPS e cultivados na presença dos meios condicionados pode ser decorrente da ação antiinflamatórias das citocinas IL-10 e TGF- $\beta$  produzidas por CTMs. Por outro lado, o aumento na produção de IL-10 por essas células pode estar relacionado ao caráter imunossupressor das CTMs, amplamente discutido na literatura (KYURKCHIEV et al., 2014; WANG et al., 2014). Não foram observadas diferenças significativas quanto a produção de IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-10 por macrófagos cultivados com os meios condicionados provenientes de CTMct e CTMdesn. Isto posto, pode-se inferir que a concentração de GLUT é o fator determinante na modulação da produção dessas citocinas por macrófagos.

Linfócitos estimulados com LPS e cultivados nos meios condicionados testados não alteraram significativamente a sua produção de IL-10 e IFN- $\gamma$ . Por outro lado, houve um aumento significativo na produção de IL-17 por essas células quando cultivadas na presença dos meios condicionados. Esse fato pode ser resultante da elevada produção de IL-6 por CTMct e CTMdesn, uma vez que esta citocina ativa a via da STAT-3 que, por sua vez, resulta na produção de IL-17 (NISHIHARA et al., 2007).

## 6. CONCLUSÕES

- A avaliação nutricional dos animais submetidos ao modelo experimental utilizado indicou a instalação de um quadro de DPE crônica;
- A DPE comprometeu o tecido medular e a hemopoese, porém não alterou a morfologia, o fenótipo, a multipotencialidade ou aspectos relacionados ao ciclo celular de CTMs;
- A GLUT induziu proliferação em CTMs, bem como modificou a expressão de fatores de transcrição e a produção de citocinas por essas células, exercendo efeito imunomodulador sobre as mesmas, o qual foi influenciado pela DPE;
- CTMs produziram fatores solúveis que reduziram a proliferação de macrófagos e linfócitos e que modularam a produção de citocinas por essas células. A GLUT e a DPE também influenciaram nesses aspectos;
- Portanto, variações na biodisponibilidade de GLUT influenciam na imunomodulação de CTMs que, por sua vez, têm efeito direto sobre células imunológicas.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia Básica*. 4. Elsevier, 2013. ISBN 9788535271102.

ABDALLAH, B. M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther*, v. 15, n. 2, p. 109-16, Jan 2008. ISSN 1476-5462 (Electronic) 0969-7128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17989700> >.

ACC/SCN. *Nutrition through life*. Administrative Committee on Coordination/Sub-Committee on Nutrition. Geneva. 2000

ADEVA, M. M.; SOUTO, G.; BLANCO, N.; DONAPETRY, C. Ammonium metabolism in humans. *Metabolism*, v. 61, n. 11, p. 1495-511, Nov 2012. ISSN 0026-0495.

AKNER, G.; CEDERHOLM, T. Treatment of protein-energy malnutrition in chronic nonmalignant disorders. *Am J Clin Nutr*, v. 74, n. 1, p. 6-24, Jul 2001. ISSN 0002-9165 (Print).

ALAGESAN, S.; GRIFFIN, M. D. Autologous and allogeneic mesenchymal stem cells in organ transplantation: what do we know about their safety and efficacy? *Curr Opin Organ Transplant*, v. 19, n. 1, p. 65-72, Feb 2014. ISSN 1087-2418.

ALEDO, J. C. Glutamine breakdown in rapidly dividing cells: waste or investment? *Bioessays*, v. 26, n. 7, p. 778-85, Jul 2004. ISSN 0265-9247 (Print) 0265-9247.

ALVES, D. C. Desnutrição. In: AUGUSTO, A. L. P.; MANNARINO, I. C., et al (Ed.). *Terapia nutricional*: Editora Atheneu, 1995. p.220-229.

ANJOS-AFONSO, F.; BONNET, D. Prospective identification and isolation of murine bone marrow derived multipotent mesenchymal progenitor cells. *Best Pract Res Clin Haematol*, v. 24, n. 1, p. 13-24, Mar 2011. ISSN 1532-1924 (Electronic) 1521-6926 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21396589> >.

ARAI, F.; SUDA, T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1106, p. 41-53, Jun 2007. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17332071> >.

ASPENSTROM, P.; RUUSALA, A.; PACHOLSKY, D. Taking Rho GTPases to the next level: the cellular functions of atypical Rho GTPases. *Exp Cell Res*, v. 313, n. 17, p. 3673-9, Oct 15 2007. ISSN 0014-4827 (Print) 0014-4827.

AYATOLLAHI, M.; SALMANI, M. K.; GERAMIZADEH, B.; TABELI, S. Z.; SOLEIMANI, M.; SANATI, M. H. Conditions to improve expansion of human mesenchymal stem cells based on rat samples. *World J Stem Cells*, v. 4, n. 1, p. 1-8, Jan 26 2012. ISSN 1948-0210.

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

BAIN, L. E.; AWAH, P. K.; GERALDINE, N.; KINDONG, N. P.; SIGAL, Y.; BERNARD, N.; TANJEKO, A. T. Malnutrition in Sub-Saharan Africa: burden, causes and prospects. *Pan Afr Med J*, v. 15, p. 120, 2013.

BANKHEAD, R.; BOULLATA, J.; BRANTLEY, S.; CORKINS, M.; GUENTER, P.; KRENITSKY, J.; LYMAN, B.; METHENY, N. A.; MUELLER, C.; ROBBINS, S.; WESSEL, J. Enteral nutrition practice recommendations. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, v. 33, n. 2, p. 122-67, Mar-Apr 2009. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071.

BANNERMAN, R. Hematology. In: SERIES, A. C. O. L. A. M. (Ed.). *The mouse in biomedical research: normative biology, immunology and husbandry*. New York: Academic Press, v.3, 1983. p.293-304.

BARON, R. B. Desnutrição protéico-calórica. In: BENNET, J. C. e PLUM, F. (Ed.). *Cecil Tratado de Medicina Interna*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara-Koogan, v.1, 1997. p.1273-1277.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 36, n. 4, p. 568-84, Apr 2004. ISSN 1357-2725 (Print) 1357-2725 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15010324> >.

BATTEN, P.; SARATHCHANDRA, P.; ANTONIW, J. W.; TAY, S. S.; LOWDELL, M. W.; TAYLOR, P. M.; YACOUB, M. H. Human mesenchymal stem cells induce T cell anergy and downregulate T cell allo-responses via the TH2 pathway: relevance to tissue engineering human heart valves. *Tissue Eng*, v. 12, n. 8, p. 2263-73, Aug 2006. ISSN 1076-3279 (Print) 1076-3279.

BECK, B.; DOLLET, J. M.; MAX, J. P. Refeeding after various times of ingestion of a low protein diet: effects on food intake and body weight in rats. *Physiol Behav*, v. 45, n. 4, p. 761-5, Apr 1989. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2780844> >.

BENVENUTO, F.; FERRARI, S.; GERDONI, E.; GUALANDI, F.; FRASSONI, F.; PISTOIA, V.; MANCARDI, G.; UCCELLI, A. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, v. 25, n. 7, p. 1753-60, Jul 2007. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099.

BEUTLER, B. Science review: key inflammatory and stress pathways in critical illness - the central role of the Toll-like receptors. *Crit Care*, v. 7, n. 1, p. 39-46, Feb 2003. ISSN 1364-8535 (Print) 1364-8535.

BEUTLER, B.; JIANG, Z.; GEORGEL, P.; CROZAT, K.; CROKER, B.; RUTSCHMANN, S.; DU, X.; HOEBE, K. Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large. *Annu Rev Immunol*, v. 24, p. 353-89, 2006. ISSN 0732-0582 (Print) 0732-0582.

BEYTH, S.; BOROVSKY, Z.; MEVORACH, D.; LIEBERGALL, M.; GAZIT, Z.; ASLAN, H.; GALUN, E.; RACHMILEWITZ, J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, v. 105, n. 5, p. 2214-9, Mar 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.

BHAN, M. K.; BHANDARI, N.; BAHL, R. Management of the severely malnourished child: perspective from developing countries. *Bmj*, v. 326, n. 7381, p. 146-51, Jan 18 2003. ISSN 0959-535x.

BHUTTA, Z. A.; DAS, J. K.; RIZVI, A.; GAFFEY, M. F.; WALKER, N.; HORTON, S.; WEBB, P.; LARTEY, A.; BLACK, R. E. Evidence-based interventions for improvement of maternal and child nutrition: what can be done and at what cost? *Lancet*, v. 382, n. 9890, p. 452-77, Aug 3 2013. ISSN 0140-6736.

BIANCO, P.; ROBEY, P. G.; SAGGIO, I.; RIMINUCCI, M. "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther*, v. 21, n. 9, p. 1057-66, Sep 2010. ISSN 1557-7422 (Electronic) 1043-0342 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20649485> >.

BONAB, M. M.; ALIMOGHADDAM, K.; TALEBIAN, F.; GHAFFARI, S. H.; GHAVAMZADEH, A.; NIKBIN, B. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol*, v. 7, p. 14, 2006. ISSN 1471-2121 (Electronic) 1471-2121 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16529651> >.

BONANNI, A.; MANNUCCI, I.; VERZOLA, D.; SOFIA, A.; SAFFIOTI, S.; GIANETTA, E.; GARIBOTTO, G. Protein-energy wasting and mortality in chronic kidney disease. *Int J Environ Res Public Health*, v. 8, n. 5, p. 1631-54, May 2011. ISSN 1660-4601.

BORELLI, P.; BARROS, F. E.; NAKAJIMA, K.; BLATT, S. L.; BEUTLER, B.; PEREIRA, J.; TSUJITA, M.; FAVERO, G. M.; FOCK, R. A. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Braz J Med Biol Res*, v. 42, n. 6, p. 523-30, Jun 2009. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19448901>>.

BORELLI, P.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; DE MAURINO, B. B.; TSUJITA, M.; DE SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G.; FOCK, R. A. Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *Br J Nutr*, v. 97, n. 2, p. 307-14, Feb 2007. ISSN 0007-1145 (Print)0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17298699> >.

BORELLI, P.; BLATT, S. L.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A. Haematological alterations in protein malnutrition. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, n. 1, p. 49-56, 2004. ISSN 1516-8484. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-84842004000100010> >.

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

BOUSSO, P. T-cell activation by dendritic cells in the lymph node: lessons from the movies. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 9, p. 675-84, Sep 2008. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733.

BOXALL, S. A.; JONES, E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int*, v. 2012, p. 975871, 2012. ISSN 1687-9678 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22666272> >.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, v. 72, p. 248-54, May 7 1976. ISSN 0003-2697 (Print) 0003-2697.

BRASSE-LAGNEL, C. G.; LAVOINNE, A. M.; HUSSON, A. S. Amino acid regulation of mammalian gene expression in the intestine. *Biochimie*, v. 92, n. 7, p. 729-35, Jul 2010. ISSN 0300-9084.

BROSNAN, J. T. Interorgan amino acid transport and its regulation. *J Nutr*, v. 133, n. 6 Suppl 1, p. 2068s-2072s, Jun 2003. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166.

BRUNDTLAND, G. H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. *Nutr Rev*, v. 58, n. 2 Pt 2, p. S1-4; discussion S63-73, Feb 2000. ISSN 0029-6643 (Print) 0029-6643.

BUSINO, L.; CHIESA, M.; DRAETTA, G. F.; DONZELLI, M. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene*, v. 23, n. 11, p. 2050-6, Mar 15 2004. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

BUTLER, J. M.; NOLAN, D. J.; VERTES, E. L.; VARNUM-FINNEY, B.; KOBAYASHI, H.; HOOPER, A. T.; SEANDEL, M.; SHIDO, K.; WHITE, I. A.; KOBAYASHI, M.; WITTE, L.; MAY, C.; SHAWBER, C.; KIMURA, Y.; KITAJEWSKI, J.; ROSENWAKS, Z.; BERNSTEIN, I. D.; RAFII, S. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*, v. 6, n. 3, p. 251-64, Mar 5 2010. ISSN 1875-9777 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20207228> >.

