

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia e Toxicologia

Hemopoese em desnutrição proteica: caracterização do estroma medular e  
avaliação da participação de íons cálcio

Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Primavera Borelli  
Coorientador: Prof. Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero

São Paulo

2018

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia  
Área de Fisiopatologia e Toxicologia

Hemopoese em desnutrição proteica: caracterização do estroma medular e  
avaliação da participação de íons cálcio

Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos

Versão Corrigida

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Primavera Borelli  
Coorientador: Prof. Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero

São Paulo

2018

Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos

Hemopoese em desnutrição proteica: caracterização do estroma medular e  
avaliação da participação de íons cálcio

Comissão julgadora da tese para obtenção do título de DOUTOR

---

Profa. Dra. Primavera Borelli  
Orientador/presidente

---

1º examinador

---

2º examinador

---

3º examinador

Dedico esse trabalho à minha família,  
por acreditarem em mim e me apoiarem em todos os momentos,  
acreditando na minha capacidade e na realização de mais essa etapa.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por estar sempre guiando a minha vida e por tornar tudo possível.

A minha esposa Jakeline Franco e meu filho Daniel Franco, pelo amor, carinho, por estarem sempre comigo, me apoiando e valorizando cada conquista.

A meus pais, pelo constante apoio, por estarem sempre presentes em todos os momentos e sempre acreditando que tudo dará certo.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Primavera Borelli, pela paciência, disposição e por acreditar em meu empenho, além do seu exemplo de dedicação e profissionalismo.

Ao Prof. Edgar Paredes-Gamero e Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock, por todas as orientações que me ajudaram a desenvolver o projeto.

A Carolina Dias, Dalila Cunha de Oliveira, Amanda Nogueira-Pedro, Jackeline de Oliveira Beltran, Graziela Batista, Araceli Hastreiter, Edson Makiyama e Maristela Tsujita do Laboratório de Hematologia Clínica, pelos momentos de descontração, amizade e auxílio sempre que precisei.

A Marina, Heron e Marcos do Laboratório de Células-tronco da Unifesp, pelo auxílio com a microscopia confocal e vias de sinalização do cálcio.

A Renata Albuquerque, por auxiliar com a citometria de fluxo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa do mestrado e à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal em Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro e concessão de financiamento ao meu projeto de doutorado.

*“Aceitar novas teorias não proporciona nova vida.  
Mesmo a familiaridade com fatos e  
teorias importantes é de pouco valor,  
a menos que seja colocada em prática”*

**Ellen G. White**

## RESUMO

**SANTOS, E. W. C. O. Hemopoese em desnutrição proteica: caracterização do estroma medular e avaliação da participação de íons cálcio.** 2018. 122f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A desnutrição proteica continua sendo um dos principais problemas nutricionais do mundo. Trabalhos de nosso laboratório e de outros autores evidenciam que entre as alterações presentes na desnutrição proteica, está a alteração do tecido hemopoético, com modificações em componentes da matriz extracelular, alterações no ciclo celular da célula tronco/progenitora hemopoética, redução da produção de precursores hemopoéticos, tanto na série eritrocitária como na série leucocitária, levando a anemia e leucopenia. Os mecanismos de participação do  $\text{Ca}^{2+}$  nas células da medula óssea são pouco conhecidos, porém, sabe-se que ele atua no processo de hemopoese. Têm sido descrito que elevações da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmático induzem a proliferação e diferenciação de células mielóides. A ação dessa via em indivíduos desnutridos também é pouco conhecida. Este estudo tem como objetivo avaliar o estabelecimento da celularidade medular in vitro, bem como investigar mecanismos moleculares envolvidos na proliferação e diferenciação dessa celularidade, além de avaliar a ação do cálcio na presença da interleucina-3 em células-tronco hemopoéticas murinas e sua modulação para avaliar alterações na via das MAPKs. Camundongos C57BL/6, machos e adultos foram submetidos à desnutrição proteica e, após a perda de aproximadamente 20% de seu peso corporal, as células da medula óssea foram colhidas. Essas células foram imunofenotipadas, além de reagirem com anticorpos específicos para caracterização da célula-tronco hemopoética e proteínas da via de sinalização de cálcio intracelular. Observamos que a celularidade do estroma medular em cultura de longa duração de animais desnutridos é alterada, principalmente em células de origem mesenquimal, que aparecem em maior número em desnutridos ao longo dos dias de cultura. Além disso, as ondas de cálcio intracelular estavam diminuídas em animais desnutridos, bem como as proteínas p-PKC, p-PLCy, CAMKII, p-AKT e p-STAT5 não respondem ao estímulo de IL-3, levando a uma deficiência da expressão das MAPK: ERK 1/2, JNK e p38. A desnutrição proteica pode causar alterações na celularidade estromal da medula óssea e na diferenciação das células tronco hemopoéticas pela via das MAPKs estimulada por IL-3.

**Palavras chave:** Desnutrição proteica; Célula-tronco hemopoética; Medula óssea; Estroma medular; Cálcio intracelular.

## ABSTRACT

SANTOS, E.W.C.O. *Hematopoiesis in protein malnutrition: characterization of bone marrow stroma and evaluation of calcium participation*. 2018. 122f. Thesis (Ph.D) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Protein malnutrition remains one of the world's major nutritional problems. Studies from our laboratory and others shown that alterations in protein malnutrition include hemopoietic tissue alterations, changes in extracellular matrix components, changes in the hemopoietic stem/progenitor cell tissue, reduction in the production of hemopoietic precursors, in the erythroid series as in the mieloyd series, leading to anemia and leukopenia. Mechanisms of  $Ca_i^{2+}$  participation in bone marrow cells are poorly understood, but no hemopoiesis has been developed. Elevations of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  concentration in proliferation and differentiation of myeloid cells were included. Such an action through malnourished animals is also a little known. This study aims to evaluate the establishment of cellularity in vitro as well as investigate the molecular involvement in cell proliferation and differentiation, as well as to evaluate the action of calcium in the presence of IL-3 in hemopoietic stem cells and its modulation by analytical evaluations in the MAPKs pathway. C57BL/6, male adult mice were subjected to protein restriction and, after loss of approximately 20% of their body weight, bone marrow cells were harvested. These were immunophenotyped in addition to specific activation terms for the hemopoietic stem cell and intracellular signaling pathway proteins. We observed that the bone marrow cells in long-term culture of malnourished animals is altered, mainly in cells of mesenchymal origin, which appears in greater numbers in undernourished throughout the days of culture. In addition, as intracellular calcium waves decreased in malnourished animals, as well as the p-PKC, p-PLC, CAMKII, p-AKT and p-STAT5 proteins did not respond to IL-3, suggesting expression of the expression of MAPK: ERK 1/2, JNK and p38. Protein malnutrition may have changes in bone marrow capacity and differentiation of hemopoietic stem cells through IL-3-stimulated MAPKs.

**Palavras-chave:** Protein malnutrition; Hemopoietic stem cell; Bone marrow; Intracellular calcium; Stroma.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Modelo da hemopoese	17
<b>Figura 2.</b> O nicho de HSC da medula óssea adulta	20
<b>Figura 3.</b> Sinalização do cálcio ativando fatores de transcrição hemopoéticos	25
<b>Figura 4.</b> Delineamento experimental	30
<b>Figura 5.</b> Variação do peso corporal após ingestão de dieta experimental	46
<b>Figura 6.</b> Consumo de ração e proteínas	47
<b>Figura 7.</b> Concentração sérica de proteínas totais, albumina, cálcio e fósforo	48
<b>Figura 8.</b> Número de hemácias, hematócrito e hemoglobina	49
<b>Figura 9.</b> Índices hematimétricos: VCM, HCM e CHCM	50
<b>Figura 10.</b> Porcentagem de reticulócitos no sangue periférico	51
<b>Figura 11.</b> Número de leucócitos no sangue periférico	52
<b>Figura 12.</b> Número de células nucleadas da medula óssea	54
<b>Figura 13.</b> Avaliação da proliferação celular por BrDU em células tronco hemopoéticas	56
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografia do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração	60
<b>Figura 15.</b> Populações de origem hemopoética presentes na cultura de células estromais da medula óssea	63
<b>Figura 16.</b> Populações de origem mesenquimal presentes na cultura de células estromais da medula óssea	64
<b>Figura 17.</b> Citometria de fluxo representativa dos grupos Controle e Desnutrido, nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias, demonstrando a proporção de células da série eritrocítica da cultura de medula óssea marcado por Ter119 (PE).	65
<b>Figura 18.</b> Citometria de fluxo representativa dos grupos Controle e Desnutrido, nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias, demonstrando a proporção de células da série macrofágica da cultura de medula óssea marcadas por F4/80 (APC) e CD11b (PE).	66
<b>Figura 19.</b> Citometria de fluxo representativa dos grupos Controle e Desnutrido, nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias, demonstrando a proporção de adipócitos na cultura de estroma da medula óssea marcados por Bodipy (FITC).	67
<b>Figura 20.</b> Citometria de fluxo representativa dos grupos Controle e Desnutrido, nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias, demonstrando a proporção de osteoblastos na cultura de estroma da medula óssea marcados por OPN (PE).	68

<b>Figura 21.</b> Citometria de fluxo demonstrando a estratégia de marcação de células-tronco hemopoética e mesenquimal na cultura de estroma da medula óssea.	69
<b>Figura 22.</b> Via de diferenciação da célula-tronco mesenquimal	72
<b>Figura 23.</b> Fotomicrografia de células estromais de cultura de longa duração de células da medula óssea coradas por May-Grunwald-Geimsa	73
<b>Figura 24.</b> Colorações imunohistoquímicas para megacariócitos e granulócitos	73
<b>Figura 25.</b> Colorações imunohistoquímicas para eritrócitos	74
<b>Figura 26.</b> Fotomicrografia de células estromais de cultura de longa duração de células da medula óssea coradas por <i>oil red</i>	75
<b>Figura 27.</b> Fotomicrografia de células estromais de cultura de longa duração de células da medula óssea coradas por vermelho de alizarina	76
<b>Figura 28.</b> Ondas de cálcio em culturas de medula óssea de longa duração	78
<b>Figura 29.</b> Fotomicrografia de células estromais da medula óssea, demonstrando fluorescência ao serem estimuladas com IL-3 e ionomicina	78
<b>Figura 30.</b> Imagens representativas de tipos de colônias de proliferação hemopoética	79
<b>Figura 31.</b> Populações de origem hemopoética presentes na cultura de células estromais da medula óssea de curta duração (24h)	82
<b>Figura 32.</b> Avaliação da expressão e ativação de fatores de transcrição ERK, JNK e p-38 por citometria de fluxo	83
<b>Figura 33.</b> Avaliação da expressão e ativação de proteínas da via de sinalização das MAPKs por citometria de fluxo	85
<b>Figura 34.</b> Via de sinalização das MAPKs estimulada por IL-3	86
<b>Figura 35.</b> Dosagem de fatores de crescimento no sobrenadante de cultura de medula óssea	90
<b>Figura 36.</b> Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de medula óssea	91
<b>Figura 37.</b> Expressão relativa do mRNA	93

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição das Rações (g/Kg ração)	31
<b>Tabela 2</b> – Composição da Mistura Salínica (MIX)	32
<b>Tabela 3</b> – Composição da Mistura Vitamínica dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.	33
<b>Tabela 4</b> – Anticorpos utilizados para a caracterização imunofenotípica	37
<b>Tabela 5</b> – Anticorpos utilizados para a avaliação da expressão e ativação de proteínas por citometria de fluxo	41
<b>Tabela 6</b> – Seleção de genes de referência e de interesse	43
<b>Tabela 7</b> – Contagem relativa de leucócitos no sangue periférico	53
<b>Tabela 8</b> – Contagem absoluta de leucócitos no sangue periférico	53
<b>Tabela 9</b> – Distribuição absoluta das populações medulares	55
<b>Tabela 10</b> – Distribuição relativa das populações medulares	55
<b>Tabela 11</b> – Número absoluto do total de colônias contadas	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AIN: *American Institute of Nutrition* (Instituto Americano de Nutrição)
- ANG1: angiopoetina-1
- APC: *allophycocyanin* (aloficocianina)
- CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média
- c-Kit: (receptor de *stem cell factor*)
- CMOLD: cultura de medula óssea de longa duração
- CT: célula-tronco
- CTH: célula-tronco hemopoética
- CTPH: célula-tronco progenitora hemopoética
- CTM: célula-tronco mesenquimal
- CXCL12: *CXC chemokine ligand 12*
- CXCR4: *CXC chemokine receptor 4*
- DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
- DP: desnutrição proteica
- DPE: desnutrição proteico-energética
- ERK: *extracellular-signal-regulated kinases* (quinase regulada por sinal extracelular)
- FAO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
- FITC: *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)
- GAP: *GTPase activating proteins*
- GEF: *guanine nucleotide exchange factor*
- HCM: hemoglobina corpuscular média
- HE: hematoxilina-eosina
- JNK: *c-Jun N-terminal kinase*
- Lin<sup>-</sup>: linhagem negativa Lin<sup>-</sup>/c-Kit<sup>+</sup>/Sca-1<sup>+</sup> ou “LSK”
- LT-CTH: célula-tronco hematopoética com capacidade de autorrenovação a longo prazo
- G-CSF: *granulocyte colony-stimulating factor* (fator estimulador de colônia de granulócitos)
- GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos)
- ICQ: imunocitoquímica

- MAPK: *mitogen-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógeno)
- M-CSF: *macrophage colony-stimulating factor* (fator estimulador de colônia de macrófagos)
- MEC: matriz extracelular
- MO: medula óssea
- OMS: Organização Mundial da Saúde
- OPN: osteopontina
- NF- $\kappa$ B: *nuclear factor kappa B* (fator nuclear kappa B)
- PBS: *phosphate buffered saline* (solução tampão fosfato)
- PE: *phycoerythrin* (ficoeritrina)
- PME: progenitor hemopoético multipotente
- PGM: progenitor granulo-monocítico
- PI3K: *phosphatidylinositol-3 kinase* (fosfatidilinositol-3-quinase)
- PKC: *protein kinase C* (proteína quinase C)
- PL: progenitor linfoide
- PLC: *phospholipase C* (fosfolipase C)
- PM: progenitor mielóide
- PU.1: fator de transcrição da família ETS
- RANK: *receptor activator of nuclear factor kappa-B* (receptor ativador do fator nuclear kB)
- SCF: *stem cell factor* (fator estimulador de célula-tronco)
- SDF-1: *stromal cell-derived factor 1* (fator derivado do estroma da medula óssea)
- SFB: soro fetal bovino
- TNF: *tumor necrosis factor* (fator de necrose tumoral)
- VCM: volume corpuscular médio