CALDER, P. C. Feeding the immune system. *Proc Nutr Soc*, v. 72, n. 3, p. 299-309, Aug 2013. ISSN 0029-6651.

CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Glutamine and the immune system. *Amino Acids*, v. 17, n. 3, p. 227-41, 1999. ISSN 0939-4451 (Print) 0939-4451.

CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J.; BROOLING, J. T.; BAUER, R. L.; MITCHELL, C.; FAUSTO, N. Proinflammatory cytokine production in liver regeneration is Myd88-dependent, but independent of Cd14, Tlr2, and Tlr4. *J Immunol*, v. 176, n. 4, p. 2522-8, Feb 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

CAMPOREALE, A.; POLI, V. IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity? *Front Biosci (Landmark Ed)*, v. 17, p. 2306-26, 2012. ISSN 1093-4715.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol*, v. 217, n. 2, p. 318-24, Jan 2009. ISSN 1096-9896 (Electronic) 0022-3417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19023885> >.

CARIO, E.; ROSENBERG, I. M.; BRANDWEIN, S. L.; BECK, P. L.; REINECKER, H. C.; PODOLSKY, D. K. Lipopolysaccharide activates distinct signaling pathways in intestinal epithelial cell lines expressing Toll-like receptors. *J Immunol*, v. 164, n. 2, p. 966-72, Jan 15 2000. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

CARPENTIER, Y. A.; BARTHEL, J.; BRUYNS, J. Plasma protein concentration in nutritional assessment. *Proc Nutr Soc*, v. 41, n. 3, p. 405-17, Sep 1982. ISSN 0029-6651 (Print) 0029-6651.

CASTELL, L. M.; NEWSHOLME, E. A. The relation between glutamine and the immunodepression observed in exercise. *Amino Acids*, v. 20, n. 1, p. 49-61, 2001. ISSN 0939-4451 (Print) 0939-4451.

CHANDRA, R. K. Nutrition, immunity, and infection: present knowledge and future directions. *Lancet*, v. 1, n. 8326 Pt 1, p. 688-91, Mar 26 1983. ISSN 0140-6736 (Print) 0140-6736.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am J Clin Nutr*, v. 66, n. 2, p. 460s-463s, Aug 1997. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165.

CHANDRA, R. K. Nutrition and immunology: from the clinic to cellular biology and back again. *Proc Nutr Soc*, v. 58, n. 3, p. 681-3, Aug 1999. ISSN 0029-6651 (Print) 0029-6651.

CHANDRA, R. K. Nutrient regulation of immune functions. *Forum Nutr*, v. 56, p. 147-8, 2003. ISSN 1660-0347 (Print) 0067-8198.

CHEN, L.; TREDGET, E. E.; WU, P. Y.; WU, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One*, v. 3, n. 4, p. e1886, 2008. ISSN 1932-6203.

CHEUNG, K.; LEE, S. S.; RAMAN, M. Prevalence and mechanisms of malnutrition in patients with advanced liver disease, and nutrition management strategies. *Clin Gastroenterol Hepatol*, v. 10, n. 2, p. 117-25, Feb 2012. ISSN 1542-3565.

CHIRCOP, M. Rho GTPases as regulators of mitosis and cytokinesis in mammalian cells. *Small GTPases*, v. 5, 2014. ISSN 2154-1248.

CHISTI, M. J.; AHMED, T.; PIETRONI, M. A.; FARUQUE, A. S.; ASHRAF, H.; BARDHAN, P. K.; HOSSAIN, I.; DAS, S. K.; SALAM, M. A. Pulmonary tuberculosis in severely-malnourished or HIV-infected children with pneumonia: a review. *J Health Popul Nutr*, v. 31, n. 3, p. 308-13, Sep 2013. ISSN 1606-0997 (Print) 1606-0997.

COICO, R.; SUNSHINE, G. *Immunology: A Short Course*. 6. Wiley-Blackwell, 2009. ISBN 978-0-470-08158-7.

COLLUM, M.C. Award lecture. Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr*, v. 53, n. 5, p. 1087-101, May 1991. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1902345> >.

COLOMBO, J. P.; CERVANTES, H.; KOKOROVIC, M.; PFISTER, U.; PERRITAZ, R. Effect of different protein diets on the distribution of amino acids in plasma, liver and brain in the rat. *Ann Nutr Metab*, v. 36, n. 1, p. 23-33, 1992. ISSN 0250-6807 (Print) 0250-6807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1590669> >.

COLTER, D. C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C. M.; PROCKOP, D. J. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 97, n. 7, p. 3213-8, Mar 28 2000. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10725391> >.

COMALADA, M.; LLOBERAS, J.; CELADA, A. MKP-1: a critical phosphatase in the biology of macrophages controlling the switch between proliferation and activation. *Eur J Immunol*, v. 42, n. 8, p. 1938-48, Aug 2012. ISSN 0014-2980.

CONESE, M.; CARBONE, A.; CASTELLANI, S.; DI GIOIA, S. Paracrine effects and heterogeneity of marrow-derived stem/progenitor cells: relevance for the treatment of respiratory diseases. *Cells Tissues Organs*, v. 197, n. 6, p. 445-73, 2013. ISSN 1422-6405.

CORCIONE, A.; BENVENUTO, F.; FERRETTI, E.; GIUNTI, D.; CAPPIELLO, V.; CAZZANTI, F.; RISSO, M.; GUALANDI, F.; MANCARDI, G. L.; PISTOIA, V.; UCCELLI, A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, v. 107, n. 1, p. 367-72, Jan 1 2006. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.

CORKINS, M. R.; GUENTER, P.; DIMARIA-GHALILI, R. A.; JENSEN, G. L.; MALONE, A.; MILLER, S.; PATEL, V.; PLOGSTED, S.; RESNICK, H. E.; AMERICAN SOCIETY FOR, P.; ENTERAL, N. Malnutrition diagnoses in hospitalized patients: United States, 2010. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, v. 38, n. 2, p. 186-95, Feb 2014. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24247093> >

CORREIA, M. I.; HEGAZI, R. A.; HIGASHIGUCHI, T.; MICHEL, J. P.; REDDY, B. R.; TAPPENDEN, K. A.; UYAR, M.; MUSCARITOLI, M. Evidence-based recommendations for addressing malnutrition in health care: an updated strategy from the feedM.E. Global Study Group. *J Am Med Dir Assoc*, v. 15, n. 8, p. 544-50, Aug 2014. ISSN 1525-8610.

CORTEZ, M.; CARMO, L. S.; ROGERO, M. M.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF-alpha production by increasing NF-kappaB and attenuating PPAR-gamma expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation*, v. 36, n. 2, p. 379-86, Apr 2013. ISSN 0360-3997.

CORTHESEY-THEULAZ, I.; DEN DUNNEN, J. T.; FERRE, P.; GEURTS, J. M.; MULLER, M.; VAN BELZEN, N.; VAN OMMEN, B. Nutrigenomics: the impact of biomics technology on nutrition research. *Ann Nutr Metab*, v. 49, n. 6, p. 355-65, Nov-Dec 2005. ISSN 0250-6807 (Print) 0250-6807 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16179781> >.

COURTOIS, G.; GILMORE, T. D. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*, v. 25, n. 51, p. 6831-43, Oct 30 2006. ISSN 0950-9232 (Print) 0950-9232.

COZZOLINO, S. M. F.; COMINETTI, C. Bases bioquímicas e fisiológicas da nutrição: nas diferentes fases da vida, na saúde e na doença. 1. Barueri, SP: Manole, 2013. ISBN 978-85-204-3177-1.

CRUZAT, V. F.; TIRAPGUI, J. Effects of oral supplementation with glutamine and alanyl-glutamine on glutamine, glutamate, and glutathione status in trained rats and subjected to long-duration exercise. *Nutrition*, v. 25, n. 4, p. 428-35, Apr 2009. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007.

CUNHA, M. C.; LIMA FDA, S.; VINOLO, M. A.; HASTREITER, A.; CURI, R.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. Protein malnutrition induces bone marrow mesenchymal stem cells commitment to adipogenic differentiation leading to hematopoietic failure. *PLoS One*, v. 8, n. 3, p. e58872, 2013. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23516566> >.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITHON-CURI, T. C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. *J Cell Physiol*, v. 204, n. 2, p. 392-401, Aug 2005. ISSN 0021-9541 (Print) 0021-9541.

DA SILVA LIMA, F.; ROGERO, M. M.; RAMOS, M. C.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. Modulation of the nuclear factor-kappa B (NF-kappaB) signalling pathway by glutamine in peritoneal macrophages of a murine model of protein malnutrition. *Eur J Nutr*, v. 52, n. 4, p. 1343-51, Jun 2013. ISSN 1436-6215 (Electronic) 1436-6207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923035> >.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CAPLAN, A. I.; NARDI, N. B. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 26, n. 9, p. 2287-99, Sep 2008. ISSN 1066-5099.

DAS, M.; SUNDELL, I. B.; KOKA, P. S. Adult mesenchymal stem cells and their potency in the cell-based therapy. *J Stem Cells*, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2013. ISSN 1556-8539 (Print) 1556-8539.

DAZZI, F.; LOPES, L.; WENG, L. Mesenchymal stromal cells: a key player in 'innate tolerance'? *Immunology*, v. 137, n. 3, p. 206-13, Nov 2012. ISSN 0019-2805.

DE ANGELIS, R. C. *Fisiologia da Nutrição*. 3. Rio de Janeiro: 1986.

DE OLIVEIRA, D. C.; HASTREITER, A. A.; MELLO, A. S.; DE OLIVEIRA BELTRAN, J. S.; OLIVEIRA SANTOS, E. W.; BORELLI, P.; FOCK, R. A. The effects of protein malnutrition on the TNF-RI and NF-kappaB expression via the TNF-alpha signaling pathway. *Cytokine*, v. 69, n. 2, p. 218-25, Oct 2014. ISSN 1043-4666.

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

DELVES, P. J.; MARTIN, S. J.; BURTON, D. R.; ROITT, I. M. *Roitt's Essencial Immunology*. 12. Wiley-Blackwell, 2011.

DEXTER, T. M. Growth and differentiation in the haemopoietic system. *Biochem Soc Trans*, v. 19, n. 2, p. 303-6, Apr 1991. ISSN 0300-5127 (Print) 0300-5127.

DIJKSTRA, G.; MOSHAGE, H.; JANSEN, P. L. Blockade of NF-kappaB activation and donation of nitric oxide: new treatment options in inflammatory bowel disease? *Scand J Gastroenterol Suppl*, n. 236, p. 37-41, 2002. ISSN 0085-5928 (Print) 0085-5928.

DOMINGUEZ-SOLA, D.; YING, C. Y.; GRANDORI, C.; RUGGIERO, L.; CHEN, B.; LI, M.; GALLOWAY, D. A.; GU, W.; GAUTIER, J.; DALLA-FAVERA, R. Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc. *Nature*, v. 448, n. 7152, p. 445-51, Jul 26 2007. ISSN 0028-0836.

DOUMAS, B. T.; WATSON, W. A.; BIGGS, H. G. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clin Chim Acta*, v. 31, n. 1, p.

87-96, Jan 1971. ISSN 0009-8981 (Print) 0009-8981 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5544065> >.

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

DUGGAN, M. B. Anthropometry as a tool for measuring malnutrition: impact of the new WHO growth standards and reference. *Ann Trop Paediatr*, v. 30, n. 1, p. 1-17, 2010. ISSN 0272-4936.

EAGLE, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, v. 122, n. 3168, p. 501-14, Sep 16 1955. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

EGEA, V.; VON BAUMGARTEN, L.; SCHICHOR, C.; BERNINGER, B.; POPP, T.; NETH, P.; GOLDBRUNNER, R.; KIENAST, Y.; WINKLER, F.; JOCHUM, M.; RIES, C. TNF-alpha respecifies human mesenchymal stem cells to a neural fate and promotes migration toward experimental glioma. *Cell Death Differ*, v. 18, n. 5, p. 853-63, May 2011. ISSN 1350-9047.