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>14</b>
1.1 Desnutrição proteica	14
1.2 Hemopoese e estroma medular	16
1.3 Papel do cálcio intracelular na proliferação e diferenciação celular	23
1.4 Relação da desnutrição com a hemopoese	26
<b>2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>30</b>
3.1 Animais	30
3.2 Rações	31
3.3 Indução da desnutrição	33
3.4 Avaliação do estado nutricional dos animais	34
3.5 Avaliação da concentração proteica das rações	34
3.6 Obtenção de amostras sanguíneas	34
3.7 Determinação de proteínas totais, albumina sérica, cálcio total e fósforo	34
3.8 Hemograma e contagem de reticulócitos	34
3.9 Coleta de células da medula óssea	35
3.10 Realização de mielograma	35
3.11 Estabelecimento do estroma total da medula óssea (CMOLD)	35
3.12 Identificação dos tipos celulares por imunocitoquímica	36
3.13 Identificação de adipócitos por coloração de oil red	36
3.14 Identificação de osteoblastos por coloração de vermelho de alizarina	37
3.15 Identificação dos tipos celulares por citometria de fluxo	38
3.16 Identificação de citocinas e fatores de crescimento	38
3.17 Imunomarcagem em culturas de curta duração	38
3.18 Ensaio de Unidades formadoras de colônia (CFU)	38
3.19 Ensaio de BrDU	39
3.20 Isolamento e a separação magnética de células LSK	39
3.21 Medidas intracelulares de $Ca^{2+}$ por microscopia de fluorescência	39
3.22 Medições de cálcio por microscopia confocal	40
3.23 Avaliação da expressão de proteínas por citometria de fluxo	40
3.24 Extração e análise de RNA total	41
3.24.1 Síntese do DNA complementar	42
3.24.2 Seleção dos genes de referência e de interesse	42
3.24.3 Determinação da expressão dos genes de interesse	43

3.25	Análise estatística	44
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>45</b>
4.1	Avaliação do estado nutricional	45
4.1.1	Análise do peso corporal	45
4.1.2	Análise do consumo de ração e proteínas	47
4.1.3	Avaliação da concentração de proteínas, albumina, cálcio e fósforo	47
4.2	Avaliação hematológica	49
4.2.1	Hemograma	49
4.2.2	Eritrograma	49
4.2.3	Índices Hematimétricos	50
4.2.4	Reticulócitos	51
4.2.5	Leucograma	52
4.3	Mielograma	54
4.4	Ensaio de BrDU	56
4.5	Avaliação do estabelecimento do estroma medular (CMOLD)	57
4.5.1	Identificação dos tipos celulares por citometria de fluxo	61
4.5.2	Identificação de células estromais em cultura de longa duração	72
4.5.3	Identificação de adipócitos por coloração de <i>oil red</i>	74
4.5.4	Identificação de osteoblastos por coloração de vermelho de alizarina	74
4.6	Medidas de ondas de cálcio intracelular	77
4.7	Ensaio de unidades formadoras de colônias mielóides	79
4.8	Imunomarcção	81
4.9	Avaliação da expressão e ativação de proteínas por citometria de fluxo	83
4.10	Identificação de citocinas e fatores de crescimento	87
4.11	Avaliação de fatores de transcrição em células-tronco hemopoéticas	93
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>97</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>113</b>
7.1	Orientações aos membros da banca	113
7.2	Certificado do CEUA	114
7.3	Ficha do aluno	115
7.4	Lattes	116

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Desnutrição proteica

A desnutrição proteica e proteico-energética são alguns dos principais problemas alimentares do mundo, sendo encontrada com maior frequência em crianças, idosos, pacientes portadores de neoplasias, doenças crônicas ou sob quimioterapia (MARCOS *et al.*, 2003; MONTEIRO *et al.*, 2009).

A desnutrição é definida pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura como uma condição fisiológica anormal causada por uma ingestão inadequada, desequilibrada ou consumo excessivo de macronutrientes (carboidratos, proteínas e gorduras) e micronutrientes (vitaminas e minerais) que são essenciais para o crescimento e desenvolvimento físico e cognitivo (FAO, 2015). A gravidade da desnutrição depende de fatores como a causa, intensidade e duração da carência. Ela pode ser causada por dieta inadequada, deficiência de absorção, ingestão insuficiente, aumento da utilização dos nutrientes, ou ainda por excreção excessiva, podendo assim, existir diversas formas de desnutrição atuando no mesmo indivíduo simultaneamente (BATISTA FILHO & RISSIN, 2011; CHANDRA, 1992; FAO, 2015).

A deficiência na ingestão de proteínas seguida da restrição, maior ou menor de calorias, constitui a base das modificações que acometem o organismo na DP e DPE (WATERLOW & ALLEYNE, 1971). As modificações centrais relacionadas à deficiência proteico-energética consistem em alterações psico-motoras, retardo no crescimento, alterações funcionais em diversos órgãos como coração, rim, fígado e intestino (ROBBINS & COTRAN, *et al.*, 2010), alterações no metabolismo intermediário e, também, a nosso ver, nos órgãos linfo-hemopoéticos (BORELLI *et al.*, 2007; 2009; NAKAJIMA *et al.*, 2014).

Com base na severidade e nas características clínicas apresentadas, a desnutrição pode ser classificada como *Kwashiorkor* ou *Marasmus*. O *Kwashiorkor* se desenvolve pela deficiência de proteína na dieta alimentar enquanto o *Marasmus* é decorrente da insuficiência de proteínas e calorias. *Kwashiorkor* e *Marasmus* são os dois extremos da DP e DPE, porém vários estados intermediários são reconhecidos entre eles (CHANDRA, 1999). Normalmente há uma interposição dos quadros, levando ao *Kwashiorkor-marasmático*, neste caso a pessoa pode desenvolver doenças infecciosas por baixa imunidade, devido à associação da perda aguda de nutrientes com a resposta inflamatória imposta à depleção crônica de massa lipídica e muscular. (BADALOO *et al.*, 2006).

A desnutrição e a dieta são, de longe, os maiores fatores de risco para a carga global de doenças: todos os países enfrentam um grave desafio para a saúde pública por meio da desnutrição. As consequências econômicas representam perdas de 11% do Produto Interno Bruto (PIB) todos os anos na África e na Ásia, enquanto que a prevenção da desnutrição oferece US\$ 16 em retornos de investimento por cada US\$ 1 gasto (IFPRI, 2016).

O Brasil fez importantes avanços na redução da desnutrição. Segundo trabalho de MONTEIRO (2003), observamos que os índices de desnutrição infantil em 1996 estavam na faixa de 10% da população, sendo que havia uma evidente diferença entre a região norte-nordeste (apresentando taxa de 25% de crianças desnutridas na zona rural) e a região centro-sul (com taxa de 4,6% na zona urbana). Os índices, no entanto, caíram pela metade nos 10 anos subsequentes, provavelmente graças a políticas sociais, aumento da escolaridade das mães, aumento do poder aquisitivo e acesso à informação (BATISTA FILHO & RISSIN, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2009), mas continuam elevados no Brasil (cerca de 3,7% em crianças e 2,4% em adultos) segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2015; FAO, 2017).

Observações de caráter epidemiológico e experimental evidenciam que indivíduos desnutridos, especialmente crianças, apresentam maior susceptibilidade frente a processos infecciosos e índices mais elevados de morbidade e mortalidade (LEE *et al.*, 2003). O binômio desnutrição-infecção pode ser visto sob dois aspectos: a desnutrição alterando os mecanismos de defesa do indivíduo e a infecção agravando o estado carencial previamente instalado ou ainda, a doença desencadeando-o (KEUSCH *et al.*, 2003). Nessas condições, a desnutrição pode facilitar a invasão do agente, favorecer sua proliferação no organismo, facilitar infecções secundárias e modificar o curso e a evolução da enfermidade e da terapêutica (BORELLI 1992; BRUNDTLAND, 2000).

A restrição proteica modifica as respostas fisiológicas podendo induzir lesão celular. Contudo, existem diferenças na extensão e no tipo da lesão: tecidos que exibem elevado “*turnover*” de proteínas e nutrientes, como o sistema hemopoético, são primeiramente afetados em relação aos que apresentam baixo “*turnover*” proteico. Portanto, mecanismos envolvidos com a proliferação, diferenciação e morte celular podem alterar-se na desnutrição, afetando diferentemente os distintos tecidos do organismo (SANTOS *et al.*, 2017).

## 1.2. Hemopoese e estroma medular

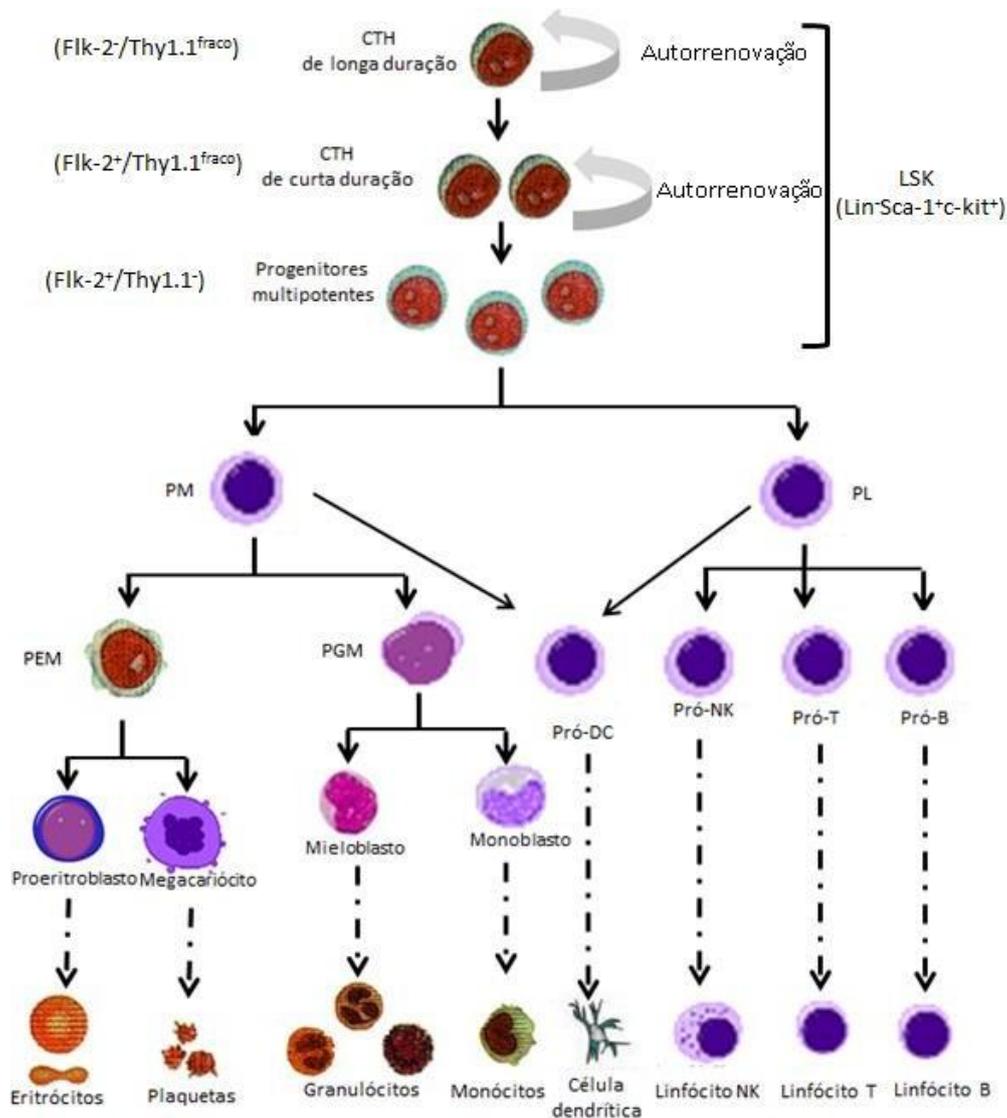
O processo de formação, proliferação, maturação e distribuição das células sanguíneas totalmente dependente das células-tronco hemopoéticas (CTH) é denominado hemopoese, processo este complexo e altamente regulado, sendo influenciado por vários estímulos que atuam nos diferentes níveis – central e periférico, caracterizando-se pela contínua produção e liberação de células maduras para a circulação sanguínea (OGAWA *et al.*, 1983).

A elevada e constante necessidade de proteínas por parte do tecido hemopoético faz com que seja comum o encontro de alterações hematológicas como anemia e leucopenia em desnutrição proteica, embora a natureza das mesmas ainda não esteja totalmente esclarecida (SANTOS *et al.*, 2017).

A hemopoese é um fenômeno complexo e altamente regulado, caracterizado pela contínua produção e liberação de leucócitos, eritrócitos e plaquetas para a circulação. A hemopoese é influenciada por vários estímulos, os quais atuam nos diferentes níveis do processo. Desta maneira, há que considerar as interações célula-célula e célula-estroma que ocorrem tanto no microambiente indutor da hemopoese como em outras localizações (BORELLI *et al.*, 2004; XAVIER *et al.*, 2007), a ação dos diferentes fatores de crescimento, citocinas e ação hormonal – particularmente corticosteróides, estrógenos, andrógenos, hormônios tireoidianos e a adrenalina, a presença de mediadores plasmáticos e celulares da resposta inflamatória e, obviamente, o estado nutricional do indivíduo (FOCK *et al.*, 2007; NAKAJIMA *et al.*, 2014; XAVIER *et al.*, 2007), fatores e situações que compõe o microambiente indutor da hemopoese (OGAWA *et al.*, 1983).

O tecido sanguíneo caracteriza-se por apresentar alta taxa de renovação uma vez que as células maduras apresentam tempo de vida na circulação relativamente curto (diariamente, indivíduos adultos, normais, produzem cerca de  $10^{11}$  cel/Kg) e por sua flexibilidade e adaptação às diferentes situações fisiológicas e patológicas (BOULAIS & FRENETTE, 2015). A produção de células sanguíneas em um padrão constante depende do microambiente hemopoético, estrutura organizada que regula a fisiologia da CTH e, em parte, também da fisiologia da célula-tronco mesenquimal (QUESENBERRY *et al.*, 1995).

Em camundongos, assim como em humanos, as CTH originam duas linhagens celulares restritas: a de progenitores linfóides (PL), da qual resultam os linfócitos T, linfócitos B, células “*natural killers*” (NK) e subpopulações, além de progenitores mielóides, que originam os progenitores granulo-monocíticos e megacariocítico/eritróides (AROSA *et al.*, 2007). A diferenciação hemopoética é representada na **Figura 1**.



**Figura 1. Modelo da hemopoese.** As células-tronco hemopoéticas têm a capacidade de renovar-se por longos períodos (CTH de longa duração) ou por períodos curtos (CTH de curta duração) e de diferenciar-se em progenitores hemopoéticos multipotentes, os quais se comprometem com a linhagem mielóide (PM) ou com a linhagem linfóide (PL). O PM origina progenitor eritroide-megacariocítico (PEM) e progenitor grânulo-monocítico (PGM). Os precursores pró-DC, pró-NK, pró-T e pró-B originam, respectivamente, células dendríticas, linfócitos NK (*"natural killer"*), linfócitos T e linfócitos B. Marcadores fenotípicos: Lin<sup>-</sup> c-Kit, Sca-1, Flk2, Thy1.1. Adaptado de LARSSON e KALSSON, 2005.

Em relação às CTH, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram extensa heterogeneidade de fenótipo e de comportamento, sendo que estas podem diferir quanto à sua capacidade de auto-renovação, ao número de progenitores diferenciados, à capacidade de diferenciação e ao padrão de migração (SPANGRUDE *et al.*, 1988). Contudo, as principais características que definem as CTH são: células indiferenciadas, capacidade de auto renovação, sua habilidade em manter um equilíbrio entre a auto renovação e a diferenciação; a multipotencialidade; a extensa capacidade proliferativa

apesar de a maioria da população encontrar-se em G<sub>0</sub>; serem raras e capazes de repovoar o tecido lesado (MORRISON & SCADDEN, 2014).

As CTH de camundongos podem ser classificadas em dois grupos, de acordo com a sua habilidade em reconstituir as diferentes linhagens celulares em animais irradiados: as CTH com capacidade de reconstituição por tempo indefinido (*long-term hematopoietic stem cells*: LT-HSC) e que podem recuperar o sistema hemopoético e mantê-lo durante a vida inteira do animal letalmente irradiado, enquanto que as com capacidade de reconstituição por um curto período (*short-term hematopoietic stem cells*: ST-HSC) podem repovoar as populações de células linfoides e mieloides por algumas semanas (ZHONG, 2005).

As LT-HSC, as mais primitivas e consideradas as verdadeiras células-tronco (CT), proliferam mais lentamente que as ST-HSC acarretando em um “*engraftment*” (“enxertamento”) tardio, mas sustentável da medula óssea. Por outro lado, as ST-HSC apresentam um “*engraftment*” precoce, porém, não sustentável (JONES *et al.*, 1990). Dessa forma, para que um animal irradiado sobreviva à aplasia medular é necessário que o material a ser transplantado tenha ambas as células (ZHAO *et al.*, 2000).

A forma mais utilizada para isolar e caracterizar as diferentes populações de células hemopoéticas é por meio do seu imunofenótipo usando um conjunto de marcadores de superfície específicos. As CT murinas são comumente caracterizadas por não expressarem marcadores de células diferenciadas (Lin<sup>-</sup>), mas por expressarem os marcadores Sca-1 (*stem cell antigen-1*), c-Kit (receptor de “*stem cell factor*”) e, expressarem, pelo menos em baixas quantidades, Thy-1 (CD90), logo sendo denominadas Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup> Thy-1<sup>low</sup> (PEARCE *et al.*, 2004). Essa rara população de células engloba praticamente todas as LT-HSC e a maioria das ST-HSC, que podem ser distintas das primeiras devido à co-expressão de Flt3 (CD135) e Mac-1 (CD11b) ou mesmo do Flk2 (CHRISTENSEN & WEISSMAN, 2001). Outros dois marcadores importantes são o CD34 e o CD38. Em camundongos é aceito que as CTH mais primitivas, ou seja, as LT-HSC encontram-se na população de células CD34<sup>-</sup>, porém, Donnely e colaboradores (1999) verificaram que células CD34<sup>+</sup> Lin<sup>-</sup> também contém uma parcela de LT-HSC, mas provavelmente não na subpopulação Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>. Zhao e colaboradores (2000) caracterizam três subpopulações de CTH Lin<sup>-</sup>Sca-1<sup>+</sup>c-Kit<sup>+</sup>: (1) CD38<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup>, (2) CD38<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> e (3) CD38<sup>-</sup> CD34<sup>+</sup> (CRANE *et al.*, 2017).

Funcionalmente, as CT são controladas por uma combinação de fatores intrínsecos e por mecanismos externos responsáveis por regular sua participação na renovação do tecido, manutenção, reparo, proliferação, diferenciação e, por fim, na

quiescência celular. A manutenção e regulação sob a qual as CT são submetidas depende de um microambiente específico onde residem e que historicamente é conhecido como microambiente indutor da hemopoese ou nicho de célula tronco ou ainda, microambiente medular, descrito por SCHOFIELD em 1978 e que vem sendo cada vez mais conhecido desde então (ZHAO *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2003; MORRISON & SCADDEN, 2014).

O ambiente medular se caracteriza pela presença de células hemopoéticas e mesenquimais, sendo estas últimas as responsáveis pela formação do estroma medular, caracterizado pela presença de fibroblastos, adipócitos, macrófagos, células endoteliais e osteoblastos provenientes da diferenciação, proliferação e maturação das células tronco mesenquimais (CTM) presentes neste ambiente (SMITH, 2003).

As células do estroma medular são responsáveis pela formação da matriz extracelular (MEC) e pela produção de substâncias solúveis, como as citocinas IL-3, IL6, IL-7 e IL-11, por exemplo, e os fatores de crescimento G-CSF, GM-CSF e SCF, os quais possuem efeito regulatório sobre a hemopoese, além de substâncias insolúveis como colágeno, fibronectina, laminina, proteoglicanos e ácido hialurônico, secretadas, principalmente pelos fibroblastos, e que são responsáveis por não só preencherem os espaços extracelulares, mas por controlarem a adesão, a migração e a proliferação de diferentes células por meio de proteínas de superfície de membrana, como as integrinas e as selectinas (TAICHMAN, 2005).

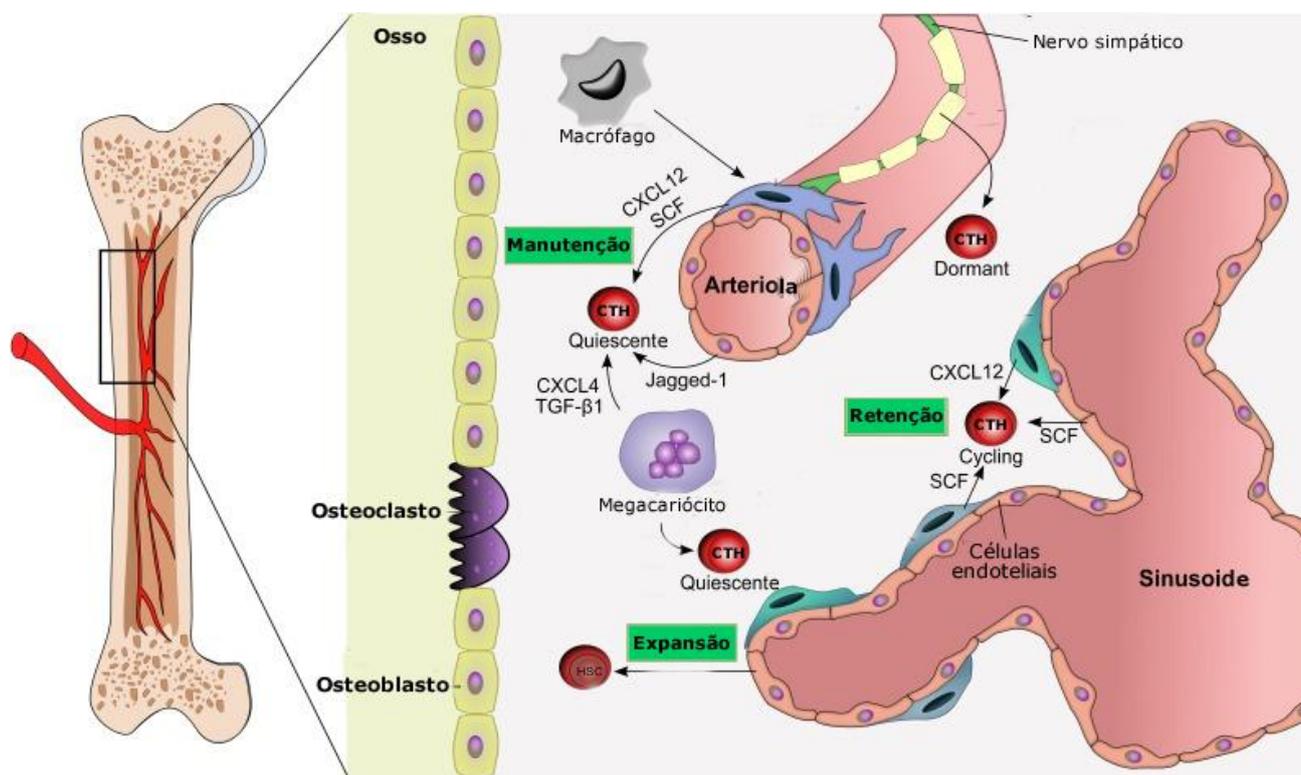
As CTH dão origem a todas as linhagens de células sanguíneas e do sistema imunológico e, segundo Schoffield (1978), residem em microambientes da medula óssea. Esses microambientes são denominados nichos perivascular e endosteal e oferecem as CTH sinais regulatórios essenciais para a sua manutenção, proliferação e diferenciação para produzir adequadamente células sanguíneas durante toda a vida (MORRISON & SCADDEN, 2014).

O nicho perivascular na medula óssea é definido como um local de mobilização, proliferação e diferenciação de células progenitoras e sanguíneas maduras. O aporte de sangue para fornecer oxigênio e nutrientes necessários para as células se dividirem e amadurecerem ocorre por meio de um sistema complexo de sinusóides que se ramificam em toda a cavidade medular. Os sinusóides têm lúmen aberto, permitindo um fluxo de sangue lento e a passagem de células maduras do sangue que são geradas na medula em direção ao sangue periférico (KIEL & MORRISON, 2006).

A concentração de oxigênio no microambiente medular varia em relação à perfusão local, tendo o nicho perivascular maior concentração de O<sub>2</sub> quando comparado ao nicho endosteal. Essa menor concentração de O<sub>2</sub> no nicho endosteal tem sido relacionado como

um modulador positivo do estado de quiescência de CTH, bem como na diminuição dos efeitos das citocinas, concluindo-se que a concentração de O<sub>2</sub> também pode ser considerado um efeito regulatório sobre a hemopoese (CORDEIRO-SPINETTI *et al.*, 2015).

O nicho endosteal é caracterizado pela presença de osteoblastos (**Fig. 2**) que se alinham à superfície óssea da medula óssea atuando na formação óssea bem como na manutenção do estado de quiescência e na mobilização da CTH (BOULAIS & FRENETTE, 2015).



**Figura 2. O nicho de HSC da medula óssea adulta.** CTH quiescentes são encontradas ao redor de arteriolas onde fatores como CXCL12 e SCF secretados por células neuronais perivasculares, endoteliais, de Schwann e simpáticas promovem sua manutenção. CTH ativadas estão localizadas perto de nichos sinusoidais que provavelmente são diversos em sua influência para a autorrenovação, proliferação e diferenciação. Células hemopoéticas, tais como macrófagos ou megacariócitos, são exemplos de descendentes derivados de CTH que podem alimentar o nicho para influenciar a migração ou proliferação de CTH. GFAP, proteína ácida fibrilar glial; TGF-β1, fator de crescimento transformador beta-1. Adaptado de BOULAIS & FRENETTE, 2015.

Os íons de cálcio são absolutamente essenciais para caderinas formarem junções aderentes entre as CTH e os osteoblastos do nicho. Entre cada par de repetição de caderina ocorre o posicionamento do Ca<sup>2+</sup>, mantendo esses domínios ligados e garantindo a adesão celular (KNUDSEN *et al.*, 1990).

Segundo Paredes-Gamero e colaboradores (2008) as citocinas que induzem respostas diferentes no sistema hemopoético, tais como a IL-3, IL-6, IL-7, SCF, GM-CSF, G-CSF e eritropoietina, são todas capazes de estimular a movimentação de  $Ca^{2+}$  intracelular em células progenitoras hemopoéticas podendo induzi-las a proliferação, a diferenciação e/ou morte. O aumento da concentração de  $Ca^{2+}$  intracelular pode ativar a proteína monomérica Ras, a qual participa ativamente de processos de proliferação e diferenciação celular bem como pode ser associado a mecanismos que levam a morte celular por apoptose e necrose (CULLEN & LOCKYER, 2002).

Trabalhos do nosso grupo vêm demonstrando que a desnutrição proteica causa diversas alterações no ambiente medular como o aumento de deposição de fibronectina e laminina na matriz extracelular (XAVIER *et al.*, 2007) e aumento do número de células adipócitos-*like*, os quais regulam negativamente a hemopoese, implicando na diminuição na produção de células sanguíneas maduras (CUNHA *et al.*, 2013).

Essas alterações implicam diretamente na resposta celular induzindo a redução na proliferação "*in vitro*" de células mielóides e, ainda, levando à diminuição dos progenitores eritróides, com consequente anemia causada, não por deficiência de ferro, mas sim por ineficiência da eritropoiese (BORELLI *et al.*, 2007) e alterações no ciclo celular das células tronco hemopoéticas decorrentes da desnutrição proteica (NAKAJIMA *et al.*, 2014). Além de alterações no ambiente medular, a desnutrição proteica também pode ser relacionada com a diminuição do espraiamento e das atividades fagocitária e fungicida de macrófagos peritonias (FOCK *et al.*, 2005; BORELLI & NARDINELLI, 2001)

O microambiente apresenta-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica que, além de fornecer o parênquima de sustentação para as células hemopoéticas, permite a formação de um "ambiente bioquímico" fundamental para a proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (MAYANI *et al.*, 1992).

Dessa maneira, supõe-se a existência de fatores regulatórios que formariam microambientes indutivos (DEXTER & TESTA, 1980). O termo microambiente indutivo é aplicado mais especificamente aos fatores que atuam em associação com o estroma do que aos fatores que atuam à distância.

Acredita-se que o microambiente indutivo possa controlar a hemopoese pela produção e secreção local de citocinas, pelas células estromais, pela co-localização de citocinas e/ou outras substâncias solúveis ou ainda, por estímulo direto pelo contato celular. As interações celulares são mediadas por diferentes grupos de moléculas de adesão as quais influenciam processos diversos como o crescimento e a diferenciação celular, a formação de junções e a polaridade celular (WILSON & TRUMP, 2006).

Estudos *in vitro* demonstraram que as células do estroma medular sintetizam várias citocinas, inclusive fatores de crescimento hemopoéticos e moléculas da MEC, indicando que estas células desempenham papel importante na regulação da hemopoese. Topograficamente a composição da MEC é distinta e associada ao desenvolvimento das diferentes linhagens sanguíneas, o que sugere a existência de interações específicas entre a célula-tronco, tanto hemopoética como a mesenquimal, e determinados elementos estromais. Os componentes moleculares da MEC da medula óssea mais estudados são os colágenos tipo I, III e IV, fibronectina, laminina, vitronectina e trombospondina, glicosaminoglicanos/proteoglicanos, particularmente o ácido hialurônico, sulfato de heparan e sulfato de condroitin (KIEL & MORRISON, 2006), os quais exibem importante papel funcional no controle de eventos celulares, tais como, adesão, migração, proliferação, diferenciação e sobrevivência celular (JARVELAINEN *et al.*, 2009).

A hemopoese é influenciada por vários estímulos que atuam nos diferentes níveis do processo. Desta maneira, há que considerar as interações célula-célula e célula - MEC, que ocorrem tanto no microambiente indutor da hemopoese como em outras localizações (MOHANDAS & PRENANT, 1978; WILSON & TRUMP, 2006), a ação dos diferentes fatores de crescimento e citocinas; a ação hormonal, particularmente de corticosteróides, estrógenos, andrógenos, hormônios tireoidianos, e a adrenalina, mediadores plasmáticos e celulares da resposta inflamatória e, obviamente, o estado nutricional do indivíduo (VITURI *et al.*, 2000; 2008; BORELLI *et al.*, 2004).