EZOE, S.; MATSUMURA, I.; SATOH, Y.; TANAKA, H.; KANAKURA, Y. Cell cycle regulation in hematopoietic stem/progenitor cells. *Cell Cycle*, v. 3, n. 3, p. 314-8, Mar 2004. ISSN 1538-4101 (Print) 1551-4005.

FAO. Food and Agriculture Organization. Economic growth is necessary but not sufficient to accelerate reduction of hunger and malnutrition. Roma 2012.

FAO. Hunger Portal. Food and Agriculture Organization, 2013. Disponível em: < <http://www.fao.org/hunger/en/> >.

FAO. Food and Agriculture Organization. Hunger Portal. 2014. Disponível em: < <http://www.fao.org/hunger/en/> >.

FERNANDEZ, K. S.; DE ALARCON, P. A. Development of the hematopoietic system and disorders of hematopoiesis that present during infancy and early childhood. *Pediatr Clin North Am*, v. 60, n. 6, p. 1273-89, Dec 2013. ISSN 0031-3955.

FERREIRA, H. S.; MOURA, F. A.; CABRAL, C. R., JR.; FLORENCIO, T. M.; VIEIRA, R. C.; DE ASSUNCAO, M. L. Short stature of mothers from an area endemic for

undernutrition is associated with obesity, hypertension and stunted children: a population-based study in the semi-arid region of Alagoas, Northeast Brazil. *Br J Nutr*, v. 101, n. 8, p. 1239-45, Apr 2009. ISSN 1475-2662 (Electronic) 0007-1145 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19017417> >.

FERRO-LUZZI, A.; SPADONI, M. A. Protein-energy malnutrition. *Prog Food Nutr Sci*, v. 2, n. 11-12, p. 515-41, 1978. ISSN 0306-0632 (Print) 0306-0632 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/100829> >.

FITZGERALD, D. C.; MEADE, K. G.; MCEVOY, A. N.; LILLIS, L.; MURPHY, E. P.; MACHUGH, D. E.; BAIRD, A. W. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases nuclear factor kappaB (NFkappaB) activity in and interleukin-8 (IL-8) release from bovine mammary epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*, v. 116, n. 1-2, p. 59-68, Mar 15 2007. ISSN 0165-2427 (Print) 0165-2427.

FLORENCIO, T. T.; FERREIRA, H. S.; CAVALCANTE, J. C.; ASSUNCAO, M. L.; SAWAYA, A. L. Short stature and food habits as determining factors for the low productivity of sugarcane labourers in the State of Alagoas, north-eastern Brazil. *Arch Latinoam Nutr*, v. 58, n. 1, p. 33-9, Mar 2008. ISSN 0004-0622 (Print) 0004-0622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18589570> >.

FOCK, R. Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição protéica experimental. Quantificação dos receptores de LSP (CD14/TLR-4) e do fator de transcrição NFkB. 2005. 218 (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Área de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

FOCK, R. A.; BLATT, S. L.; BEUTLER, B.; PEREIRA, J.; TSUJITA, M.; DE BARROS, F. E.; BORELLI, P. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. *Nutrition*, v. 26, n. 10, p. 1021-8, Oct 2010. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036516> >.

FOCK, R. A.; ROGERO, M. M.; VINOLO, M. A.; CURI, R.; BORGES, M. C.; BORELLI, P. Effects of protein-energy malnutrition on NF-kappaB signalling in murine peritoneal macrophages. *Inflammation*, v. 33, n. 2, p. 101-9, Apr 2010. ISSN 1573-2576 (Electronic) 0360-3997 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876726> >.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A.; BLATT, S. L.; BORELLI, P. Impairment of the hematological response and interleukin-1beta production in protein-energy malnourished mice after endotoxemia with lipopolysaccharide. *Braz J Med Biol Res*, v. 45, n. 12, p. 1163-71, Dec 2012. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22983177> >.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A.; CRISMA, A. R.; NAKAJIMA, K.; ROGERO, M. M.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition modifies the production of interleukin-10 in response to lipopolysaccharide (LPS) in a murine model. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, v. 54, n. 5, p. 371-7, Oct 2008. ISSN 0301-4800 (Print) 0301-4800 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19001768> >.

FOCK, R. A.; VINOLO, M. A.; DE MOURA SA ROCHA, V.; DE SA ROCHA, L. C.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine*, v. 40, n. 2, p. 105-14, Nov 2007. ISSN 1096-0023 (Electronic) 1043-4666 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17950615> >.

FREEMAN, A. F.; HOLLAND, S. M. Clinical manifestations, etiology, and pathogenesis of the hyper-IgE syndromes. *Pediatr Res*, v. 65, n. 5 Pt 2, p. 32r-37r, May 2009. ISSN 0031-3998.

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

FROLOV, M. V.; DYSON, N. J. Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *J Cell Sci*, v. 117, n. Pt 11, p. 2173-81, May 1 2004. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533.

FUCHS, E.; TUMBAR, T.; GUASCH, G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*, v. 116, n. 6, p. 769-78, Mar 19 2004. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

GADDUCCI, A.; COSIO, S.; FANUCCHI, A.; GENAZZANI, A. R. Malnutrition and cachexia in ovarian cancer patients: pathophysiology and management. *Anticancer Res*, v. 21, n. 4b, p. 2941-7, Jul-Aug 2001. ISSN 0250-7005 (Print) 0250-7005.

GAT-YABLONSKI, G.; PANDO, R.; PHILLIP, M. Nutritional catch-up growth. *World Rev Nutr Diet*, v. 106, p. 83-9, 2013. ISSN 0084-2230.

GAUR, U.; AGGARWAL, B. B. Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*, v. 66, n. 8, p. 1403-8, Oct 15 2003. ISSN 0006-2952 (Print) 0006-2952.

GLENN, J. D.; WHARTENBY, K. A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells*, v. 6, n. 5, p. 526-39, Nov 26 2014. ISSN 1948-0210.

GLENNIE, S.; SOEIRO, I.; DYSON, P. J.; LAM, E. W.; DAZZI, F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest energy of activated T cells. *Blood*, v. 105, n. 7, p. 2821-7, Apr 1 2005. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971.

GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*, v. 177, n. 2, p. 751-66, Feb 1949. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18110453> >.

GOTHARD, D.; DAWSON, J. I.; OREFFO, R. O. Assessing the potential of colony morphology for dissecting the CFU-F population from human bone marrow stromal cells. *Cell Tissue Res*, v. 352, n. 2, p. 237-47, May 2013. ISSN 0302-766x.

GRIVENNIKOV, S.; KARIN, E.; TERZIC, J.; MUCIDA, D.; YU, G. Y.; VALLABHAPURAPU, S.; SCHELLER, J.; ROSE-JOHN, S.; CHEROUTRE, H.; ECKMANN, L.; KARIN, M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, v. 15, n. 2, p. 103-13, Feb 3 2009. ISSN 1535-6108.

GROVER, Z.; EE, L. C. Protein energy malnutrition. *Pediatr Clin North Am*, v. 56, n. 5, p. 1055-68, Oct 2009. ISSN 0031-3955.

HAMILTON, C.; BOYCE, V. J. Addressing malnutrition in hospitalized adults. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, v. 37, n. 6, p. 808-15, Nov 2013. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674.

HARDIE, D. G. AMPK: a key regulator of energy balance in the single cell and the whole organism. *Int J Obes (Lond)*, v. 32 Suppl 4, p. S7-12, Sep 2008. ISSN 0307-0565.

HASTREITER, A. A. Avaliação de aspectos regulatórios da hematopoese em desnutrição proteico-energética experimental: papel das células endoteliais derivadas das células tronco mesenquimais medulares. 2014. 103 Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas, Universidade de São Paulo

HECHT, C.; WEBER, M.; GROTE, V.; DASKALOU, E.; DELL'ERA, L.; FLYNN, D.; GERASIMIDIS, K.; GOTTRAND, F.; HARTMAN, C.; HULST, J.; JOOSTEN, K.; KARAGIOZOGLOU-LAMPOUDI, T.; KOETSE, H. A.; KOLACEK, S.; KSIAZYK, J.; NISETEO, T.; OLSZEWSKA, K.; PAVESI, P.; PIWOWARCZYK, A.; ROUSSEAU, J.; SHAMIR, R.; SULLIVAN, P. B.; SZAJEWSKA, H.; VERNON-ROBERTS, A.; KOLETZKO, B. Disease associated malnutrition correlates with length of hospital stay in children. *Clin Nutr*, v. 34, n. 1, p. 53-9, Feb 2015. ISSN 0261-5614.

HERRMANN, R. P.; STURM, M. J. Adult human mesenchymal stromal cells and the treatment of graft versus host disease. *Stem Cells Cloning*, v. 7, p. 45-52, 2014. ISSN 1178-6957.

HICKMAN, D.; JONES, M. K.; ZHU, S.; KIRKPATRICK, E.; OSTROV, D. A.; WANG, X.; UKHANOVA, M.; SUN, Y.; MAI, V.; SALEMI, M.; KARST, S. M. The effect of malnutrition on norovirus infection. *MBio*, v. 5, n. 2, p. e01032-13, 2014.

HIGUERA, G. A.; SCHOP, D.; SPITTERS, T. W.; VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA, R.; BRACKE, M.; DE BRUIJN, J. D.; MARTENS, D.; KARPERIEN, M.; VAN BOXTEL, A.; VAN BLITTERSWIJK, C. A. Patterns of amino acid metabolism by proliferating human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A*, v. 18, n. 5-6, p. 654-64, Mar 2012. ISSN 1937-3341.

HIRSCH, J.; EVANS, D. Beyond the impact of food on genes. *Food Technol*, v. 59, n. 7, p. 24-33, 2005.

HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*, v. 316, n. 14, p. 2213-9, Aug 15 2010. ISSN 1090-2422 (Electronic) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471978> >.

HOOGDUIJN, M. J.; BETJES, M. G.; BAAN, C. C. Mesenchymal stromal cells for organ transplantation: different sources and unique characteristics? *Curr Opin Organ Transplant*, v. 19, n. 1, p. 41-6, Feb 2014. ISSN 1087-2418.

HOOPER, A. T.; BUTLER, J. M.; NOLAN, D. J.; KRANZ, A.; IIDA, K.; KOBAYASHI, M.; KOPP, H. G.; SHIDO, K.; PETIT, I.; YANGER, K.; JAMES, D.; WITTE, L.; ZHU, Z.; WU, Y.; PYTOWSKI, B.; ROSENWAKS, Z.; MITTAL, V.; SATO, T. N.; RAFII, S. Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell Stem Cell*, v. 4, n. 3, p. 263-74, Mar 6 2009. ISSN 1875-9777 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265665> >.

HSIEH, C. S.; MACATONIA, S. E.; TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science*, v. 260, n. 5107, p. 547-9, Apr 23 1993. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

HUBERT-BURON, A.; LEBLOND, J.; JACQUOT, A.; DUCROTTE, P.; DECHELOTTE, P.; COEFFIER, M. Glutamine pretreatment reduces IL-8 production in human intestinal epithelial cells by limiting I $\kappa$ B $\alpha$  ubiquitination. *J Nutr*, v. 136, n. 6, p. 1461-5, Jun 2006. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Rio de Janeiro: Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão 2010.

IMNA. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. Washington: The National Academies Press. 2005.

JANOWSKA-WIECZOREK, A.; MATSUZAKI, A.; L, A. M. The Hematopoietic Microenvironment: Matrix Metalloproteinases in the Hematopoietic Microenvironment. *Hematology*, v. 4, n. 6, p. 515-527, 2000. ISSN 1024-5332.

JARNICKI, A.; PUTOCZKI, T.; ERNST, M. Stat3: linking inflammation to epithelial cancer - more than a "gut" feeling? *Cell Div*, v. 5, p. 14, 2010. ISSN 1747-1028.

JENSEN, G. L.; BISTRAN, B.; ROUBENOFF, R.; HEIMBURGER, D. C. Malnutrition syndromes: a conundrum vs continuum. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, v. 33, n. 6, p. 710-6, Nov-Dec 2009. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071.