No caso dos hormônios tireoidianos, o hormônio para-tireoideo expande o número de CTH e, ainda, aumenta o número dessas células na circulação periférica quando é administrado em camundongos e em humanos. Esse hormônio demonstrou ser capaz de sinalizar as CTH e de regular tanto a sobrevivência quanto a proliferação das CTH/progenitoras hemopoéticas pela sua influência na atividade das células osteoblásticas e na manutenção da homeostasia dos minerais e do osso (GARRET & EMERSON, 2009).

A MEC constitui-se de uma complexa rede de macromoléculas que preenchem os espaços extracelulares e intercelulares, composta de proteínas e polissacarídeos secretados localmente, principalmente pelos fibroblastos, e distribuídos na forma de uma rede organizada, em íntima associação com a superfície da célula que as produziram (MAYANI *et al.*, 1992). Interações célula-célula e célula-MEC são mediadas por diferentes grupos de receptores presentes na superfície celular e denominadas de moléculas de adesão. As interações diretas célula-célula podem ocorrer via moléculas de adesão celular ou via “junções comunicantes” (ROSENDAAL & KRENÁCS, 2000).

A hemopoese envolve fenômenos complexos e altamente regulados dependentes da existência de células primitivas bem como de sua capacidade proliferativa, da ação regulatória de fatores de crescimento e de outros mediadores, dos componentes do microambiente e da relação arquitetural desse microambiente (BORELLI, 1992).

Um dos pré-requisitos para a hemopoese é a fixação da célula-tronco em microambientes particulares, possibilitando interações célula/célula e célula/MEC. Demonstrou-se que a implantação da célula-tronco é dependente de migração intramedular seguida de retenção seletiva em nichos endosteais específicos, sendo que a interação das células primitivas com o estroma depende da presença de proteoglicanos na MEC, secretada pelas células estromais (TAVASSOLI & MINGUELL, 1991).

A maior parte dos dados encontrados na literatura foi obtida de estudos *in vitro*, a partir do desenvolvimento do sistema de cultura de células da medula óssea de longa duração (CMOLD), descrito por Dexter e seus colaboradores (1977). Estes estudos mostraram que a síntese e deposição de moléculas da MEC coincidem com o início da produção de células hemopoéticas, sugerindo que a MEC seja necessária para o processo de hemopoese. A manutenção da hemopoese *in vitro* é dependente do estabelecimento de uma camada de células aderente intacta derivada do estroma medular (DEXTER *et al.*, 1977; MOORE & DEXTER, 1978).

As CMOLD, tipo Dexter são capazes de manter as CTH, os granulócitos, os monócitos, os eritrócitos imaturos e os megacariócitos, sendo que na produção da eritropoese é necessária a adição externa de eritropoetina. Nas CMOLD ocorre a formação de áreas de “cobblestones” que são nichos onde ocorre a hemopoese *in vitro* (DEXTER *et al.*, 1977). O contato próximo destas células promove várias interações entre as células para manter o estado indiferenciado ou o processo de diferenciação.

### **1.3 Papel do íon cálcio intracelular na proliferação e diferenciação celular**

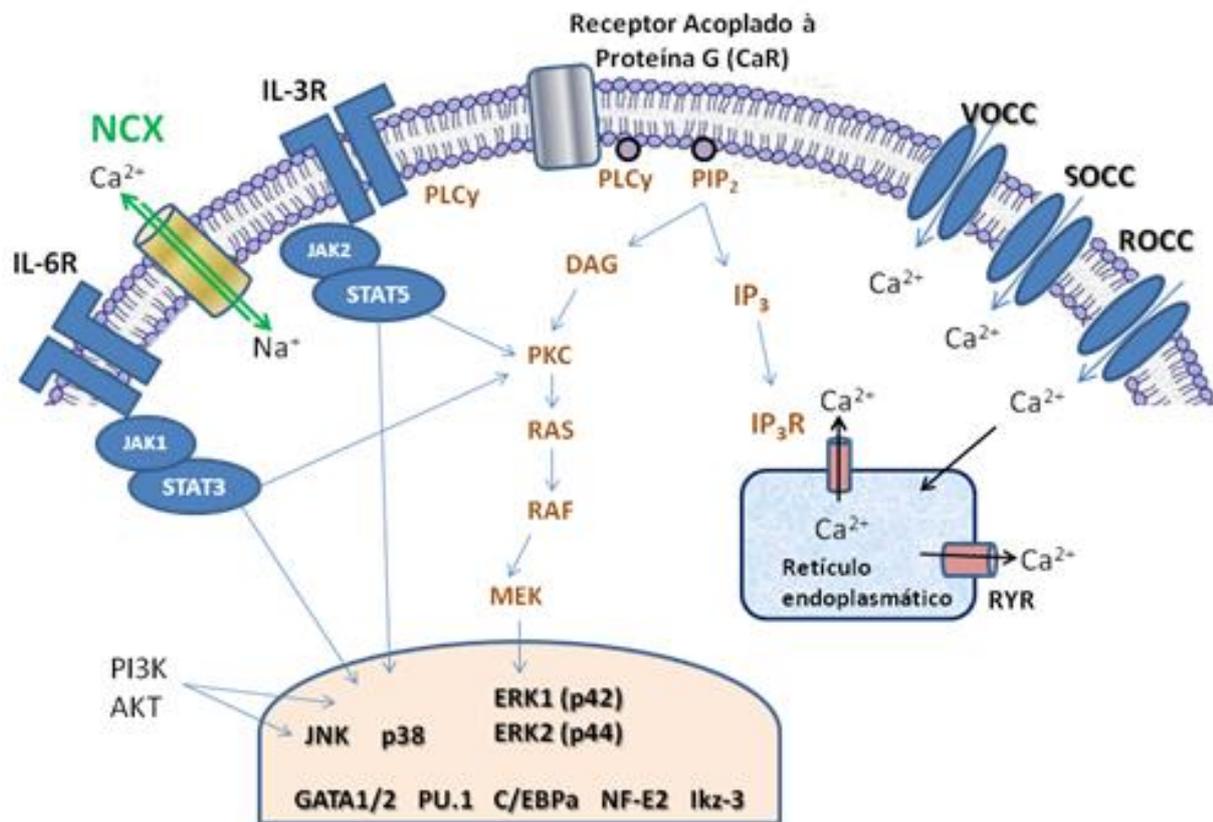
O  $\text{Ca}^{2+}$  é fundamental para a proliferação de células eucarióticas. Em culturas de fibroblastos, a diminuição do  $\text{Ca}^{2+}$  do meio externo para o processo de divisão promoveu o acúmulo de células na fase  $G_1$  do ciclo celular. Dois pontos do ciclo celular parecem sensíveis à retirada do  $\text{Ca}^{2+}$ : antes do ponto de restrição e no final da fase  $G_1$ , na entrada da fase S. A variação de  $\text{Ca}^{2+}$  parece ser um mecanismo necessário na primeira fase do ciclo celular para a ativação de genes envolvidos na proliferação como c-Fos e c-Jun, e mais tarde parece ser requerido para a fosforilação da “retinoblastoma protein” (Rb), necessária para a entrada na fase S (KAHL & MEANS, 2003).

Os mecanismos de participação do  $\text{Ca}^{2+}$  no controle da proliferação e diferenciação nas células da medula óssea são pouco conhecidos. O  $\text{Ca}^{2+}$  é um segundo mensageiro que participa de vários processos intracelulares. Sendo assim, é muito provável a participação ativa da via de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  nos processos de proliferação e diferenciação da CTH. O conhecimento desta via intracelular é necessário para um maior entendimento da proliferação, diferenciação e morte celular da CTH.

Uma das cascatas de sinalização mais conhecidas que intervém na proliferação e diferenciação celular é via da  $\text{Ras} \rightarrow \text{Raf} \rightarrow \text{MEK}$  (*extracellular signal-regulated* [ERK] *kinases*)  $\rightarrow$   $\text{MAPK}$  (*mitogen activated protein kinase*). Nos últimos anos têm sido descritas interações da proteína Ras com via de sinalização do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular ( $\text{Ca}^{2+}_i$ ). O  $\text{Ca}^{2+}_i$  e o diacilglicerol (DAG) podem modular diretamente a “*guanine nucleotide exchange factor*” (GEF), que promove a troca do GDP por GTP ativando a Ras, e a “*GTPase activating proteins*” (GAP), que inativa a Ras. A ativação dos receptores tirosina cinase e da Ras podem ativar canais de  $\text{Ca}^{2+}_i$  tipo VOCC (canais de cálcio ativados por voltagem) desencadeando efeitos intracelulares ou aumentar os níveis de IP3 (inositol trifosfato) e IP4 (inositol tetrafosfato) liberando de  $\text{Ca}^{2+}_i$  (PAREDES-GAMERO *et al.*, 2012).

Walker e colaboradores (2004) descrevem uma nova Ras chamada RASAL que é sensível a aumentos de  $\text{Ca}^{2+}_i$  oscilatórios, colocando a RASAL como uma nova proteína decodificadora dos sinais de  $\text{Ca}^{2+}_i$ . A ativação de cinases, como a PKC, ou CaMKs, promove cascatas de fosforilação de proteínas que levam a outras vias intracelulares como a da MAPK, ou proteínas como a Ras poderiam promover a ativação da sinalização de  $\text{Ca}^{2+}_i$ .

A proteína Ras é uma GTPase pequena, semelhante à subunidade  $\alpha$  da proteína G. Esta proteína participa nos processos de regulação de transdução de sinais. A proteína Ras ativa a Raf que por sua vez ativa uma cascata de cinases intermediárias chamadas MEKs até ativarem a MAPK. As MAPKs mais conhecidas são a Erk1/Erk2 (p42/p44), mas além da família das Erk existe a família da p38 e da c-Jun “NH2-terminal kinase” (JNK). A via da Ras-Raf-MEK-MAPK controla muitos eventos celulares como embriogênese, diferenciação e proliferação celular, e morte celular (CULLEN & LOCKYER, 2002). A **Figura 3** esquematiza a função do cálcio na ativação da via das MAPK.



**Figura 3. Sinalização do cálcio intracelular ativando fatores de transcrição hemopoéticos.** O efluxo de cálcio do meio extracelular para o meio intracelular pode ocorrer por canais tipo VOCC (canais de cálcio ativados por voltagem), SOCC (canais de cálcio ativados por estoque) e ROCC (canais de cálcio ativados por receptores), além de canais NCX (trocador sódio e cálcio). O aumento de cálcio também pode promover a ativação do Receptor acoplado à proteína G, que promove uma sinalização transmembrana para a ativação da fosfolipase C (PLC $\gamma$ ). Essa promove a hidrólise de fosfatidil-inosol-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>). O IP<sub>3</sub> se liga a seu receptor (IP<sub>3</sub>R) no retículo endoplasmático promovendo a liberação dos estoques de cálcio para o citosol por meio de canais como o de rianodina (RYR). DAG irá recrutar a proteína quinase C (PKC) que promove a fosforilação de RAS levando a cascata de ativações até ERK1/2, com produção de fatores de transcrição (GATA1/2, PU.1, C/EBP $\alpha$ , NF-E2 e I $\kappa$ B-3) para a proliferação e diferenciação celular. A PKC pode, ainda, ser ativada por citocinas, como IL-3 e IL-6 por sinalização JAK/STAT.

Nas células da medula óssea os mecanismos de participação do Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> no controle da proliferação e diferenciação são pouco conhecidos. Tem sido descrito que elevações da concentração de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático (Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub>) por ionóforos de Ca<sup>2+</sup> e tapsigargina induzem a diferenciação de células mielocíticas humanas em células dendríticas (CZERNIECKI *et al.*, 1997).

Na hemopoese, a participação da proteína quinase C (PKC) foi inicialmente descrita durante o processo de diferenciação de uma linhagem de células primitivas hemopoéticas dependentes de IL-3, FDCP-Mix 1. Nestas células altas concentrações do éster de forbol PMA (forbol 12-miristate-13-acetato), que mimetiza o DAG, induzem a diferenciação

mielocítica/monocítica, baixas concentrações de PMA induzem a diferenciação de eosinófilos (ROSSI & MCNAGNY, 1996).

Estudos posteriores mostraram que a PLC $\gamma$  participa da linfopoese (WANG *et al.*, 2000). A PLC $\gamma$ 1 é a isoforma predominantemente expressa nos linfócitos T (SERRANO & GRAHAM, 2005), enquanto que a PLC $\gamma$ 2 é expressa em células B (WANG *et al.*, 2000). Mais recentemente foi mostrado que o Ca<sup>2+</sup> citoplasmático pode modular tanto a proliferação como a diferenciação das células primitivas hemopoéticas por dois grupos de sinalizadores, as citocinas e agonistas purinérgicos (ATP e análogos) (BARBOSA *et al.*, 2011).

Foi demonstrado que pequenos aumentos da Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub> iniciados por citocinas (IL-3 e GM-CSF) estão relacionados com a proliferação, sem diminuir a porcentagem de CTH e com a participação de junções comunicantes. Diferentemente, grandes aumentos da Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub> por ATP e análogos promovem pequena proliferação, porém com rápida diferenciação mieloide diminuindo as CTH (BARBOSA *et al.*, 2011; PAREDES-GAMERO *et al.*, 2008).

Posteriormente determinaram-se os mecanismos de integração molecular entre a sinalização do Ca<sup>2+</sup> e da via da RAS/RAF/ERK em CTH humanas e murinas. Neste estudo observou-se que o aumento de Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub> por IL-3 e por GM-CSF ocorre por ativação da PLC $\gamma$ 2 e que inibidores da sinalização do Ca<sup>2+</sup><sub>cit</sub>, como o antagonista do receptor de IP<sub>3</sub>, da PKC e da CaMKII bloqueiam parcialmente a ativação da MEK1/2 (LEON *et al.*, 2011).

Ademais foram observadas diferenças na sinalização de Ca<sup>2+</sup> no processo de diferenciação monocítica e granulocítica. A diferenciação monocítica por M-CSF está associada com a ativação da ERK1/2 e a ativação da NFAT. Enquanto que a diferenciação granulocítica (G-CSF) ativa a JAK-1 e a STAT-3 e da CaMK-II e do fator de transcrição PU.1 (BARBOSA *et al.*, 2014).

#### **1.4 Relação da desnutrição com a hemopoese**

Dados do nosso laboratório e de outros autores evidenciam que, entre as alterações presentes na DP, está a alteração do tecido hemopoético, com modificações em componentes da matriz extracelular (BORELLI *et al.*, 1995; XAVIER *et al.*, 2007), alterações no ciclo celular das células tronco/progenitoras hemopoéticas (BORELLI *et al.*, 2009; NAKAJIMA *et al.*, 2014), redução da produção de células e precursores hemopoéticos tanto na série eritrocitária (BORELLI *et al.*, 2007), como na série leucocitária (BORELLI *et al.*, 1995; 1998; 2001; 2004; CRISMA, 2010; FOCK *et al.*, 2003; 2007; 2010), levando a anemia e leucopenia (BORELLI *et al.*, 2004; FOCK *et al.*, 2010).

A literatura e dados de nosso grupo demonstram que a resposta imune inata mediada por macrófagos torna-se prejudicada no indivíduo desnutrido. Em macrófagos, ocorre a redução da ativação (ANSTEAD *et al.*, 2003), deficiência na apresentação do antígeno (PAPADIMETRIOU & VAN BRUGGEN, 1988; REDMOND *et al.*, 1995), diminuição no espriamento e fagocitose (SANTOS *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2001; TESHIMA *et al.*, 1995), além de diminuição de espécies reativas de oxigênio (BORELLI & NARDINELLI, 2001; PAIXAO E SILVA *et al.*, 2011; SANTOS, 2013; TESHIMA *et al.*, 1995) e de nitrogênio (ANSTEAD *et al.*, 2003; FOCK *et al.*, 2003; REDMOND *et al.*, 1995; STAPLETON *et al.*, 2001). Há, também, redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (FOCK *et al.*, 2007; REDMOND *et al.*, 1991; STAPLETON *et al.*, 2001), tais como IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  e aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, observados tanto em camundongos Swiss webster como em C57bl/6J (CRISMA, 2010; SANTOS *et al.*, 2016).

Frente à DPE experimental também encontramos que progenitores grânulo-monocíticos apresentam menor capacidade proliferativa (BORELLI *et al.*, 1995; BORSATTO, 1999), assim como redução da população de células CD34<sup>+</sup> e de progenitores das linhagens mieloide e linfoide (BORSATTO, 1999; BORELLI *et al.*, 1995, 2007; XAVIER *et al.*, 2007). Um dos pré-requisitos para a hemopoese é a fixação da célula-tronco em microambientes particulares, possibilitando interações célula - célula e célula - MEC (TAVASSOLI & MINGUELL, 1991).

Temos encontrado em desnutrição proteica, hipoplasia de medula óssea de camundongos (BORELLI *et al.*, 1995) com evidências histológicas de alteração da matriz extracelular. Neste contexto, Vituri e colaboradores (2000, 2001) encontraram alterações na proporção de proteínas, especialmente de fibronectina, trombospondina e laminina na MEC de camundongos desnutridos, situação que, a nosso ver poderia estar contribuindo para a hipoplasia observada.

Posteriormente, tais alterações foram caracterizadas de forma imuno-histoquímica e ultra-estruturalmente, evidenciando aumento na deposição de fibronectina na medula óssea esternal de animais desnutridos especialmente em sítios endosteais/paratrabeculares (regiões de fixação de CTH) e aumento na deposição de laminina, particularmente em regiões perisinusais. Identificamos ativação endosteal, cujo significado ainda nos é desconhecido no contexto da desnutrição, não havendo, até o momento, relatos na literatura a esse respeito (XAVIER *et al.*, 2007).

Considerando que as moléculas da MEC estão envolvidas na adesão, regulação, proliferação, diferenciação e migração das células hemopoéticas (KLEIN, 1995; MAYANI *et*

*al.*, 1992), tais alterações podem modificar a colocação de uma série de fatores de crescimento e citocinas que poderiam interferir na regulação dos processos de crescimento e diferenciação de células hemopoéticas (BORELLI *et al.*, 1995; KLEIN, 1995; VITURI *et al.*, 2000).

Poucos são os estudos que correlacionam a desnutrição proteica ao metabolismo do cálcio. Gleason e colaboradores (1982) demonstraram que a DP prejudica a absorção intestinal de  $\text{Ca}^{2+}$  em ratos, devido à diminuição da proteína ligadora de  $\text{Ca}^{2+}$  (CaPB) em nível duodenal. Um estudo em crianças mostra que a administração de  $\text{Ca}^{2+}$  auxilia no ganho de peso e no restabelecimento de situação de desnutrição extrema (CABALLERO *et al.*, 1986).

Diante destes eventos, nossa hipótese é de que, ao menos em nosso modelo experimental, as alterações na proliferação, diferenciação e maturação ora observadas, podem ser decorrentes da alteração na celularidade medular, comprometendo os processos de sinalização celular e a fisiologia das células tronco/progenitoras.

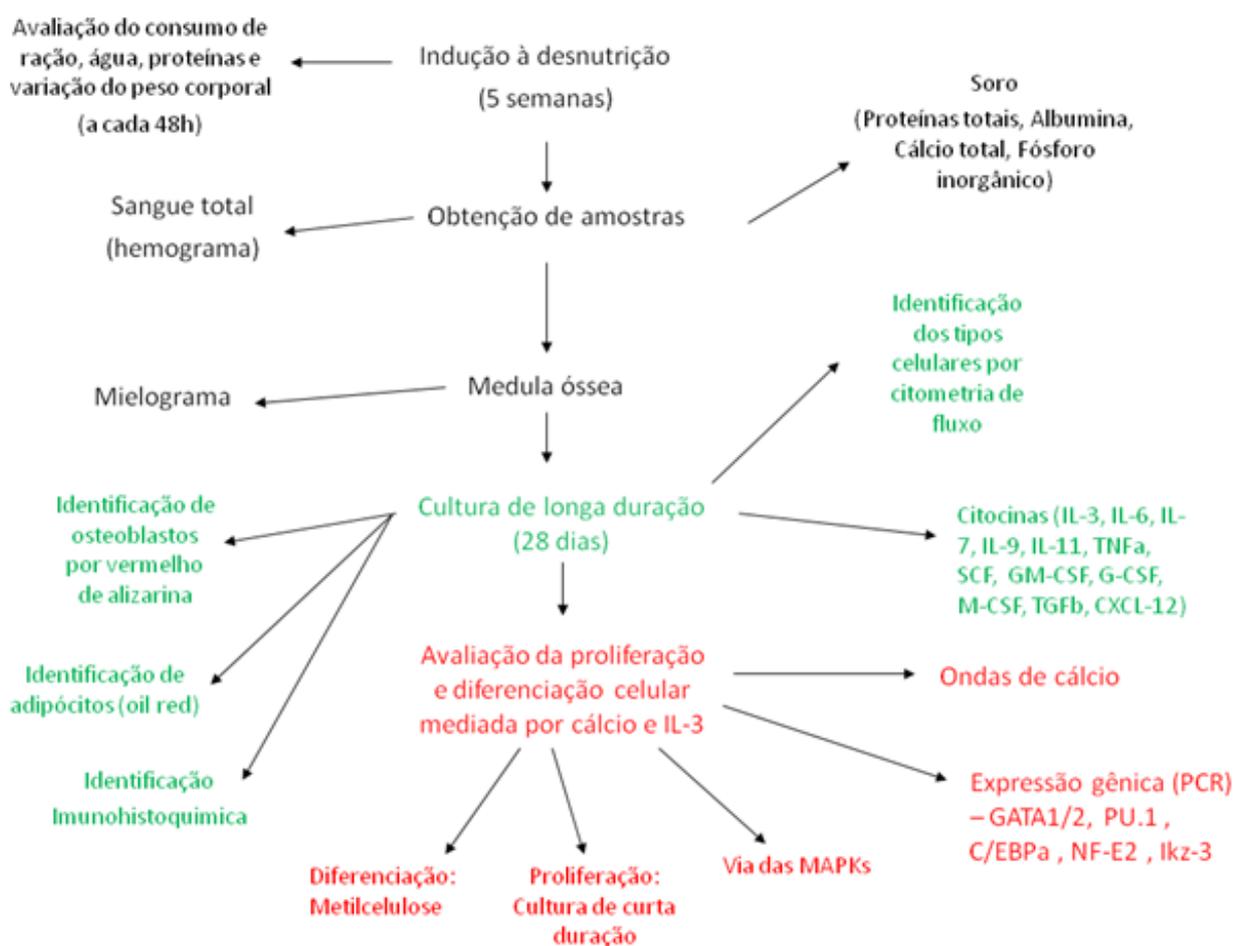
## 2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

Sabendo-se que animais desnutridos apresentam hipoplasia de órgãos linfopoéticos, com alteração no ciclo celular de células-tronco/progenitoras, modificação *in vivo*, da matriz extracelular da medula óssea e que o estroma medular obtido de animais desnutridos não mantém a hemopoese *in vitro*, nos propomos nesse trabalho:

- (I) Caracterizar a celularidade estromal e a cinética do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração;
- (II) Avaliar a produção de citocinas e fatores de crescimento (TNF $\alpha$ , IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, TGF $\beta$ , SCF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF e CXCL-12) no sobrenadante das culturas de longa duração;
- (III) Avaliar a proliferação e diferenciação hemopoética mediada por IL-3;
- (IV) Avaliar a participação do Ca<sup>2+</sup> nas vias reguladoras de proliferação e diferenciação da célula-tronco hemopoética.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado em três etapas, conforme mostra a **Figura 4**. A primeira parte consiste da caracterização nutricional, confirmando o modelo de desnutrição proteica. A segunda parte foi desenvolvida para avaliar a cinética do estabelecimento da celularidade medular em culturas de longa duração. Por fim, realizamos a avaliação do cálcio intracelular e estímulos por IL-3 para avaliar a proliferação e diferenciação pela via das MAPK, analisando a expressão de proteínas da via e a ativação de fatores de transcrição hemopoéticos.



**Figura 4.** Delineamento experimental realizado em três etapas: caracterização nutricional (grafado em preto); imunofenotipagem e caracterização da celularidade medular (verde); avaliação do cálcio intracelular por estímulo de IL-3 em células estromais e células-tronco hemopoéticas.

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos C56bl/6J, machos, de dois a três meses de idade, provenientes de colônias mantidas no Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas/Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (**CEUA/FCF/419**).

### 3.2. Rações

Após o desmame os animais receberam, *ad libitum*, ração de crescimento AIN-93G (REEVES, 1993), até completarem 45 dias de idade, quando, então se inicia à indução à desnutrição. Um grupo recebeu ração controle AIN-93M (REEVES, 1993; 1997) e outra, ração hipoprotéica, conforme **Tabela 1**.

Todas as rações foram preparadas em nosso laboratório, na forma de granulado. As rações foram conservadas a 4°C até o momento do uso. Utilizamos caseína comercial como fonte de proteína. Os animais do grupo **Controle** receberam ração contendo 12% de proteína e os animais do grupo **Desnutrido** (grupo experimental) receberam ração hipoproteica contendo 2% de proteína (BORELLI *et al.*, 2007; 2009). Nesse caso, os dois tipos de ração são isocalóricos, diferindo apenas na concentração proteica. A caseína fornece em torno de 80% de fósforo, portanto, para a ração hipoproteica que contém teores mais baixos de caseína, a composição da mistura mineral foi corrigida de acordo com a concentração proteica de cada lote, para que a deficiência de fósforo fosse suprida (REEVES, 1993). A Tabela 1 descreve os componentes das rações.

**Tabela 1: Composição das Rações (g/Kg ração)**

<b>Constituintes</b>	<b>Crescimento</b>	<b>Controle</b>	<b>Desnutrido</b>
<b>Amido</b>	627,5	641	741
<b>Sacarose</b>	100	100	100
<b>Caseína</b>	132	120	20
<b>Óleo de Milho</b>	80	80	80
<b>Celulose</b>	10	10	10
<b>Mistura mineral<sup>1</sup></b>	35	35	35
<b>Mistura vitamínica<sup>1</sup></b>	10	10	10
<b>Metionina</b>	3	1,5	1,5
<b>Bitartarato de Colina</b>	2,5	2,5	2,5
<b>Tert-butilhidroquinona</b>	0,01	0,01	0,01

<sup>1</sup>As misturas mineral e vitamínica foram preparadas sob encomenda de acordo com as recomendações de 1993 do Instituto Americano de Nutrição para camundongos adultos (REEVES *et al.*, 1993).

**Tabela 2 - Composição da Mistura Salínica (MIX)**

<b>Componentes</b>	<b>Ração Normoproteica (g/Kg de Mix)</b>	<b>Ração Hipoproteica (g/Kg de Mix)</b>
Carbonato de cálcio anidro	357,0	357,0
Fosfato de potássio monobásico	236,2	353,2
Cloreto de sódio	74,0	74,0
Citrato de potássio	39,0	0
Sulfato de potássio	46,6	46,6
Óxido de magnésio	24,0	24,0
Citrato férrico	6,06	6,06
Carbonato de zinco	1,65	1,65
Carbonato de manganês	0,63	0,63
Carbonato cúprico	0,30	0,30
Iodato de potássio	0,01	0,01
Selenito de sódio anidro	0,01025	0,01025
Paramobilidato de amônio tetrahidratado	0,00795	0,00795
Meta-silicato de sódio 9-hidratado	1,45	1,45
Sulfato de potássio e crômo	0,275	0,275
Cloreto de lítio	0,0174	0,0174
Ácido bórico	0,0815	0,0815
Fluoreto de sódio	0,0635	0,0635
Carbonato de níquel	0,0318	0,0318
Vanadato de amônio	0,0066	0,0066
Sacarose	212,646	134,596

Composição da mistura salínica para as dietas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição  
(REEVES *et al.*,1993).

**Tabela 3 - Composição da Mistura Vitamínica**

<b>Componentes</b>	<b>Rações Normoproteica e Hipoproteica (g/Kg de mix)</b>
Ácido nicotínico	3,00
Pantotenato de cálcio	1,60
Piridoxina-HCl	0,70
Tiamina-HCl	0,60
Riboflavina	0,60
Ácido fólico	0,20
D-biotina	0,02
Vitamina B12	2,50
Vitamina E	15,00
Vitamina A	0,80
Vitamina D <sub>3</sub>	0,25
Vitamina K	0,075
Sacarose	974,655

Composição da mistura vitamínica para as dietas de acordo com o Instituto Americano de Nutrição (REEVES *et al.*, 1993).

### **3.3. Indução à desnutrição**

Para a indução da desnutrição os animais foram previamente pesados e separados em gaiolas individuais e mantidos sob temperatura ambiente de 22 a 25°C, ciclo de luz claro-escuro de 12 horas (luzes acesas às 7h da manhã), umidade de 55 ± 10%. Durante o período de adaptação, que dura em média de 15 a 20 dias, todos os animais receberam, *ad libitum*, a ração controle e água. Os animais foram pesados e o consumo de ração foi avaliado a cada 48 horas. Após a fase de adaptação, quando todos os animais estabilizaram o peso corporal, os mesmos foram separados, aleatoriamente, em dois grupos: **grupo nutrido ou controle (C) e grupo hipoproteico ou desnutrido (D)**. Assim, os animais do grupo controle (C) continuaram a receber a ração controle; e os animais pertencentes ao grupo desnutrido (D) passaram a receber ração hipoproteica. O tempo de duração desse tratamento foi de cerca de 5 semanas (HUANG & FRAKER, 2003) e durante todo o tratamento, tanto o peso quanto o consumo de água e ração foram avaliados a cada 48 horas. Os grupos controle e desnutrido permaneceram sob as mesmas condições ambientais (BORELLI *et al.*, 2004).