JIA, Y.; CONG, R.; LI, R.; YANG, X.; SUN, Q.; PARVIZI, N.; ZHAO, R. Maternal low-protein diet induces gender-dependent changes in epigenetic regulation of the glucose-6-phosphatase gene in newborn piglet liver. *J Nutr*, v. 142, n. 9, p. 1659-65, Sep 2012. ISSN 0022-3166.

JOBIN, C.; HOLT, L.; BRADHAM, C. A.; STREETZ, K.; BRENNER, D. A.; SARTOR, R. B. TNF receptor-associated factor-2 is involved in both IL-1 beta and TNF-alpha signaling cascades leading to NF-kappa B activation and IL-8 expression in human intestinal epithelial cells. *J Immunol*, v. 162, n. 8, p. 4447-54, Apr 15 1999. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

JONES, K. D.; THITIRI, J.; NGARI, M.; BERKLEY, J. A. Childhood malnutrition: toward an understanding of infections, inflammation, and antimicrobials. *Food Nutr Bull*, v. 35, n. 2 Suppl, p. S64-70, Jun 2014. ISSN 0379-5721 (Print) 0379-5721.

KANAUCHI, O.; SERIZAWA, I.; ARAKI, Y.; SUZUKI, A.; ANDOH, A.; FUJIYAMA, Y.; MITSUYAMA, K.; TAKAKI, K.; TOYONAGA, A.; SATA, M.; BAMBA, T. Germinated barley foodstuff, a prebiotic product, ameliorates inflammation of colitis through modulation of the enteric environment. *J Gastroenterol*, v. 38, n. 2, p. 134-41, 2003. ISSN 0944-1174 (Print) 0944-1174.

KANT, S.; SWAT, W.; ZHANG, S.; ZHANG, Z. Y.; NEEL, B. G.; FLAVELL, R. A.; DAVIS, R. J. TNF-stimulated MAP kinase activation mediated by a Rho family GTPase signaling pathway. *Genes Dev*, v. 25, n. 19, p. 2069-78, Oct 1 2011. ISSN 0890-9369.

KASSEM, M.; ABDALLAH, B. M. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res*, v. 331, n. 1, p. 157-63, Jan 2008. ISSN 1432-0878 (Electronic) 0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896115> >.

KESSEL, A.; TOUBI, E.; PAVLOTZKY, E.; MOGILNER, J.; CORAN, A. G.; LURIE, M.; KARRY, R.; SUKHOTNIK, I. Treatment with glutamine is associated with down-regulation of Toll-like receptor-4 and myeloid differentiation factor 88 expression and decrease in intestinal mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxaemia in a rat. *Clin Exp Immunol*, v. 151, n. 2, p. 341-7, Feb 2008. ISSN 0009-9104.

KEUSCH, G. T. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr*, v. 133, n. 1, p. 336S-340S, Jan 2003. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12514322> >.

KIEL, M. J.; RADICE, G. L.; MORRISON, S. J. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell*, v. 1, n. 2, p. 204-17, Aug 16 2007. ISSN 1875-9777 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18371351> >.

KIEL, M. J.; YILMAZ, O. H.; IWASHITA, T.; YILMAZ, O. H.; TERHORST, C.; MORRISON, S. J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, v. 121, n. 7, p. 1109-21, Jul 1 2005. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15989959> >.

KIM, D. S.; SHIN, M. R.; KIM, Y. S.; BAE, W. J.; ROH, D. H.; HWANG, Y. S.; KIM, E. C. Anti-inflammatory effects of glutamine on LPS-stimulated human dental pulp cells correlate with activation of MKP-1 and attenuation of the MAPK and NF-kappaB pathways. *Int Endod J*, v. 48, n. 3, p. 220-8, Mar 2015. ISSN 0143-2885.

KIM, H. Glutamine as an immunonutrient. *Yonsei Med J*, v. 52, n. 6, p. 892-7, Nov 2011. ISSN 0513-5796.

KIRKLAND, L. L.; KASHIWAGI, D. T.; BRANTLEY, S.; SCHEURER, D.; VARKEY, P. Nutrition in the hospitalized patient. *J Hosp Med*, v. 8, n. 1, p. 52-8, Jan 2013. ISSN 1553-5592.

KLYUSHNENKOVA, E.; MOSCA, J. D.; ZERNETKINA, V.; MAJUMDAR, M. K.; BEGGS, K. J.; SIMONETTI, D. W.; DEANS, R. J.; MCINTOSH, K. R. T cell responses to allogeneic human mesenchymal stem cells: immunogenicity, tolerance, and suppression. *J Biomed Sci*, v. 12, n. 1, p. 47-57, 2005. ISSN 1021-7770 (Print) 1021-7770.

KOK, S. H.; HONG, C. Y.; KUO, M. Y.; WANG, C. C.; HOU, K. L.; LIN, Y. T.; GALSON, D. L.; LIN, S. K. Oncostatin M-induced CCL2 transcription in osteoblastic cells is mediated by multiple levels of STAT-1 and STAT-3 signaling: an implication for the pathogenesis of arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 60, n. 5, p. 1451-62, May 2009. ISSN 0004-3591 (Print) 0004-3591.

KRAFT, M. D.; BTAICHE, I. F.; SACKS, G. S. Review of the refeeding syndrome. *Nutr Clin Pract*, v. 20, n. 6, p. 625-33, Dec 2005. ISSN 0884-5336 (Print) 0884-5336.

KRAWINKEL, M. Kwashiorkor is still not fully understood. *Bull World Health Organ*, v. 81, n. 12, p. 910-1, 2003. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686.

KRSTIC, A.; MOJSILOVIC, S.; JOVCIC, G.; BUGARSKI, D. The potential of interleukin-17 to mediate hematopoietic response. *Immunol Res*, v. 52, n. 1-2, p. 34-41, Apr 2012. ISSN 0257-277x.

KUCI, S.; KUCI, Z.; KREYENBERG, H.; DEAK, E.; PUTSCH, K.; HUENECKE, S.; AMARA, C.; KOLLER, S.; RETTINGER, E.; GREZ, M.; KOEHL, U.; LATIFI-PUPOVCI, H.; HENSCHLER, R.; TONN, T.; VON LAER, D.; KLINGEBIEL, T.; BADER, P. CD271 antigen defines a subset of multipotent stromal cells with immunosuppressive and lymphohematopoietic engraftment-promoting properties. *Haematologica*, v. 95, n. 4, p. 651-9, Apr 2010. ISSN 1592-8721 (Electronic) 0390-6078 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20179086> >.

KUNISAKI, Y.; BRUNS, I.; SCHEIERMANN, C.; AHMED, J.; PINHO, S.; ZHANG, D.; MIZOGUCHI, T.; WEI, Q.; LUCAS, D.; ITO, K.; MAR, J. C.; BERGMAN, A.; FRENETTE, P. S. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. *Nature*, v. 502, n. 7473, p. 637-43, Oct 31 2013. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24107994> >.

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

KYURKCHIEV, D.; BOCHEV, I.; IVANOVA-TODOROVA, E.; MOURDJEVA, M.; ORESHKOVA, T.; BELEMEZOVA, K.; KYURKCHIEV, S. Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells. *World J Stem Cells*, v. 6, n. 5, p. 552-70, Nov 26 2014. ISSN 1948-0210.

LANDGRAF, M. A.; TOSTES RDE, C.; BORELLI, P.; ZORN, T. M.; NIGRO, D.; CARVALHO, M. H.; FORTES, Z. B. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. *Nutrition*, v. 23, n. 2, p. 145-56, Feb 2007. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007.

LEAN, M. E. J. Principles of human nutrition. *Medicine*, v. 39, n. 1, p. 1-5, 2010.

LEE, G. R.; HERBERT, E. Nutritional factors in the production and function of erythrocytes. In: LEE, G. R. (Ed.). *Wintrobe's clinical hematology*. 10: Williams & Wilkins, v.1, 1999. p.228-266.

LEONARDI, E.; GIRLANDO, S.; SERIO, G.; MAURI, F. A.; PERRONE, G.; SCAMPINI, S.; DALLA PALMA, P.; BARBARESCHI, M. PCNA and Ki67 expression in breast carcinoma: correlations with clinical and biological variables. *J Clin Pathol*, v. 45, n. 5, p. 416-9, May 1992. ISSN 0021-9746 (Print) 0021-9746.

LEVESQUE, J. P.; WINKLER, I. G. Hierarchy of immature hematopoietic cells related to blood flow and niche. *Curr Opin Hematol*, v. 18, n. 4, p. 220-5, Jul 2011. ISSN 1065-6251.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 21, p. 605-31, 2005. ISSN 1081-0706 (Print) 1081-0706 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16212509> >.

LI, P.; YIN, Y. L.; LI, D.; KIM, S. W.; WU, G. Amino acids and immune function. *Br J Nutr*, v. 98, n. 2, p. 237-52, Aug 2007. ISSN 0007-1145 (Print) 0007-1145.

LIEBERMANN, D. A.; HOFFMAN, B. Gadd45 in the response of hematopoietic cells to genotoxic stress. *Blood Cells Mol Dis*, v. 39, n. 3, p. 329-35, Nov-Dec 2007. ISSN 1079-9796 (Print) 1079-9796.

LIMA, A. L.; SILVA, A. C.; KONNO, S. C.; CONDE, W. L.; BENICIO, M. H.; MONTEIRO, C. A. Causes of the accelerated decline in child undernutrition in Northeastern Brazil (1986-1996-2006). *Rev Saude Publica*, v. 44, n. 1, p. 17-27, Feb 2010. ISSN 0034-8910.

LIU, Y.; DONG, W.; CHEN, L.; XIANG, R.; XIAO, H.; DE, G.; WANG, Z.; QI, Y. BCL10 mediates lipopolysaccharide/toll-like receptor-4 signaling through interaction with Pellino2. *J Biol Chem*, v. 279, n. 36, p. 37436-44, Sep 3 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

LORD, B. I.; DEXTER, T. M. Which are the hematopoietic stem cells? [or: don't debunk the history!]. *Exp Hematol*, v. 23, n. 12, p. 1237-41, Nov 1995. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472x.

MACIVER, N. J.; JACOBS, S. R.; WIEMAN, H. L.; WOFFORD, J. A.; COLOFF, J. L.; RATHMELL, J. C. Glucose metabolism in lymphocytes is a regulated process with significant effects on immune cell function and survival. *J Leukoc Biol*, v. 84, n. 4, p. 949-57, Oct 2008. ISSN 0741-5400 (Print) 0741-5400.

MALAFAIA, G.; MARTINS, R.; SILVA, M. Avaliação dos efeitos, em curto prazo, da deficiência protéica nos parâmetros físicos e bioquímicos de camundongos Swiss. *Rev Saúde e Biol*, v. 4, n. 2, p. 21-33, 2009. ISSN 1980-0002.

MALONE, A.; HAMILTON, C. The Academy of Nutrition and Dietetics/the American Society for Parenteral and Enteral Nutrition consensus malnutrition characteristics: application in practice. *Nutr Clin Pract*, v. 28, n. 6, p. 639-50, Dec 2013. ISSN 1941-2452 (Electronic) 0884-5336 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24177285> >

MARCOS, A. Eating disorders: a situation of malnutrition with peculiar changes in the immune system. *Eur J Clin Nutr*, v. 54 Suppl 1, p. S61-4, Mar 2000. ISSN 0954-3007 (Print) 0954-3007.

MAYANI, H.; GUILBERT, L. J.; JANOWSKA-WIECZOREK, A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haematol*, v. 49, n. 5, p. 225-33, Nov 1992. ISSN 0902-4441 (Print) 0902-4441 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1473584> >.

MCCARTER, M. D.; NAAMA, H. A.; SHOU, J.; KWI, L. X.; EVOY, D. A.; CALVANO, S. E.; DALY, J. M. Altered macrophage intracellular signaling induced by protein-calorie malnutrition. *Cell Immunol*, v. 183, n. 2, p. 131-6, Feb 1 1998. ISSN 0008-8749 (Print) 0008-8749.