### **3.4. Avaliação do estado nutricional dos animais**

A avaliação do estado nutricional dos animais foi baseada no peso corpóreo, no consumo diário das rações, no consumo total de proteína, hemograma dosagem de proteínas totais e albumina sérica (BORELLI *et al.*, 2004, NAKAJIMA *et al.*, 2014)

### **3.5. Avaliação da concentração proteica das rações**

A determinação da concentração proteica das rações foi feita pelo método de micro-Kjedahl e realizada no laboratório de Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

### **3.6. Obtenção de amostras sanguíneas**

As amostras sanguíneas foram obtidas a partir do plexo axilar de camundongos anestesiados com 10 mg/Kg de peso com cloridrato de xilazina (Rompum®, Bayer) e 100 mg/Kg de peso de cloridrato de quetamina (Ketamina®, Cristália), por via intramuscular. Amostras sem anticoagulante foram utilizadas para obtenção do soro e amostras utilizando-se EDTA 10% como anticoagulante para obtenção do sangue total, o qual foi utilizado para a realização do hemograma. O soro foi separado por centrifugação (2000 g por 10 minutos) a 4°C e utilizado para a dosagem das proteínas totais, albumina, cálcio e fósforo inorgânico.

### **3.7 Determinação de proteínas totais, albumina sérica, cálcio total e fósforo inorgânico**

A determinação de proteínas totais foi feita pelo método de Biureto (GORNALL *et al.*, 1949) enquanto a determinação de albumina foi feita pelo método do Verde de Bromocresol (DOUMAS *et al.*, 1971). A determinação de cálcio sérico total pelo método de cresoltaleina e as dosagens de fósforo inorgânico foram realizadas pelo método do fosfomolibdato não reduzido. Todas as amostras foram processadas em duplicata e as leituras realizadas em espectrofotômetro Varioskan Flash®.

### **3.8 Hemograma e contagem de reticulócitos**

A contagem global de eritrócitos e leucócitos, análise do volume hematócrito, dosagem de hemoglobina, índices hematimétricos e contagem de plaquetas foi determinada pelo analisador automático de células sanguíneas ABC Vet® (ABX Diagnostics) a partir do sangue total, logo após a coleta. A contagem diferencial dos leucócitos foi determinada a partir da preparação de extensões sanguíneas coradas pelo

método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947). As extensões coradas foram analisadas para diferenciação celular em microscópio óptico comum, contando-se aleatoriamente, no mínimo, 100 leucócitos.

Para a contagem de reticulócitos, o sangue recém-coletado com EDTA, foi imediatamente processado, utilizando-se corante supravital Novo Azul de Metileno e a contagem descrita por Brecher (BRECHER, 1949) foi realizada utilizando-se microscópio óptico (Olympus<sup>®</sup>, CH2), contando-se, no mínimo, 20 campos aleatórios.

### **3.9 Coleta de células da medula óssea**

Os animais de ambos os grupos (controle e desnutrido) foram anestesiados, exsanguinados e, por último, eutanasiados com superdosagem de anestésico e posterior deslocamento cervical. Com o auxílio de pinças e tesouras, os fêmures e tíbias foram obtidos e todo o tecido conjuntivo não ósseo foi removido.

Com o auxílio de agulha e seringa, foi realizada a lavagem da cavidade femural e das tíbias. A lavagem procedeu-se com 4 mL de meio Iscove's suplementado com 10 % soro equino, 100 UI/mL de penicilina G-sódica e 100 µg/mL de estreptomicina para os fêmures e 2 mL para as tíbias, sendo realizado um *pool* com as suspensões celulares obtidas dos fêmures e das tíbias.

A suspensão de células da medula óssea obtida a partir dessa lavagem foi centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de meio Iscove's e mantido no gelo até a realização do mielograma e/ou plaqueamento para cultura (SILVA, 2014). Todo o procedimento foi realizado em condições assépticas, utilizando-se material estéril e cabine de fluxo laminar.

### **3.10 Mielograma**

Uma alíquota das células em suspensão obtidas da medula óssea conforme descrito no item 3.9 foi diluída em líquido de Turk para a contagem de células nucleadas na câmara de Neubauer. Lâminas de citocentrifugado foram confeccionadas utilizando citocentrífuga Incbras<sup>®</sup> e, posteriormente, coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947), contando-se, no mínimo, 300 células por lâmina, para detecção dos tipos celulares presentes na medula óssea.

### **3.11 Cultura de medula óssea de longa duração (CMOLD)**

O estabelecimento do estroma medular foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Spooncer e Dexter (1997). Uma alíquota das células em suspensão obtidas da

medula óssea conforme descrito no item 3.9 foi diluída em Azul de Tripán® 1% para a contagem de células totais viáveis. As células foram plaqueadas ( $1,9 \times 10^6$  células/poço) em placas de cultura 24 wells (com e sem lamínula), utilizando-se meio de cultura comercial Myelocult® M 5300 (StemCell®) suplementado com hidrocortisona ( $1 \mu\text{Mol/L}$ ) (Sigma-Aldrich®). As células foram mantidas em estufa úmida, a 33°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

No 3º dia de cultura, 50% do meio foi substituído por meio de cultura novo e, a cada 7 dias (7º, 14º, 21º e 28º dias) durante todo o experimento, cerca de 50% do meio foi substituído por meio de cultura novo (DEXTER *et al.*, 1977). O meio de cultura retirado foi aliquoteado e armazenado a -80°C para posterior dosagem de citocinas e fatores de crescimento. A proliferação celular e o estabelecimento do estroma foram avaliados semanalmente, utilizando-se microscópio invertido (Nikon®, Eclipse TS 100).

### **3.12 Identificação celular na CMOLD por técnica de imunocitoquímica (ICQ)**

No 28º dia de CMOLD as placas foram retiradas da estufa e todo o meio de cultura foi removido. As células aderentes foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos e incubadas com solução de PBS contendo soro de cavalo na diluição de 1:100 para bloqueio das ligações inespecíficas. Após 30 minutos de incubação em câmara escura e úmida, foi retirado o excesso da solução de bloqueio e as células foram incubadas com anticorpo primário, segundo o fluoróforo a ser investigado (Tabela 4), diluído em solução de PBS 0,02M pH 7, 2, azida sódica 1%, albumina bovina 1%, sendo incubadas “*overnight*” (16 horas) em câmara escura a 4°C. Após esse período, as células foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos e, finalmente, foram incubadas com o anticorpo secundário anti-mouse conjugado com fluoróforos de interesse na diluição de 1:100 por 45 minutos em câmara úmida e a temperatura ambiente. Após esses procedimentos as células foram observadas em microscópio de fluorescência Nikon 80i.

### **3.13 Identificação de adipócitos por coloração com *oil red***

Nos 7º, 14º, 21º e 28º dias de CMOLD as lamínulas foram removidas. Depois da retirada do meio de cultura, as células foram fixadas dois minutos em propilenoglicol P.A. e, em seguida, adicionamos solução de *oil red* por 20 min. Após esse período, a solução de *oil red* foi retirada e adicionado propilenoglicol 85% por 1 min. As células foram lavadas duas vezes com água destilada e coradas com hematoxilina de Harris. Após lavagem, as lamínulas foram observadas em microscópio óptico invertido (Nikon®, DS-Ri1 para identificação de adipócitos (PROPHET *et al.*, 1992).

### 3.14 Identificação de osteoblastos por coloração de vermelho de alizarina

Nos 7º, 14º, 21º e 28º dias de CMOLD as placas foram retiradas da estufa e todo o meio de cultura foi removido. Foi adicionado diretamente ao poço 0,5mL de uma solução de vermelho de alizarina 2% por 15 minutos, após este intervalo os poços foram lavados com uma solução de PBS e realizada microscopia em microscópio invertido (Nikon®, Eclipse TS 100) para verificação de osteoblastos corados.

**Tabela 4 – Anticorpos utilizados para caracterização imunofenotípica**

	<b>Tipo celular</b>	<b>Painel</b>	<b>Clone</b>	<b>Catalogo</b>	<b>Empresa</b>
1	Série Eritróide	TER119 <sup>+</sup> PE	Ter-119	553989	BD
2	Megacariócitos	CD41 <sup>+</sup> FITC	MWReg30	133903	Biologend
3	Granulócitos	Gr-1 <sup>+</sup> APC F4/80 <sup>-</sup> FITC CD11b <sup>-</sup> PE	RB6-8C5 BM8 M1/70	108411 123107 101211	Biologend Biologend Biologend
4	Macrófagos	F4/80 <sup>+</sup> FITC CD11b <sup>+</sup> PE	BM8 M1/70	123107 101211	Biologend Biologend
5	Linfócitos T	CD3 <sup>+</sup> FITC	UCHT1	561806	BD
6	Linfócitos B	B220 <sup>+</sup> PE	RA3-6B2	553089	BD
7	Adipócitos	Bodipy <sup>+</sup> FITC F4/80 <sup>-</sup> APC	493/503 BM8	D3922 123107	Thermofisher Biologend
8	Cél. Endotelial	CD45 <sup>-</sup> APC CD31 <sup>+</sup> PE CD106 <sup>+</sup> FITC	30-F11 390 429 (MVCAM.A)	103111 102407 105705	Biologend Biologend Biologend
9	Osteoblastos	CD45 <sup>-</sup> PE OPN <sup>+</sup> FITC	30-F11 sc-21742	103111 AKM2A1	Biologend Santa Cruz
10	Fibroblastos	Vimentin <sup>+</sup> FITC CD45 <sup>-</sup> PE	D21H3 30-F11	12020S 103111	Cell Signaling Biologend
11	Célula tronco hemopoética	Lin <sup>-</sup> PE c-Kit <sup>+</sup> APC Sca-1 <sup>+</sup> PECy7 FLK2 <sup>-</sup> PE Thy-1.1 <sup>low</sup> FITC	Ter119, CD3, CD11b 2B8 E13-161.7 A2F10 OX-7	- 105811 122513 135305 202503	Biologend Biologend Biologend Biologend Biologend
12	Célula tronco mesenquimal	CD14 <sup>-</sup> PE CD45 <sup>-</sup> PE CD34 <sup>-</sup> PE CD105 <sup>+</sup> FITC Sca-1 <sup>+</sup> PECy7 CD44 <sup>+</sup> APC	M5E2 30-F11 MEC14.7 E13-161.7 IM7 MEM-226	555398 103111 119307 122513 103011 Ab18278	BD Biologend Biologend Biologend Biologend Biologend

### 3.15 Identificação dos tipos celulares por citometria de fluxo

Nos 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias de CMOLD as células aderentes foram removidas da placa de cultura por tripsinização, transferidas para um tubo tipo Falcon<sup>®</sup>, centrifugadas por 5 min a 300xg 4°C e ressuspensas em meio de cultura comercial Myelocult<sup>®</sup> M 5300 (StemCell<sup>®</sup>).

Uma alíquota do material ressuspenso foi diluída em Azul de Tripan<sup>®</sup> 1% para a contagem de células viáveis e outra alíquota foi utilizada para marcação celular para investigação de seus imunofenótipos, descritos na **Tabela 4**. Após incubação, o excesso de anticorpos foi retirado por lavagem utilizando PBS. As células foram centrifugadas por 5 min a 300xg 4°C, ressuspensas em PBS e analisadas em um citômetro de fluxo BD FACSCanto II <sup>®</sup>. Foram adquiridos, por citometria de fluxo, 300.000 eventos para análise das populações primitivas e 50.000 eventos para análise das populações maduras. Os dados analisados com auxílio do software FlowJo<sup>®</sup>.

### 3.16 Identificação de citocinas e fatores de crescimento

O meio de cultura obtido nos 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup>, 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias de CMOLD foi descongelado e foram determinadas quantitativamente as citocinas IL-3, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, TNF $\alpha$  e CXCL-12, e fatores de crescimento SCF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, TGF- $\beta$  empregando-se a técnica de imunoenensaio do tipo ELISA, utilizando-se o sistema comercial Quantikine ELISA (R&D System<sup>®</sup>).

### 3.17 Imunomarcação em culturas de curta duração

Foram realizadas culturas de curta duração (24h) para identificar as diferentes populações de células da medula óssea, como célula-tronco hemopoética, progenitores mieloide e linfoide, macrófagos, granulócitos, eritrócitos e linfócitos. As células foram estimuladas por 15 min com IL-3 para avaliar a atuação dessa citocina da diferenciação celular.

Foram marcadas  $1 \times 10^6$  células com *cocktails* de anticorpos (Becton Dickinson<sup>®</sup>), conforme **Tabela 4**. Foram adquiridos por citometria de fluxo 300.000 eventos para análise das populações primitivas e 50.000 eventos para análise das populações maduras. Os softwares *Cell Quest* versão 3.4 (Becton Dickinson<sup>®</sup>) e *FlowJo* versão 7.6.4 (Tree Star<sup>®</sup>) foram utilizados para a aquisição e análise de dados, respectivamente.

### **3.18 Ensaio de Unidades Formadoras de Colônia (CFU)**

Aproximadamente  $2 \times 10^4$  células da medula óssea, retiradas conforme item 3.9, foram misturadas com 1 mL de meio à base de metilcelulose (Methocult M3434, Stem Cell Technologies®). A mistura foi colocada em poços de 35 mm e cultivada em uma incubadora umidificada durante sete dias. No final deste período, foram contados o número de clusters (1 a 49 células) e de colônias (que consistem em mais de 50 células), usando um microscópio invertido com uma ampliação de 100x.

### **3.19 Ensaio de BrdU**

As células de medula óssea, retiradas conforme item 3.9, provenientes de camundongos controles e desnutridos receberam uma dose de 1 mg de 5-bromo-20-desoxiuridina (BrdU, Sigma-Aldrich®). A rotulagem de BrdU em células tronco hemopoéticas foi realizada como descrito anteriormente (ROTHAEUSLER & BAUMGARTH, 2006). A aquisição de dados foi realizada por citometria de fluxo.

### **3.20 Isolamento e a separação magnética de células LSK**

As células de medula óssea, retiradas conforme descrito no item 3.20, foram separadas por coluna magnética para remoção das células da linhagem hematológica utilizando-se *kit* de separação magnética por microesferas (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, Califórnia, EUA). O *kit* de separação continha os seguintes anticorpos monoclonais conjugados à biotina: CD5, CD45R (B220), CD11b, anti-Gr-1 (Ly-6G/C), anti 7-4 e Ter-119. As células assim obtidas por depleção negativa foram incubadas com anticorpo anti-Sca1 FITC (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, Califórnia, EUA), processo seguido por incubação com microesferas magnéticas anti-FITC. As células foram colocadas em coluna magnética e recolhidas para fenotipagem. A fenotipagem foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se os anticorpos antibiotina APC (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, Califórnia, EUA), Sca-1 PE (clone D7) (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA) e OPN PE (R&D Systems, Minneapolis, EUA). Um total de 20.000 eventos foram adquiridos em citômetro de fluxo FACSCalibur® (Becton Dickinson, San Jose, Califórnia, EUA) com íon argônio e as análises realizadas em aplicativo FlowJo® (Tree Star Inc, Ashland, EUA).