MEIJERS, J. M.; VAN BOKHORST-DE VAN DER SCHUEREN, M. A.; SCHOLS, J. M.; SOETERS, P. B.; HALFENS, R. J. Defining malnutrition: mission or mission impossible? *Nutrition*, v. 26, n. 4, p. 432-40, Apr 2010. ISSN 0899-9007.

MELLO, A. S.; DE OLIVEIRA, D. C.; BIZZARRO, B.; SA-NUNES, A.; HASTREITER, A. A.; BELTRAN, J. S.; XAVIER, J. G.; 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 balance. *Inflammation*, v. 37, n. 6, p. 2125-38, Dec 2014. ISSN 0360-3997.

MENDEZ-FERRER, S.; MICHURINA, T. V.; FERRARO, F.; MAZLOOM, A. R.; MACARTHUR, B. D.; LIRA, S. A.; SCADDEN, D. T.; MA'AYAN, A.; ENIKOLOPOV, G. N.; FRENETTE, P. S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, v. 466, n. 7308, p. 829-34, Aug 12 2010. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20703299> >.

MENDEZ-FERRER, S.; SCADDEN, D. T.; SANCHEZ-AGUILERA, A. Bone marrow stem cells: current and emerging concepts. *Ann N Y Acad Sci*, v. 1335, n. 1, p. 32-44, Jan 2015. ISSN 0077-8923.

MERCER, L. P.; KELLEY, D. S.; HUMPHRIES, L. L.; DUNN, J. D. Manipulation of central nervous system histamine or histaminergic receptors (H1) affects food intake in rats. *J Nutr*, v. 124, n. 7, p. 1029-36, Jul 1994. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7913125> >.

MITHAL, A.; BONJOUR, J. P.; BOONEN, S.; BURCKHARDT, P.; DEGENS, H.; EL HAJJ FULEIHAN, G.; JOSSE, R.; LIPS, P.; MORALES TORRES, J.; RIZZOLI, R.; YOSHIMURA, N.; WAHL, D. A.; COOPER, C.; DAWSON-HUGHES, B. Impact of nutrition on muscle mass, strength, and performance in older adults. *Osteoporos Int*, v. 24, n. 5, p. 1555-66, May 2013. ISSN 0937-941x.

MIZOCK, B. A. Immunonutrition and critical illness: an update. *Nutrition*, v. 26, n. 7-8, p. 701-7, Jul-Aug 2010. ISSN 0899-9007.

MONTE, C. [Malnutrition: a secular challenge to child nutrition]. *J Pediatr (Rio J)*, v. 76 Suppl 3, p. S285-97, Nov 2000. ISSN 1678-4782 (Electronic) 0021-7557 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676906> >.

MONTEIRO, C. A. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estudos Avançados*, v. 17, n. 48, p. 7-20, 2003. ISSN 0103-4014.

MONTEIRO, C. A.; BENICIO, M. H.; KONNO, S. C.; SILVA, A. C.; LIMA, A. L.; CONDE, W. L. Causes for the decline in child under-nutrition in Brazil, 1996-2007. *Rev Saude Publica*, v. 43, n. 1, p. 35-43, Feb 2009. ISSN 1518-8787 (Electronic) 0034-8910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19169574> >.

MORIKAWA, S.; MABUCHI, Y.; KUBOTA, Y.; NAGAI, Y.; NIIBE, K.; HIRATSU, E.; SUZUKI, S.; MIYAUCHI-HARA, C.; NAGOSHI, N.; SUNABORI, T.; SHIMMURA, S.; MIYAWAKI, A.; NAKAGAWA, T.; SUDA, T.; OKANO, H.; MATSUZAKI, Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med*, v. 206, n. 11, p. 2483-96, Oct 26 2009. ISSN 1540-9538 (Electronic) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19841085> >.

MOSAAD, Y. M. Hematopoietic stem cells: an overview. *Transfus Apher Sci*, v. 51, n. 3, p. 68-82, Dec 2014. ISSN 1473-0502 (Print) 1473-0502.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983. ISSN 0022-1759 (Print) 0022-1759.

MUDTER, J.; NEURATH, M. F. Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis*, v. 13, n. 8, p. 1016-23, Aug 2007. ISSN 1078-0998 (Print) 1078-0998.

MULLER-SIEBURG, C. E.; DERYUGINA, E. The stromal cells' guide to the stem cell universe. *Stem Cells*, v. 13, n. 5, p. 477-86, Sep 1995. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099.

NAJERA, O.; GONZALEZ, C.; TOLEDO, G.; LOPEZ, L.; ORTIZ, R. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 11, n. 3, p. 577-80, May 2004. ISSN 1071-412X (Print) 1071-412x.

NAKAJIMA, K. Avaliação do ciclo celular de células-tronco/progenitoras hemopoéticas de medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica. 2010. 170 (Tese de Doutorado). Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

NAKAJIMA, K.; CRISMA, A. R.; SILVA, G. B.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A.; BORELLI, P. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. *Nutrition*, v. 30, n. 1, p. 82-9, Jan 2014. ISSN 1873-1244 (Electronic) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24290603> >.

NAKAYAMADA, S.; TAKAHASHI, H.; KANNO, Y.; O'SHEA, J. J. Helper T cell diversity and plasticity. *Curr Opin Immunol*, v. 24, n. 3, p. 297-302, Jun 2012. ISSN 0952-7915.

NASSIRI, F.; CUSIMANO, M. D.; SCHEITHAUER, B. W.; ROTONDO, F.; FAZIO, A.; YOUSEF, G. M.; SYRO, L. V.; KOVACS, K.; LLOYD, R. V. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. *Anticancer Res*, v. 31, n. 6, p. 2283-90, Jun 2011. ISSN 1791-7530 (Electronic) 0250-7005 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21737653> >.

NAUTA, A. J.; KRUISSELBRINK, A. B.; LURVINK, E.; WILLEMZE, R.; FIBBE, W. E. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, v. 177, n. 4, p. 2080-7, Aug 15 2006. ISSN 0022-1767 (Print) 0022-1767.

NEU, J.; MIHATSCH, W. A.; ZEGARRA, J.; SUPAPANNACHART, S.; DING, Z. Y.; MURGUIA-PENICHE, T. Intestinal mucosal defense system, Part 1. Consensus recommendations for immunonutrients. *J Pediatr*, v. 162, n. 3 Suppl, p. S56-63, Mar 2013. ISSN 0022-3476.

NEWSHOLME, P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, postinjury, surgery or infection? *J Nutr*, v. 131, n. 9 Suppl, p. 2515S-22S; discussion 2523S-4S, Sep 2001. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166.

NIIYA, T.; AKBAR, S. M.; YOSHIDA, O.; MIYAKE, T.; MATSUURA, B.; MURAKAMI, H.; ABE, M.; HIASA, Y.; ONJI, M. Impaired dendritic cell function resulting from chronic undernutrition disrupts the antigen-specific immune response in mice. *J Nutr*, v. 137, n. 3, p. 671-5, Mar 2007. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166.

NISHIHARA, M.; OGURA, H.; UEDA, N.; TSURUOKA, M.; KITABAYASHI, C.; TSUJI, F.; AONO, H.; ISHIHARA, K.; HUSEBY, E.; BETZ, U. A.; MURAKAMI, M.; HIRANO, T. IL-6-gp130-STAT3 in T cells directs the development of IL-17+ Th with a minimum effect on that of Treg in the steady state. *Int Immunol*, v. 19, n. 6, p. 695-702, Jun 2007. ISSN 0953-8178 (Print) 0953-8178.

NORMAN, K.; STOBAUS, N.; GONZALEZ, M. C.; SCHULZKE, J. D.; PIRLICH, M. Hand grip strength: outcome predictor and marker of nutritional status. *Clin Nutr*, v. 30, n. 2, p. 135-42, Apr 2011. ISSN 0261-5614.

NOVA, E.; SAMARTIN, S.; GOMEZ, S.; MORANDE, G.; MARCOS, A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. *Eur J Clin Nutr*, v. 56 Suppl 3, p. S34-7, Aug 2002. ISSN 0954-3007 (Print) 0954-3007.

NUTTALL, F. Q.; NGO, A.; GANNON, M. C. Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes Metab Res Rev*, v. 24, n. 6, p. 438-58, Sep 2008. ISSN 1520-7552 (Print) 1520-7552.

OPAL, S. M.; ESMON, C. T. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. *Crit Care*, v. 7, n. 1, p. 23-38, Feb 2003. ISSN 1364-8535 (Print) 1364-8535.

OREFFO, R. O.; LASHBROOKE, B.; ROACH, H. I.; CLARKE, N. M.; COOPER, C. Maternal protein deficiency affects mesenchymal stem cell activity in the developing offspring. *Bone*, v. 33, n. 1, p. 100-7, Jul 2003. ISSN 8756-3282 (Print) 1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12919704> >.

ORTIZ, R.; CORTES, L.; CORTES, E.; MEDINA, H. Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats. *Clin Exp Immunol*, v. 155, n. 1, p. 96-106, Jan 2009. ISSN 0009-9104.

PAPIER, K.; WILLIAMS, G. M.; LUCERES-CATUBIG, R.; AHMED, F.; OLVEDA, R. M.; MCMANUS, D. P.; CHY, D.; CHAU, T. N.; GRAY, D. J.; ROSS, A. G. Childhood malnutrition and parasitic helminth interactions. *Clin Infect Dis*, v. 59, n. 2, p. 234-43, Jul 15 2014. ISSN 1058-4838.

PARK, S. E.; KIM, S.; OUMA, C.; LOHA, M.; WIERZBA, T. F.; BECK, N. S. Community management of acute malnutrition in the developing world. *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*, v. 15, n. 4, p. 210-9, Dec 2012. ISSN 2234-8646 (Print) 2234-8840.

PERKINS, N. D. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, v. 8, n. 1, p. 49-62, Jan 2007. ISSN 1471-0072 (Print) 1471-0072.

PERUCCA, P.; CAZZALINI, O.; MADINE, M.; SAVIO, M.; LASKEY, R. A.; VANNINI, V.; PROSPERI, E.; STIVALA, L. A. Loss of p21 CDKN1A impairs entry to quiescence and activates a DNA damage response in normal fibroblasts induced to quiescence. *Cell Cycle*, v. 8, n. 1, p. 105-14, Jan 1 2009. ISSN 1551-4005.

PHINNEY, D. G. Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *J Cell Biochem*, v. 113, n. 9, p. 2806-12, Sep 2012. ISSN 1097-4644 (Electronic) 0730-2312 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22511358> >.

PITTINGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 284, n. 5411, p. 143-7, Apr 2 1999. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

PONTIKOGLU, C.; DESCHASEAUX, F.; SENSEBE, L.; PAPADAKI, H. A. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev*, v. 7, n. 3, p. 569-89, Sep 2011. ISSN 1550-8943.

POWANDA, M. C.; BEISEL, W. R. Metabolic effects of infection on protein and energy status. *J Nutr*, v. 133, n. 1, p. 322s-327s, Jan 2003. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166.

PREVOSTO, C.; ZANCOLLI, M.; CANEVALI, P.; ZOCCHI, M. R.; POGGI, A. Generation of CD4+ or CD8+ regulatory T cells upon mesenchymal stem cell-lymphocyte interaction. *Haematologica*, v. 92, n. 7, p. 881-8, Jul 2007. ISSN 0390-6078.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*, v. 21, n. 6, p. 775-7, Jun 2005. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15925305> >.

RATAJCZAK, M. Z.; KIM, C. H.; WOJAKOWSKI, W.; JANOWSKA-WIECZOREK, A.; KUCIA, M.; RATAJCZAK, J. Innate immunity as orchestrator of stem cell mobilization. *Leukemia*, v. 24, n. 10, p. 1667-75, Oct 2010. ISSN 0887-6924.

REEVES, P. G. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr*, v. 127, n. 5 Suppl, p. 838S-841S, May 1997. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9164249> >.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr*, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.

RENARD, P.; ZACHARY, M. D.; BOUGELET, C.; MIRAULT, M. E.; HAEGEMAN, G.; REMACLE, J.; RAES, M. Effects of antioxidant enzyme modulations on interleukin-1-induced nuclear factor kappa B activation. *Biochem Pharmacol*, v. 53, n. 2, p. 149-60, Jan 24 1997. ISSN 0006-2952 (Print) 0006-2952.

RENNIE, M. J.; AHMED, A.; KHOGALI, S. E.; LOW, S. Y.; HUNDAL, H. S.; TAYLOR, P. M. Glutamine metabolism and transport in skeletal muscle and heart and their clinical relevance. *J Nutr*, v. 126, n. 4 Suppl, p. 1142s-9s, Apr 1996. ISSN 0022-3166 (Print) 0022-3166.

RENSTROM, J.; KROGER, M.; PESCHEL, C.; OOSTENDORP, R. A. How the niche regulates hematopoietic stem cells. *Chem Biol Interact*, v. 184, n. 1-2, p. 7-15, Mar 19 2010. ISSN 1872-7786 (Electronic) 0009-2797 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19944675> >.

RIETSCHER, E. T.; KIRIKAE, T.; SCHADE, F. U.; MAMAT, U.; SCHMIDT, G.; LOPPNOW, H.; ULMER, A. J.; ZHRINGER, U.; SEYDEL, U.; DI PADOVA, F.; ET AL. Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *Faseb j*, v. 8, n. 2, p. 217-25, Feb 1994. ISSN 0892-6638 (Print) 0892-6638.

RIVADENEIRA, D. E.; GROBMYER, S. R.; NAAMA, H. A.; MACKRELL, P. J.; MESTRE, J. R.; STAPLETON, P. P.; DALY, J. M. Malnutrition-induced macrophage apoptosis. *Surgery*, v. 129, n. 5, p. 617-25, May 2001. ISSN 0039-6060 (Print) 0039-6060.

RODKEY, F. L. Direct Spectrophotometric Determination of Albumin in Human Serum. *Clin Chem*, v. 11, p. 478-87, Apr 1965. ISSN 0009-9147 (Print) 0009-9147 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14277286> >.

RODRIGUEZ, L.; CERVANTES, E.; ORTIZ, R. Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: a public health problem. *Int J Environ Res Public Health*, v. 8, n. 4, p. 1174-205, Apr 2011. ISSN 1660-4601.

RODRIGUEZ, L.; GONZALEZ, C.; FLORES, L.; JIMENEZ-ZAMUDIO, L.; GRANIEL, J.; ORTIZ, R. Assessment by flow cytometry of cytokine production in malnourished children. *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 12, n. 4, p. 502-7, Apr 2005. ISSN 1071-412X (Print) 1071-412x.

ROGERO, M. M.; BORELLI, P.; FOCK, R. A.; DE OLIVEIRA PIRES, I. S.; TIRAPEGUI, J. Glutamine in vitro supplementation partly reverses impaired macrophage function resulting from early weaning in mice. *Nutrition*, v. 24, n. 6, p. 589-98, Jun 2008. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007.

ROGERO, M. M.; BORELLI, P.; VINOLO, M. A.; FOCK, R. A.; DE OLIVEIRA PIRES, I. S.; TIRAPEGUI, J. Dietary glutamine supplementation affects macrophage function, hematopoiesis and nutritional status in early weaned mice. *Clin Nutr*, v. 27, n. 3, p. 386-97, Jun 2008. ISSN 0261-5614.

ROSENBAUM, K.; WANG, J.; PIERSON, R. N., JR.; KOTLER, D. P. Time-dependent variation in weight and body composition in healthy adults. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, v. 24, n. 2, p. 52-5, Mar-Apr 2000. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071.

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

ROTH, E. Immune and cell modulation by amino acids. *Clin Nutr*, v. 26, n. 5, p. 535-44, Oct 2007. ISSN 0261-5614 (Print) 0261-5614.

RUST, D. M.; SIMPSON, J. K.; LISTER, J. Nutritional issues in patients with severe neutropenia. *Semin Oncol Nurs*, v. 16, n. 2, p. 152-62, May 2000. ISSN 0749-2081 (Print) 0749-2081.

SACKS, G. S.; DEARMAN, K.; REPLOGLE, W. H.; CORA, V. L.; MEEKS, M.; CANADA, T. Use of subjective global assessment to identify nutrition-associated complications and death in geriatric long-term care facility residents. *J Am Coll Nutr*, v. 19, n. 5, p. 570-7, Oct 2000. ISSN 0731-5724 (Print) 0731-5724.

SATO, T.; TERAJ, M.; TAMURA, Y.; ALEXEEV, V.; MASTRANGELO, M. J.; SELVAN, S. R. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*, v. 51, n. 2-3, p. 170-82, Dec 2011. ISSN 0257-277x.

SATOH, Y.; MATSUMURA, I.; TANAKA, H.; EZOE, S.; SUGAHARA, H.; MIZUKI, M.; SHIBAYAMA, H.; ISHIKO, E.; ISHIKO, J.; NAKAJIMA, K.; KANAKURA, Y. Roles for c-Myc in self-renewal of hematopoietic stem cells. *J Biol Chem*, v. 279, n. 24, p. 24986-93, Jun 11 2004. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

SATYANARAYANA, A.; KALDIS, P. Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene*, v. 28, n. 33, p. 2925-39, Aug 20 2009. ISSN 0950-9232.

SAUCILLO, D. C.; GERRIETS, V. A.; SHENG, J.; RATHMELL, J. C.; MACIVER, N. J. Leptin metabolically licenses T cells for activation to link nutrition and immunity. *J Immunol*, v. 192, n. 1, p. 136-44, Jan 1 2014. ISSN 0022-1767.

SAUNDERS, J.; SMITH, T. Malnutrition: causes and consequences. *Clin Med*, v. 10, n. 6, p. 624-7, Dec 2010. ISSN 1470-2118 (Print) 1470-2118 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413492> >.

SAUNDERS, J.; SMITH, T.; STROUD, M. Malnutrition and undernutrition. *Medicine*, v. 39, n. 1, p. 45-50, 2011.

SAVINO, W. The thymus gland is a target in malnutrition. *Eur J Clin Nutr*, v. 56 Suppl 3, p. S46-9, Aug 2002. ISSN 0954-3007 (Print) 0954-3007.

SAWAYA, A. L. Desnutrição: consequências a longo prazo e efeitos da recuperação nutricional. *Estudos Avançados*, v. 58, p. 147-158, 2006.

SCHOENBORN, J. R.; WILSON, C. B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol*, v. 96, p. 41-101, 2007. ISSN 0065-2776 (Print) 0065-2776.

SCHOFIELD, C.; ASHWORTH, A. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high? *Bull World Health Organ*, v. 74, n. 2, p. 223-9, 1996. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706239> >.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*, v. 4, n. 1-2, p. 7-25, 1978. ISSN 0340-4684 (Print) 0340-4684.

SCHOP, D.; JANSSEN, F. W.; BORGART, E.; DE BRUIJN, J. D.; VAN DIJKHUIZEN-RADERSMA, R. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med*, v. 2, n. 2-3, p. 126-35, Mar-Apr 2008. ISSN 1932-6254 (Print) 1932-6254.

SCHUMANN, R. R.; LEONG, S. R.; FLAGGS, G. W.; GRAY, P. W.; WRIGHT, S. D.; MATHISON, J. C.; TOBIAS, P. S.; ULEVITCH, R. J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*, v. 249, n. 4975, p. 1429-31, Sep 21 1990. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

SHI, Y.; HU, G.; SU, J.; LI, W.; CHEN, Q.; SHOU, P.; XU, C.; CHEN, X.; HUANG, Y.; ZHU, Z.; HUANG, X.; HAN, X.; XIE, N.; REN, G. Mesenchymal stem cells: a new

strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*, v. 20, n. 5, p. 510-8, May 2010. ISSN 1001-0602.

SKIPPER, A.; FERGUSON, M.; THOMPSON, K.; CASTELLANOS, V. H.; PORCARI, J. Nutrition screening tools: an analysis of the evidence. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, v. 36, n. 3, p. 292-8, May 2012. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071.

SOETERS, P. B.; REIJVEN, P. L.; VAN BOKHORST-DE VAN DER SCHUEREN, M. A.; SCHOLS, J. M.; HALFENS, R. J.; MEIJERS, J. M.; VAN GEMERT, W. G. A rational approach to nutritional assessment. *Clin Nutr*, v. 27, n. 5, p. 706-16, Oct 2008. ISSN 0261-5614.

SOTIROPOULOU, P. A.; PEREZ, S. A.; SALAGIANNI, M.; BAXEVANIS, C. N.; PAPAMICHAIL, M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 24, n. 2, p. 462-71, Feb 2006. ISSN 1066-5099 (Print) 1066-5099.

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

STIER, S.; KO, Y.; FORKERT, R.; LUTZ, C.; NEUHAUS, T.; GRUNEWALD, E.; CHENG, T.; DOMBKOWSKI, D.; CALVI, L. M.; RITTLING, S. R.; SCADDEN, D. T. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med*, v. 201, n. 11, p. 1781-91, Jun 6 2005. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15928197> >.

STINNETT, J. D. *Nutrition and the immune response*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1983.

TABERA, S.; PEREZ-SIMON, J. A.; DIEZ-CAMPELO, M.; SANCHEZ-ABARCA, L. I.; BLANCO, B.; LOPEZ, A.; BENITO, A.; OCIO, E.; SANCHEZ-GUIJO, F. M.; CANIZO, C.; SAN MIGUEL, J. F. The effect of mesenchymal stem cells on the viability, proliferation and differentiation of B-lymphocytes. *Haematologica*, v. 93, n. 9, p. 1301-9, Sep 2008. ISSN 0390-6078.

TAICHMAN, R. S.; EMERSON, S. G. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*, v. 179, n. 5, p. 1677-82, May 1 1994. ISSN 0022-1007 (Print) 0022-1007 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7513014> >.

TAPIERO, H.; MATHE, G.; COUVREUR, P.; TEW, K. D. II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother*, v. 56, n. 9, p. 446-57, Nov 2002. ISSN 0753-3322 (Print) 0753-3322.

TAYLOR, A. K.; CAO, W.; VORA, K. P.; DE LA CRUZ, J.; SHIEH, W. J.; ZAKI, S. R.; KATZ, J. M.; SAMBHARA, S.; GANGAPPA, S. Protein energy malnutrition decreases immunity and increases susceptibility to influenza infection in mice. *J Infect Dis*, v. 207, n. 3, p. 501-10, Feb 1 2013. ISSN 0022-1899.

TRAVIS, M. A.; SHEPPARD, D. TGF-beta activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*, v. 32, p. 51-82, 2014. ISSN 0732-0582.

TSE, W. T.; PENDLETON, J. D.; BEYER, W. M.; EGALKA, M. C.; GUINAN, E. C. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, v. 75, n. 3, p. 389-97, Feb 15 2003. ISSN 0041-1337 (Print) 0041-1337.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, v. 8, n. 9, p. 726-36, Sep 2008. ISSN 1474-1733 (Print) 1474-1733.

UYANGAA, E.; LEE, H. K.; EO, S. K. Glutamine and leucine provide enhanced protective immunity against mucosal infection with herpes simplex virus type 1. *Immune Netw*, v. 12, n. 5, p. 196-206, Oct 2012. ISSN 1598-2629 (Print) 1598-2629.

VANDEWALLE, A. Toll-like receptors and renal bacterial infections. *Chang Gung Med J*, v. 31, n. 6, p. 525-37, Nov-Dec 2008. ISSN 2072-0939 (Print) 2072-0939.

VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. *Hematology*, v. 10 Suppl 1, p. 293-6, 2005. ISSN 1024-5332 (Print) 1024-5332.

VILLARINO, A. V.; KANNO, Y.; FERDINAND, J. R.; O'SHEA, J. J. Mechanisms of Jak/STAT Signaling in Immunity and Disease. *J Immunol*, v. 194, n. 1, p. 21-27, Jan 1 2015. ISSN 0022-1767.

VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. *Braz J Med Biol Res*, v. 33, n. 8, p. 889-95, Aug 2000. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10920430> >.