### **3.21 Medidas intracelulares de $Ca^{2+}$ por microscopia de fluorescência**

As células c-Kit<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> isoladas foram incorporadas com a sonda fluorescente de  $Ca^{2+}$  fura-2-AM (2  $\mu$ M) e ácido plurônico (0,02%). As leituras foram realizadas em dois comprimentos de ondas de excitação (340 e 380 nm) e a fluorescência de emissão da

amostra coletada em 505 nm. A razão entre as intensidades de fluorescência (R340/380 nm) corresponde ao valor da concentração de  $Ca^{2+}_{cit}$ . Os resultados foram calculados pela razão 340 e 380 nm e a concentração intracelular de  $Ca^{2+}$  foi obtida pela fórmula de Grynkiewicz e colaboradores (1985). Para tempos maiores de medidas intracelulares as células foram incorporadas com 10  $\mu$ M do indicador de  $Ca^{2+}$  Fluo-4-AM por 40 min a temperatura ambiente e o excedente foi retirado por lavagem da preparação (PAREDES-GAMERO et al., 2008). Os cromóforos dos anticorpos que reagiram com as células foram excitados em 480 nm e a emissão de fluorescência celular coletada no intervalo 500-550 nm. As imagens capturadas de modo temporal foram analisadas e a intensidade de fluorescência ao longo do tempo foi normalizada pela fluorescência basal ( $F_t/F_0$ ).

### **3.22 Medições de cálcio por microscopia confocal**

As populações de células LSK ( $Lin^- Sca-1^+ c-Kit^+$ ) foram previamente isoladas como descrito no item 3.20 para medir o  $Ca^{2+}_i$ . Após a separação das populações, as células foram centrifugadas em lamínas de vidro (25 mm). Para medições de concentração de  $Ca^{2+}_i$ , as células isoladas ou CMOLD foram incubadas durante 40 min em temperatura ambiente com 10 mM de Fluo-4 /AM (Molecular Probes/Invitrogen) e 0,01% de ácido plurico (Molecular Sondas/Invitrogen) e lavadas com solução fisiológica.

As CMOLD foram realizadas em poços contendo lamínula de vidro de 13 mm nas condições descritas anteriormente. Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído 2% em PBS por 30 min. As células foram lavadas com 0,1% de glicina e permeabilizadas em saponina 0,01% ambas diluídas em PBS. As células foram incubadas por 30 min com os anticorpos  $Lin^-$ ,  $c-kit^+$ ,  $Sca-1^+$  (para células-tronco hemopoéticas). O anticorpo foi diluído em PBS com 1% de BSA. Para a visualização desta marcação foi utilizado um anticorpo secundário anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488 (4  $\mu$ g/ml) durante 40 min.

Imagens foram capturadas com um microscópio confocal (Zeiss, Axiovert 100M, Oberkochen, Alemanha) equipado com um scanner a laser (Zeiss, LSM 510 META) e um objetivo 63 (Plan-Neofluor, 1.4 abertura numérica) sob imersão em óleo. A sonda Fluo-4 foi excitada com um laser de argônio (488 nm) e a emissão de luz foi detectada usando um detector META (500-550 nm) do laboratório multiusuários do Instituto de Farmacologia e Biologia Molecular (INFAR), da UNIFESP/EPM. As imagens foram coletadas em intervalos de 8 segundos aproximadamente. A intensidade da fluorescência foi normalizada com referência à fluorescência basal o software Examiner 3.2 (Zeiss) e Spectralyzer (NJ, EUA).

### 3.23 Avaliação da expressão e ativação de proteínas da via de sinalização MAPK por citometria de fluxo

Após os estímulos celulares com a citocina IL-3 (10 ng/mL) as células totais da medula óssea foram fixadas em solução de paraformaldeído 2% por 30 min. As células foram lavadas com 0,1% de glicina e permeabilizadas com triton X-100 0,001% ambas diluídas em PBS e incubadas por 2h com os anticorpos anti-proteínas fosforiladas relacionadas na **Tabela 5** com a proliferação e diferenciação (p-CaMKII, p-PKC, p-PLC $\gamma$ , p-RAS, p-ERK1/2, p-STAT3, p-STAT-5, p-JAK1, p-JAK2 e p-AKT) diluídos em PBS com 1% de albumina. Ademais foram utilizados anticorpos para o reconhecimento da célula tronco hemopoética LSK (Lin<sup>-</sup> Sca-1<sup>+</sup> c-Kit<sup>+</sup>).

As células foram lavadas com glicina 0,1 M e permeabilizadas com Triton X-100 (0,001%) ou saponina (0,01) durante 15 min, para marcação de forma ativas de vias intracelulares acima citadas. Os marcadores primários contra as proteínas foram incubados por 1h, sendo revelados com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho, conjugados com Alexa Fluor 488 (4  $\mu$ g/mL). Todos os anticorpos foram diluídos em PBS com 1% de BSA e 0,05% de azida. Controles só com os anticorpos secundários foram realizados. Os dados foram expressos de forma quantitativa utilizando a intensidade de fluorescência. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD<sup>®</sup>).

**Tabela 5 – Anticorpos utilizados para a avaliação da expressão e ativação de proteínas por citometria de fluxo**

Anticorpo	Catálogo	Conjugado	Empresa
PLC gamma 2 (Tyr759)	bs-3339R	FITC	Cell Signaling
JAK1 (Tyr1034 + Tyr1035)	bs-3238R	FITC	Cell Signaling
JAK2(Tyr1007+Tyr1008)	bs-2485R	FITC	Cell Signaling
PKC alpha/beta/gamma	bs-3531R	FITC	Cell Signaling
CaMK2 (Tyr230)	bs-3081R	FITC	Cell Signaling
Phospho-Akt (Ser473) (193H12) Rabbit mAb	2336S	FITC	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Mouse mAb	4374S	FITC	Cell Signaling
Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) Rabbit mAb	4323S	FITC	Cell Signaling
Phospho-Stat5 (Tyr694) (C71E5) Rabbit mAb	3939S	FITC	Cell Signaling

### 3.24 Extração e análise de RNA total

O RNA total foi obtido a partir das células tronco hemopoéticas, separadas conforme item 3.20, dos animais dos grupos Controle e Desnutrido, usando o kit *RNeasy Mini* (Qiagen, Incorporated, Chatsworth, EUA) com tratamento com DNase e seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, o RNA total foi imediatamente mensurado

por espectrofotometria pelo equipamento *NanoVue Plus* (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A absorbância máxima dos ácidos nucleicos sob luz UV ocorre no comprimento de onda de 260 nm e a concentração de RNA total é dada em ng/μL, onde uma unidade de densidade óptica equivale a 40 μg de RNA por mL de solução. A pureza do RNA total foi avaliada pela razão de absorbância  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ , sendo que foram consideradas adequadas para utilização as amostras cujas razões de absorbância encontravam-se na faixa entre 1,9 e 2,1. A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose 1,0%. As amostras de RNA foram armazenadas em alíquotas a -80°C até que a transcrição reversa fosse realizada.

### **3.24.1 Síntese do DNA complementar**

O DNA complementar (cDNA) das amostras das células tronco hemopoéticas, separadas conforme item 3.20, foi sintetizado a partir de RNA total. Foi utilizado o sistema comercial *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), que utiliza a enzima transcriptase reversa *MultiScribe™*. A síntese de cDNA foi realizada a partir de 500 ng de RNA total em um volume total de 10 μL em água livre de DNase e RNase. A proporção de reagentes utilizada para a transcrição reversa foi: 2,0 μL de 10x *RT Buffer*, 0,8 μL de 25x *dNTP Mix* (100 mM), 2,0 μL de 10x *RT Random Primers*, 1,0 μL de transcriptase reversa *MultiScribe™*, 1,0 μL de inibidor de RNase e 3,2 μL de água livre de DNase e RNase, totalizando um volume final de 20 μL. A reação foi feita sob as seguintes condições de ciclagem: incubação dos reagentes por 10 minutos a 25°C, aquecimento a 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C, seguindo as instruções do fabricante. A eficiência da reação de transcrição reversa foi considerada igual para todas as amostras. O cDNA obtido foi armazenado a -40 °C até a realização da PCR real time.

### **3.24.2 Seleção dos genes de referência e de interesse**

A análise da expressão gênica das células tronco hemopoéticas, separadas conforme item 3.20, foi feita pelo método de quantificação relativa, no qual foi utilizado um gene de referência como controle endógeno. Neste intuito, foram testados quatro genes constitutivos (*ACTB*, *GAPDH*, *HRPT1* e *RN18s*) e testados “pools” de dois tipos de amostras: (1) CTH/Controle; (2) CTH/Desnutrido. Os resultados foram avaliados pelo programa *geNorm™*.

Foi realizada uma revisão bibliográfica na qual os genes de interesse foram selecionados a partir de marcadores potenciais descritos em estudos prévios. Os genes de

interesse selecionados para este trabalho estão descritos na **Tabela 6**.

A eficiência dos ensaios de amplificação foi calculada utilizando-se a curva padrão obtida da relação de diferentes concentrações de cDNA e os respectivos valores de limiar de amplificação (Ct – *Cycle Threshold*). Foram utilizadas as diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 a partir de um *pool* contendo cDNA extraído de célula tronco mesenquimal, sendo que os pontos da curva foram feitos em triplicata. O cálculo da eficiência foi feito de acordo com a fórmula:  $E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular})} - 1$ . Foram realizadas curvas de eficiência para os genes de referência e de interesse.

### 3.24.3 Determinação da expressão dos genes de interesse

A determinação da expressão dos genes listados na **Tabela 6** foi feita por PCR (reação em cadeia de polimerase) em tempo real utilizando o sistema *TaqMan*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e os ensaios conduzidos no equipamento *A&B StepOne Plus Real-Time PCR System*<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA). Neste sistema, a amplificação é avaliada por monitoramento contínuo da fluorescência de cada amostra, entre 520 e 660 nm, de forma que a intensidade de fluorescência detectada é diretamente proporcional à quantidade de cDNA presente na amostra. Estes dados são traduzidos por um software específico e plotados em um gráfico que mostra a intensidade de fluorescência *versus* o número de ciclos. Quanto maior a quantidade de cDNA molde presente no início da reação, menor é o número de ciclos para detecção de uma intensidade de fluorescência estatisticamente significativa.

**Tabela 6:** Avaliação da expressão dos genes selecionados pela técnica de PCR em tempo real.

Símbolo do gene	Nome do gene	Espécie	Catálogo	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
<b>Genes para avaliação da função das CTH</b>				
GATA1	<i>GATA binding protein 1</i>	<i>Mouse</i>	<a href="#">Mm01352636_m1</a>	73
GATA2	<i>GATA binding protein 2</i>	<i>Mouse</i>	<a href="#">Mm00492301_m1</a>	57
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>	<i>Mouse</i>	<a href="#">Mm01337569_m1</a>	73
C/EBPa	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha</i>	<i>Mouse</i>	<a href="#">Mm00514283_s1</a>	99
IKZF3	<i>IKAROS family zinc finger 3</i>	<i>Mouse</i>	<a href="#">Mm01306721_m1</a>	80
NF-E2	<i>nuclear factor, erythroid derived 2</i>	<i>Mouse</i>	<a href="#">Mm00801891_m1</a>	67
Pu.1	<i>Transcription factor PU.1</i>	<i>Mouse</i>	<a href="#">Mm03938870_g1</a>	71

pb: pares de bases

O volume total de reação de 10 µl é composto de 1,0 µL de cDNA, 5,0 µl de *TaqMan® Fast Universal Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), 0,5 µl de cada iniciador (sense e antisense) – marcado com sonda FAM e referência passiva ROX – e 3,5 µl de água livre de DNase e RNase. As condições de ciclagem são: pré-incubação por 2,0 minutos a 50°C e por 20 segundos a 95°C para desnaturação das dupla-fitas de cDNA, seguido de 40 ciclos de 01 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C.

Os valores quantitativos da expressão gênica foram obtidos pelos valores do Ct, que se caracteriza pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica foi utilizado o método de quantificação relativa (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de expressão relativa} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct calibrador})} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

O  $\Delta\text{Ct}$  é obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média dos Cts do controle endógeno, para normalização dos dados. Como calibrador, foi utilizada a média aritmética do  $\Delta\text{Ct}$  das CTH do grupo Controle, empregada como base para resultados comparativos. Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram utilizados controles negativos.

### **3.25 Análise estatística**

Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade e classificados em paramétricos ou não paramétricos, de acordo com sua distribuição em relação à curva de Gauss. Posteriormente, em função da distribuição gaussiana, foram definidos os testes (Teste T, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis). A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism v.5,0, sendo considerado estatisticamente significantes quando  $p \leq 0,05$

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

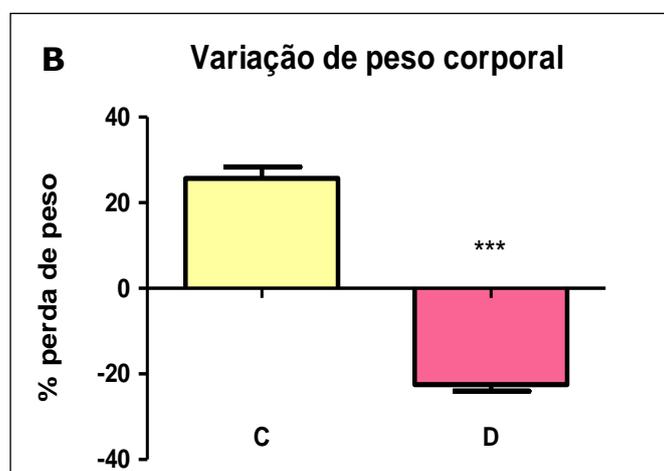
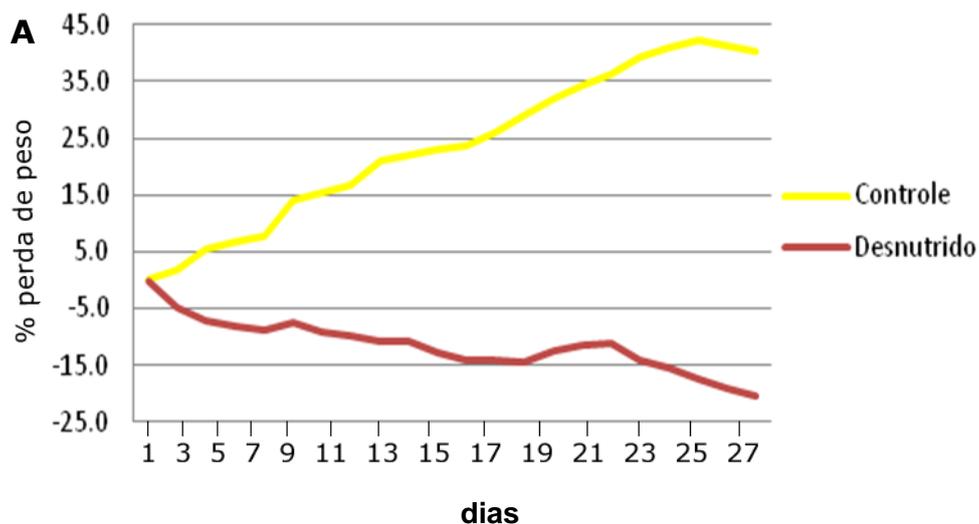
O camundongo C57bl/6 é uma espécie isogênica frequentemente utilizada para estudo do sistema imune e da hemopoese. Foram utilizados animais machos para evitar alterações características de fêmeas durante o ciclo estral e que podem interferir no perfil hematológico. Usamos animais de 2 a 3 meses de vida por já estarem em fase adulta e com seu quadro hematológico já estabelecido para a idade adulta, evitando variáveis pela baixa ou avançada idade (FOCK, 2005; WU *et al.*, 2013). O procedimento de indução da desnutrição utilizado em nosso trabalho tem duração de cinco semanas (35 dias). Traçando um paralelo com humanos, este período no camundongo equivaleria, aproximadamente, a dois anos no período de vida do ser humano (QUINN, 2005). Ou seja, o processo de indução à desnutrição por 35 dias equivaleria a dois anos de alterações na dieta, sendo o nosso modelo considerado crônico e grave.