WADHWA, M.; THORPE, R. Haematopoietic growth factors and their therapeutic use. *Thromb Haemost*, v. 99, n. 5, p. 863-73, May 2008. ISSN 0340-6245 (Print)

0340-6245 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18449415> >.

WAITZBERG, D. L. Nutrição enteral e parenteral na prática clínica. 3. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.

WAITZBERG, D. L.; PLOPPER, C.; TERRA, R. M. Postoperative total parenteral nutrition. *World J Surg*, v. 23, n. 6, p. 560-4, Jun 1999. ISSN 0364-2313 (Print) 0364-2313.

WANG, L.; ZHAO, Y.; SHI, S. Interplay between mesenchymal stem cells and lymphocytes: implications for immunotherapy and tissue regeneration. *J Dent Res*, v. 91, n. 11, p. 1003-10, Nov 2012. ISSN 0022-0345.

WANG, Y.; CHEN, X.; CAO, W.; SHI, Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*, v. 15, n. 11, p. 1009-16, Nov 2014. ISSN 1529-2908.

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

WATERLOW, J. C.; TOMKINS, A.; GRANTHAM-MCGREGOR, S. M. Malnutrición proteico-energética. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud, 1996. ix, 501 p. ISBN 9275315558.

WESTERTERP-PLANTENGA, M. S.; NIEUWENHUIZEN, A.; TOME, D.; SOENEN, S.; WESTERTERP, K. R. Dietary protein, weight loss, and weight maintenance. *Annu Rev Nutr*, v. 29, p. 21-41, 2009. ISSN 0199-9885.

WHITE, B.; DEAN, R.; MARTIN, R. An association between low levels of dietary protein, elevated NPY gene expression in basomedial hypothalamus and increased food intake. *Nutritional Neurosciences*, v. 1, p. 173-182, 1998.

WHITE, J. V.; GUENTER, P.; JENSEN, G.; MALONE, A.; SCHOFIELD, M. Consensus statement: Academy of Nutrition and Dietetics and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition: characteristics recommended for the identification and documentation of adult malnutrition (undernutrition). *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, v. 36, n. 3, p. 275-83, May 2012. ISSN 0148-6071 (Print) 0148-6071.

WHO. Global burden of protein-energy malnutrition in the year 2000. 2011. Disponível em: < [http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod\\_malnutrition.pdf](http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_malnutrition.pdf) >. Acesso em: 06/05.

WISCHMEYER, P. E.; RIEHM, J.; SINGLETON, K. D.; REN, H.; MUSCH, M. W.; KAHANA, M.; CHANG, E. B. Glutamine attenuates tumor necrosis factor-alpha release and enhances heat shock protein 72 in human peripheral blood mononuclear cells. *Nutrition*, v. 19, n. 1, p. 1-6, Jan 2003. ISSN 0899-9007 (Print) 0899-9007.

WOLF, M. R.; BARROS FILHO ADE, A. [Nutritional status of beneficiaries of the Bolsa Familia Program in Brazil - a systematic review]. *Cien Saude Colet*, v. 19, n. 5, p. 1331-8, May 2014. ISSN 1678-4561 (Electronic) 1413-8123 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24897198> >.

WOODWARD, B. D.; WOODS, J. W.; CROUCH, D. A. Direct evidence that primary acquired cell-mediated immunity is less resistant than is primary thymus-dependent humoral immunity to the depressive influence of wasting protein-energy malnutrition in weanling mice. *Am J Clin Nutr*, v. 55, n. 6, p. 1180-5, Jun 1992. ISSN 0002-9165 (Print) 0002-9165.

XAVIER, J. G.; FAVERO, M. E.; VINOLO, M. A.; ROGERO, M. M.; DAGLI, M. L.; ARANA-CHAVEZ, V. E.; BOROJEVIC, R.; BORELLI, P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histol Histopathol*, v. 22, n. 6, p. 651-60, Jun 2007. ISSN 1699-5848 (Electronic) 0213-3911 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17357095> >.

YANG, R.; LIU, Y.; KELK, P.; QU, C.; AKIYAMA, K.; CHEN, C.; ATSUTA, I.; CHEN, W.; ZHOU, Y.; SHI, S. A subset of IL-17(+) mesenchymal stem cells possesses anti-Candida albicans effect. *Cell Res*, v. 23, n. 1, p. 107-21, Jan 2013. ISSN 1001-0602.

YI, T.; SONG, S. U. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res*, v. 35, n. 2, p. 213-21, Feb 2012. ISSN 0253-6269 (Print) 0253-6269.

YUNEVA, M.; ZAMBONI, N.; OEFNER, P.; SACHIDANANDAM, R.; LAZEBNIK, Y. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. *J Cell Biol*, v. 178, n. 1, p. 93-105, Jul 2 2007. ISSN 0021-9525 (Print) 0021-9525.

ZHANG, J.; NIU, C.; YE, L.; HUANG, H.; HE, X.; TONG, W. G.; ROSS, J.; HAUG, J.; JOHNSON, T.; FENG, J. Q.; HARRIS, S.; WIEDEMANN, L. M.; MISHINA, Y.; LI, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size.

Nature, v. 425, n. 6960, p. 836-41, Oct 23 2003. ISSN 1476-4687 (Electronic) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14574412> >.

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

ZHANG, Y.; REYNOLDS, J. M.; CHANG, S. H.; MARTIN-OROZCO, N.; CHUNG, Y.; NURIEVA, R. I.; DONG, C. MKP-1 is necessary for T cell activation and function. *J Biol Chem*, v. 284, n. 45, p. 30815-24, Nov 6 2009. ISSN 0021-9258.

ZHONG, Z.; WEN, Z.; DARNELL, J. E., JR. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*, v. 264, n. 5155, p. 95-8, Apr 1 1994. ISSN 0036-8075 (Print) 0036-8075.

ZIEGLER, T. R.; OGDEN, L. G.; SINGLETON, K. D.; LUO, M.; FERNANDEZ-ESTIVARIZ, C.; GRIFFITH, D. P.; GALLOWAY, J. R.; WISCHMEYER, P. E. Parenteral glutamine increases serum heat shock protein 70 in critically ill patients. *Intensive Care Med*, v. 31, n. 8, p. 1079-86, Aug 2005. ISSN 0342-4642 (Print) 0342-4642.

ZOU, P.; YOSHIHARA, H.; HOSOKAWA, K.; TAI, I.; SHINMYOZU, K.; TSUKAHARA, F.; MARU, Y.; NAKAYAMA, K.; NAKAYAMA, K. I.; SUDA, T. p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell*, v. 9, n. 3, p. 247-61, Sep 2 2011.

## ANEXOS

### ANEXO I



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Secretaria de Pós-Graduação

#### **Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado**

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.

2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para argüir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.

2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.

3. A sessão de defesa será aberta ao público.

4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.

4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.

4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.

5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: [pgfarma@usp.br](mailto:pgfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior  
Presidente da CPG/FCF/USP

## ANEXO II



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

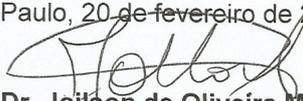
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 132013

## CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP) CERTIFICA que o Projeto **“Efeito da desnutrição protéica sobre aspectos da mobilização, migração e sinalização celular: Papel da glutamina na modulação desses processos”** (Protocolo CEUA/FCF/394), de responsabilidade do(a) **Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 18 de fevereiro de 2013.

São Paulo, 20 de fevereiro de 2013.

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

**ANEXO III**Composição da ração comercial CR-1 Nuvilab<sup>®</sup>

<b>Constituintes</b>	<b>Ração CR-1 Nuvilab<sup>®</sup></b> (g/kg de ração)
Proteína bruta	220
Umidade	125
Material mineral	90
Matéria fibrosa	70
Gordura bruta	40

**ANEXO IV**Composição da mistura salínica da ração comercial CR-1 Nuvilab<sup>®</sup>

<b>Constituintes</b>	<b>Ração CR-1 Nuvilab<sup>®</sup> (g/kg de ração)</b>
Cálcio	12
Cobalto	0,0015
Cobre	0,01
Ferro	0,05
Fósforo	8
Flúor	0,08
Iodo	0,02
Manganês	0,06
Selênio	0,00005
Sódio	2,7
Zinco	0,06

**ANEXO V**

Composição da mistura vitamínica e de aminoácidos da ração comercial CR-1 Nuvilab®

<b>Constituintes</b>	<b>Ração CR-1 Nuvilab® (mg/kg, g/kg, UI/kg de ração)</b>
Lisina	12g/kg
Metionina	4g/kg
Vitamina A	13000UI/kg
Vitamina B1	5mg/kg
Vitamina B2	6mg/kg
Vitamina B3	60mg/kg
Vitamina B5	20mg/kg
Vitamina B6	7mg/kg
Vitamina B7	0,05mg/kg
Vitamina B8	1900mg/kg
Vitamina B9	1mg/kg
Vitamina B12	22mg/kg
Vitamina D3	2000UI/kg
Vitamina E	34UI/kg
Vitamina K3	3mg/kg

## ANEXO VI – Histórico escolar (parte I)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

## FICHA DO ALUNO

9136 - 7493661/1 - Guilherme Galvão dos Santos

Email: g.galvao@usp.br  
 Data de Nascimento: 24/05/1979  
 Cédula de Identidade: RG - 26.429.260-1 - SP  
 Local de Nascimento: Estado de São Paulo  
 Nacionalidade: Brasileira  
 Graduação: Farmacêutico - Pontifícia Universidade Católica de Campinas - São Paulo - Brasil - 2004  
 Mestrado: Master of Science in Biomolecular Sciences (1) - Faculty of Earth and Life Sciences of the Vrije Universiteit Amsterdam - Holanda - 2007

Curso: Doutorado  
 Programa: Farmácia (Análises Clínicas)  
 Área: Análises Clínicas  
 Data de Matrícula: 15/07/2011  
 Início da Contagem de Prazo: 15/07/2011  
 Data Limite para o Depósito: 15/07/2015  
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvyia Stuchi Maria Engler - 15/07/2011 a 19/02/2013 E.Mail: silvyia@usp.br  
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 20/02/2013 até o presente. E.Mail: hemato@usp.br  
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 15/07/2011  
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 26/09/2013  
 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: Ingressou no Doutorado em 15/07/2011  
 Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2014

Aluno matriculado no Regulamento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013)

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2014

Impresso em: 02/02/15 23:47:45

## ANEXO VI – Histórico escolar (parte II)

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



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

## FICHA DO ALUNO

9136 - 7493661/1 - Guilherme Galvão dos Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
BMI5882-1/4	Moléculas e Células da Imunidade Inata (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	01/08/2011	14/08/2011	30	2	100	B	N	Concluída
MCM5897-1/3	MHC e Resposta Imune (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	08/08/2011	21/08/2011	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
BMI5883-3/1	Inflamação e Apresentação de Antígenos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	15/08/2011	28/08/2011	30	2	100	A	N	Concluída
BMI5884-3/2	Ontogenia de Linfócitos T e B (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	26/09/2011	09/10/2011	30	2	100	A	N	Concluída
BMI5886-1/4	Regulação da Resposta Imune e Tolerância (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	07/11/2011	20/11/2011	30	0	0	-	N	Matrícula cancelada
FBC5793-10/2	Tópicos em Análises Clínicas I	06/03/2012	26/06/2012	30	2	100	A	N	Concluída
BMH5752-4/4	Fundamentos em Biologia Tecidual (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	12/03/2012	27/06/2012	225	15	90	A	N	Concluída
FBC5734-2/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	06/08/2012	12/08/2012	30	2	100	A	N	Concluída
FBC5757-4/1	Tópicos em Análises Clínicas II	14/08/2012	26/11/2012	15	1	85	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	26
Estágios:			
Total:	0	20	26

Créditos Atribuídos à Tese: 167

## Observações:

1) Título de mestre obtido no(a) Faculty of Earth and Life Sciences of the Vrije Universiteit Amsterdam. Reconhecimento da equivalência do título aprovada pela Câmara Curricular do Conselho de Pós-Graduação, em Sessão de 04/04/2012.

## Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2014

Impresso em: 02/02/15 23:47:46

## ANEXO VII – Curriculum lattes (parte I)

Currículo Lattes

2/23/15, 9:12 PM


Imprimir currículo

---



**Guilherme Galvão dos Santos**

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/2410563135035787>

Última atualização do currículo em 23/02/2015

---

**Resumo informado pelo autor**

Graduado em Ciências Farmacéuticas pela Pontifícia Universidade Católica de Campinas, iniciou suas atividades de pesquisa como aluno de Iniciação Científica no Departamento de Biologia Celular da Unicamp. Possui título de Mestre em Biologia Celular e Molecular pela Vrije Universiteit Amsterdam e atualmente é doutorando do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacéuticas - USP. Farmacêutico com experiência nacional e internacional em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D). Por 2 anos, trabalhou como pesquisador na Natura Inovação e Tecnologia de Cosméticos, com foco em eficácia e segurança de produtos. Em seguida, atuou por 6 anos como pesquisador para a União Européia, com base na Holanda, na geração de novas tecnologias em P&D.

*(Texto informado pelo autor)*

---

**Dados pessoais**

<b>Nome</b>	Guilherme Galvão dos Santos
<b>Filiação</b>	Lucia Maria Galvão dos Santos
<b>Nascimento</b>	24/05/1979 - Santos/SP - Brasil
<b>Carteira de Identidade</b>	254292601 SSP - SP - 01/10/1999
<b>CPF</b>	255.948.618-50

---

**Formação acadêmica/titulação**

<b>2011</b>	<p>Doutorado em Farmácia (Análises Clínicas).            Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil            Título: A influência da L-glutamina sobre aspectos imunomodulatórios de células tronco mesenquimais medulares em situação de desnutrição proteico-energética            Orientador: Ricardo A. Fock             Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior</p>
<b>2005 - 2007</b>	<p>Mestrado em Biologia Celular e Molecular.            Vrije Universiteit Medisch Centrum, VUMC, Holanda            Título: "Development of reconstructed skin equivalent model for in vitro toxicity assessment of skin allergens". Ano de obtenção: 2007            Orientador: Profs. Drs. Susan Gibbs            Bolsista do(a): Dutch Education Learning at Top Level Abroad</p>
<b>1999 - 2003</b>	<p>Graduação em Ciências Farmacéuticas.            Pontifícia Universidade Católica de Campinas, PUC Campinas, Campinas, Brasil</p>

---

**Formação complementar**

<b>2012 - 2012</b>	<p>Extensão universitária em Programa de Aperfeiçoamento em Ensino.            Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil</p>
<b>2008 - 2008</b>	<p>Curso de curta duração em Technical and Scientific Writing in English.            Free University of Amsterdam, VU, Amsterdam, Holanda</p>
<b>2007 - 2007</b>	<p>Curso de curta duração em Advanced Immunology.            Universiteit van Amsterdam, UvA, Amsterdam, Holanda            Bolsista do(a): Vrije Universiteit Medisch Centrum</p>

---

**Atuação profissional**

1. European Union - Sens-It-iv Project - EU

<b>Vínculo institucional</b>	
<b>2005 - 2010</b>	Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional: Pesquisador, Carga horária: 40, Regime: Dedicado exclusiva

2. Natura - NATURA

<b>Vínculo institucional</b>	
------------------------------	--

## ANEXO VII – Curriculum lattes (parte II)

Currículo Lattes

2/23/15, 9:12 PM

**2003 - 2005** Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Pesquisador de Tecnologia de Pele , Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva

### Idiomas

<b>Alemão</b>	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
<b>Inglês</b>	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem
<b>Francês</b>	Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem
<b>Holandês</b>	Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

### Prêmios e títulos

**2009** Bolsa de Participação - 7th World Congress on Alternatives to Animal Experimentation Rome 2009, ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation

### Produção

Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

- dos SANTOS, G. G.**, Spiekstra, Sander W., Sampat-Sardjoeopersad, Shakun C., Reinders, Judith, Scheper, Rik J., Gibbs, Susan  
A potential in vitro epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency. *Toxicology in Vitro* **25**, p.347 - 357, 2011.
- dos SANTOS, G. G.**, Scheper, R.J., Gibbs, S.  
Potential method to determine irritant potency in vitro ; Comparison of two reconstructed epidermal culture models with different barrier competency. *Toxicology in Vitro* **23**, p.349 - 355, 2009.
- dos SANTOS, G. G.**, Reinders, J., Ouwehand, K., Rustemeyer, T., Scheper, R.J., Gibbs, S.  
Progress on the development of human in vitro dendritic cell based assays for assessment of the sensitizing potential of a compound. *Toxicology and Applied Pharmacology* **236**, p.372 - 382, 2009.

#### Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

- Hastreiter AA, Santos EWCO, **dos SANTOS, G. G.**, Borelli P, Fock RA  
Endothelial-like cells derived from bone marrow Nes+ MSCs cells have a sinusoidal perivascular phenotype In: <http://worldstemcellsummit.com/wp-content/uploads/2014/12/Poster-Abstracts-WSCS14.pdf>, 2014, San Antonio.  
**WSCS - 2014** , 2014.
- dos SANTOS, G. G.**, Hastreiter AA, Fock RA  
The influence of l-glutamine on immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells from malnourished mice In: 43rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Experimental Haematology, 2014, Montreal.  
**ISEH 2014 - Abstracts** , 2014.
- dos SANTOS, G. G.**, Spiekstra, S.W., Scheper, R.J., Gibbs, S.  
Epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency In: 6th Meeting of the Immunotoxicology & Chemical Allergy, 2010, Den Bosch.  
**Epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency** , 2010.
- dos SANTOS, G. G.**, Spiekstra, S.W., Rustemeyer, T., Scheper, R.J., Gibbs, S.  
Chemical allergens and irritants induce TSLP secretion from epidermal equivalents In: X Dutch Society for Experimental Dermatology (NVED), 2009, Lunteren - Holanda.  
**X Dutch Society for Experimental Dermatology (NVED)** , 2009. p.7 - 7
- dos SANTOS, G. G.**, Reinders, J., Spiekstra, S.W., Scheper, R.J., Gibbs, S.  
Development of a potential epidermal equivalent based assay to rank skin sensitizers potency In: VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences, 2009, Roma - Itália.  
**ALTEX - Alternatives to Animal Experimentation**. Zurich: Society ALTEX Edition, 2009. v.26. p.292 - 293
- Reinders, J., **dos SANTOS, G. G.**, Ouwehand, K., Spiekstra, S.W., Rustemeyer, T., Scheper, R.J., Gibbs, S.  
Development of in vitro based assays to identify potential allergens In: Dutch Society for Experimental Dermatology (NVED), 2009, Lunteren - Holanda.  
**X Dutch Society for Experimental Dermatology (NVED)** , 2009. p.6 - 6
- dos SANTOS, G. G.**, Carvalho, H.F.  
Effect of alpha-adrenergic inhibition on mouse prostate In: II Extracellular Matrix International Symposium, 2002, Angra dos Reis.  
**II Extracellular Matrix International Symposium** , 2002.
- dos SANTOS, G. G.**, Oliveira, M.L., Carvalho, H.F.  
Effect of L-NAME on the development of benign prostatic hyperplasia In: II Extracellular Matrix International Symposium, 2002, Angra dos Reis.  
**II Extracellular Matrix International Symposium** , 2002.

#### Artigos em jornal de notícias

- Gibbs, S., Ouwehand, K., Reinders, J., **dos SANTOS, G. G.**, Scheper, R.J., de Grijij, T.  
Valuable scientific work that for one reason or the other has not (yet) been incorporated into the body of work still to be done until the end of the project. *Sens-it-iv Newsletter* , 2010.
- dos SANTOS, G. G.**, Reinders, J., Spiekstra, S.W., Gibbs, S.  
The Epidermal Equivalent assay to determine the potency of a sensitizer. *Sens-it-iv Website* , 2009.
- Gibbs, S., Reinders, J., **dos SANTOS, G. G.**, Ouwehand, K., Spiekstra, S.W.  
Optimization of an epithelial-dendritic cell co-culture model and preliminary results. *Sens-it-iv Website* , 2008.

## ANEXO VII – Curriculum lattes (parte III)

Currículo Lattes

2/23/15, 9:12 PM

Produção técnica

### Demais produções técnicas

1. dos SANTOS, G. G.  
The first Sens-it-iv Summer School, 2009. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)

### Eventos

---

Eventos

### Participação em eventos

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) **43rd Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology**, 2014. (Congresso)  
Cxc12 production by bone marrow Nes+ MSCs is downregulated in malnourished mice.
2. Apresentação de Poster / Painel no(a) **World Stem Cell Summit**, 2014. (Congresso)  
Endothelial-like cells derived from bone marrow Nes+ MSCs cells have a sinusoidal perivascular phenotype.
3. Apresentação de Poster / Painel no(a) **43rd Annual Scientific Meeting of the International Society for Experimental Hematology**, 2014. (Congresso)  
The influence of l-glutamine on immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells from malnourished mice.
4. Apresentação Oral no(a) **IV Simpósio de pós-graduação em Análises Clínicas**, 2012. (Simpósio)  
Desenvolvimento de peles artificiais imunocompetentes para estudos de segurança e eficácia de ativos cosméticos e medicamentos de uso tópico.
5. **Melanoma, UV induced lesion and photoprotection**, 2012. (Simpósio)
6. Apresentação Oral no(a) **5th General Assembly Sens-it-iv**, 2010. (Encontro)  
A potential in vitro epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency.
7. Apresentação Oral no(a) **Skin in Vitro 2010**, 2010. (Congresso)  
A potential in vitro epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency.
8. **6th Meeting of the Immunotoxicology & Chemical Allergy**, 2010. (Encontro)  
An epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency.
9. Apresentação Oral no(a) **4,5 General Assembly Sens-it-iv**, 2010. (Simpósio)  
An in vitro epidermal equivalent assay to determine sensitizer potency.
10. **XI Meeting of the Dutch Society for Experimental Dermatology (NVED)**, 2010. (Congresso)
11. Apresentação Oral no(a) **X Meeting of the Dutch Society for Experimental Dermatology (NVED)**, 2009. (Congresso)  
Chemical allergens and irritants induce TSLP secretion from epidermal equivalents.
12. Apresentação de Poster / Painel no(a) **VII World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences**, 2009. (Congresso)  
Development of a potential epidermal equivalent based assay to rank skin sensitizers potency.
13. **XXII Meeting of the European Research Group on Experimental Contact Dermatitis (ERGECD)**, 2009. (Congresso)
14. **XXVIII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)**, 2009. (Congresso)
15. **4th General Assembly Sens-it-iv**, 2009. (Simpósio)
16. **3.5 General Assembly Sens-it-iv**, 2009. (Encontro)
17. **46th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX)**, 2009. (Congresso)
18. Apresentação Oral no(a) **XXI Meeting of the European Research Group on Experimental Contact Dermatitis (ERGECD)**, 2008. (Congresso)  
The importance of the skin barrier function for the development of in vitro assays.
19. **IX Meeting of the Dutch Society for Experimental Dermatology (NVED)**, 2008. (Congresso)
20. **XXVII Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI)**, 2008. (Congresso)
21. **3rd General Assembly Sens-it-iv**, 2008. (Encontro)
22. **45th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX)**, 2008. (Congresso)
23. **15th International Congress on In Vitro Toxicology (ESTIV)**, 2008. (Congresso)
24. **VII Meeting of the Dutch Society for Experimental Dermatology (NVED)**, 2007. (Congresso)
25. **44th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX)**, 2007. (Congresso)
26. Apresentação de Poster / Painel no(a) **XX Congresso Brasileiro de Cosmetologia**, 2006. (Congresso)  
Determinação do potencial irritante de formulações cosméticas pela técnica de BCOP.
27. **II Extracellular Matrix International Symposium (SIMEC)**, 2002. (Simpósio)

## ANEXO VII – Curriculum lattes (parte IV)

Currículo Lattes

2/23/15, 9:12 PM

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 23/02/2015 às 21:11:00.