O modelo experimental de desnutrição proteica desenvolvido nesse trabalho é baseado na redução de proteína na ração. Como o consumo de ração foi similar entre os grupos, não houve comprometimento de micronutrientes para os animais desnutridos. Ao final do período de cinco semanas, usado para indução da desnutrição, constatamos que o grupo desnutrido teve uma perda de peso de cerca de 20% em relação ao primeiro dia de dieta.

### 4.1 Avaliação do estado nutricional

#### 4.1.1 Análise do peso corporal

Após um período de 10-15 dias de adaptação, os animais foram separados em grupos controle e desnutrido, sendo a média de peso corporal dos grupos estatisticamente semelhante entre eles. Ao final do período de indução de cinco semanas, o grupo C (controle) apresentou ganho de  $27,4 \pm 2,2\%$  (média  $\pm$  SD) de peso e o grupo D (desnutrido) teve perda de  $-21,0 \pm 1,3\%$  (média  $\pm$  SD) de peso, diferenças estas estatisticamente significativas (**Fig. 5A e 5B**).



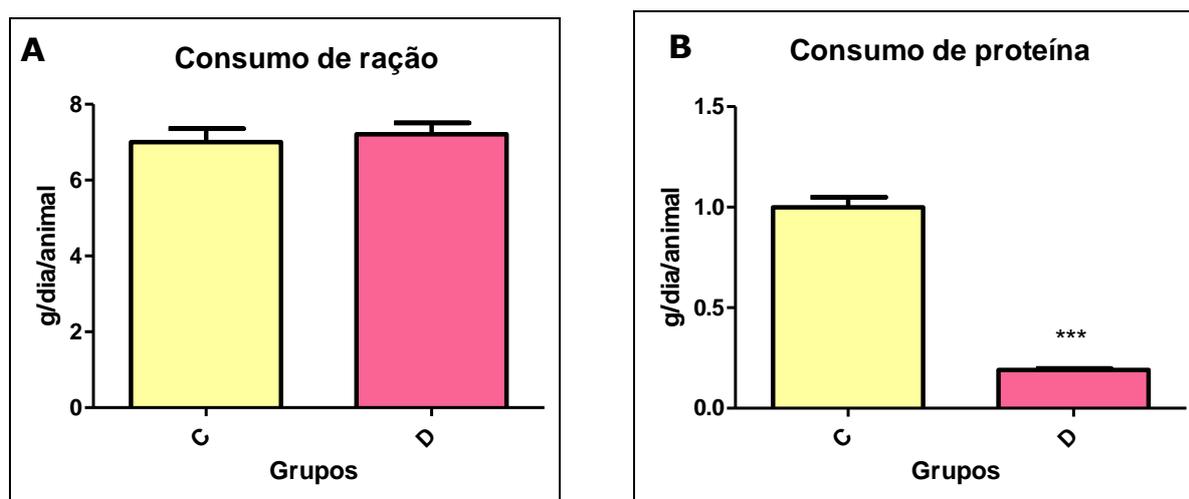
**Figura 5.** Resultados representam variação final do peso corporal após ingestão de dieta experimental (A) variação de peso corporal em função do tempo (B) variação final do peso corporal (média±SD) dos grupos C - Controle (n=34) e D - Desnutrido (n=34). \*\*\* Valores significativos para  $p < 0,001$ . Teste estatístico de Mann-Whitney.

A queda de peso do grupo desnutrido pode estar ligada ao fato do músculo esquelético ser um importante reservatório de proteínas, que é depletado quando ocorre um *déficit* deste nutriente, para fornecimento de aminoácidos necessários para os processos anabólicos reduzindo, assim, significativamente a massa corpórea (ALVES *et al.*, 2008). Estes resultados são confirmados com dados já obtidos pelo nosso grupo (XAVIER *et al.*, 2007; BORELLI, 2009; NAKAJIMA, 2014) e também em outros trabalhos desenvolvidos com modelo de desnutrição proteica (CROZIER *et al.*, 2009; SUGIYAMA *et al.*, 2011; RODRIGUES-BARBOSA *et al.*, 2012).

#### 4.1.2 Análise do consumo de ração e de proteínas

Os animais passaram por um período de cinco semanas de indução à desnutrição, no qual o grupo C (controle) ingeriu quantidade de ração diária semelhante ao grupo D (desnutrido):  $7,03 \pm 0,17\text{g}$  e  $7,23 \pm 0,13\text{g}$  (média  $\pm$  SDM), respectivamente.

O modelo de desnutrição é induzido pelo consumo reduzido de proteínas. Enquanto os animais do grupo controle consumiram uma média diária de proteínas de  $1,00 \pm 0,02\text{g}$  de ração, houve o consumo de apenas  $0,19 \pm 0,01\text{g}$  pelos animais do grupo desnutrido (Fig. 6).

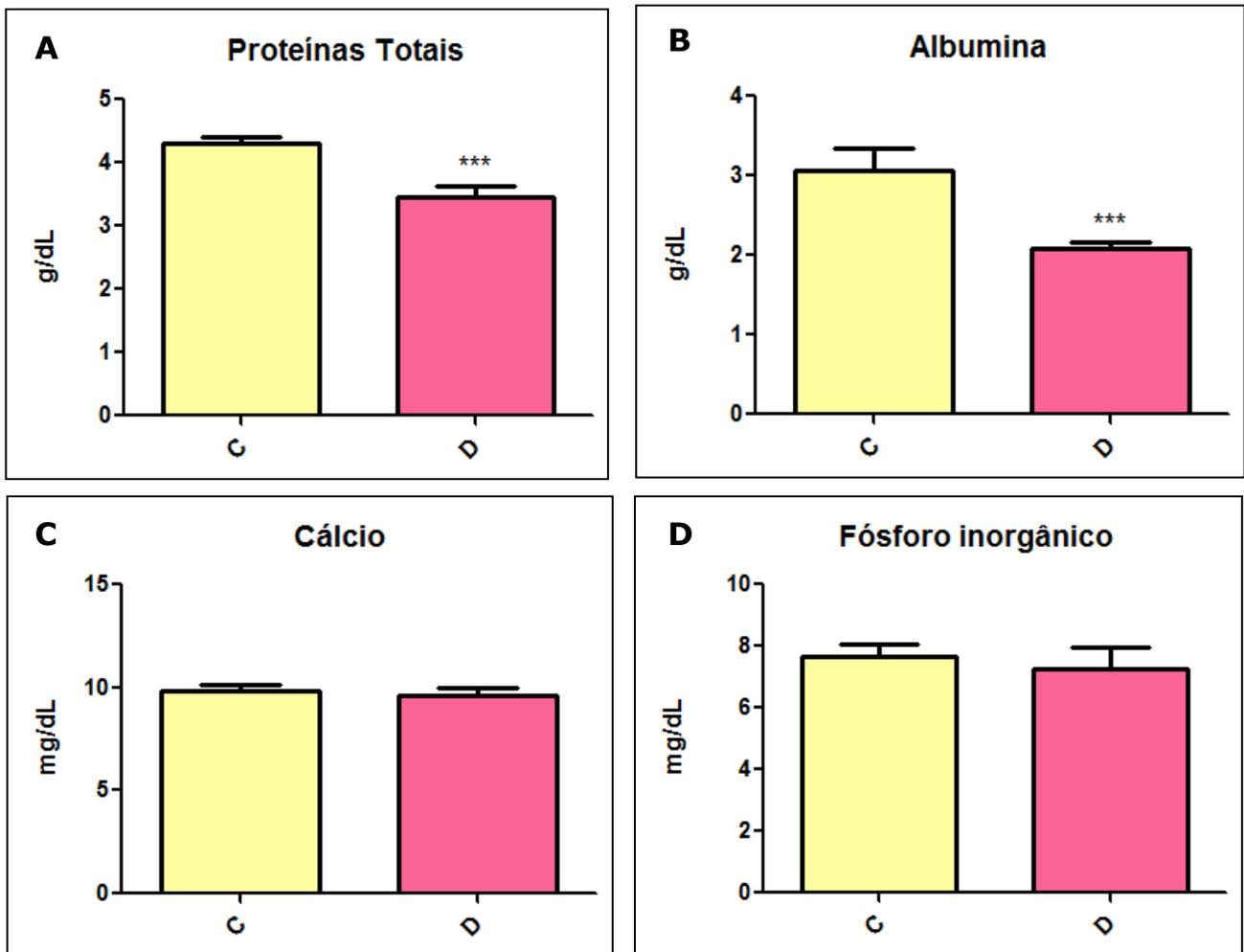


**Figura 6.** Resultados, em valores médios $\pm$ SDM, do consumo de ração (A) e proteínas (B) dos grupos C - Controle (n=34) e D - Desnutrido (n=34). \*\*\*Valores significativos para  $p < 0,001$ . n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

#### 4.1.3 Avaliação da concentração sérica de proteínas totais, albumina, cálcio e fósforo

Os animais do grupo desnutrido apresentaram concentrações séricas de proteínas totais ( $3,74 \pm 0,06$  g/dL) menores que os animais do grupo controle ( $4,62 \pm 0,15$  g/dL). Ao avaliar a concentração sérica de albumina, o Grupo C apresentou  $3,1 \pm 0,4$  g/dL enquanto que o Grupo D teve valores significativamente mais baixos ( $2,2 \pm 0,6$  g/dL).

Ao avaliarmos o cálcio sérico verificamos que não houve diferença significativa entre o grupo C ( $9,8 \pm 1,2$  mg/dL) e o grupo D ( $9,6 \pm 1,4$  mg/dL). Os valores de fósforo inorgânico também apresentaram dados similares entre os grupos C ( $7,6 \pm 0,9$  mg/dL) e o grupo D ( $7,2 \pm 1,5$  mg/dL) (Fig. 7).



**Figura 7.** Resultados, em valores médios±SDM, da concentração sérica de proteínas totais (A), albumina (B), cálcio (C) e fósforo (D) dos grupos C - Controle (n=25) e D - Desnutrido (n=25). \*\*\*Valores significativos para  $p < 0,001$ . n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

A menor ingestão de proteínas pelos animais desnutridos acarreta, como esperado, a redução de proteínas totais e albumina no soro. A albumina sérica é uma das principais proteínas associadas ao estado nutricional. A queda na concentração de albumina pode indicar deficiência de aminoácidos disponíveis para a síntese destas proteínas ou uma diminuição na biossíntese hepática decorrente de um suprimento limitado de substrato proteico (CUPPARI, 2009).

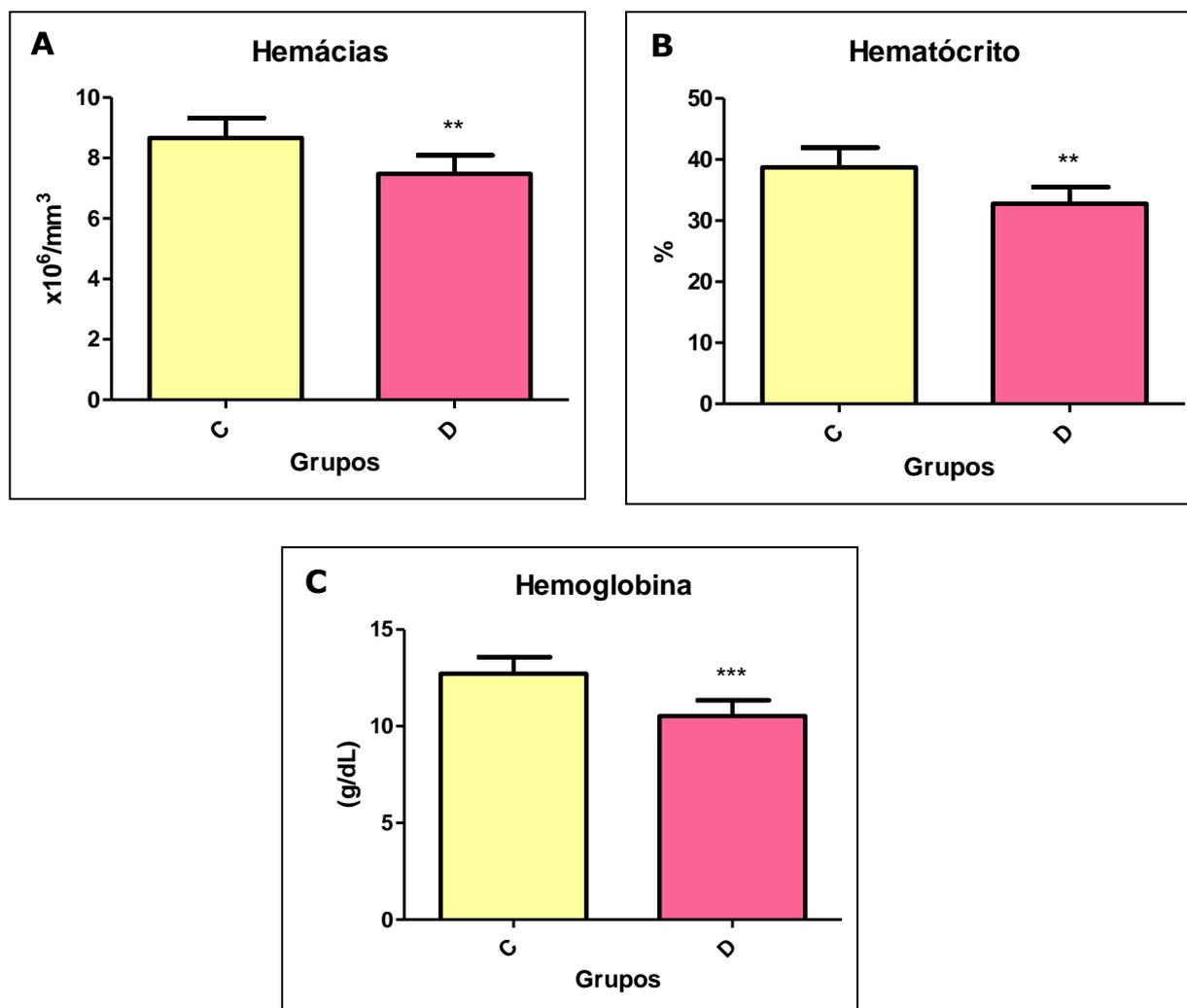
As concentrações séricas de  $\text{Ca}^{2+}$  e fósforo apresentaram valores semelhantes entre os grupos avaliados. Como os animais tiveram um consumo semelhante de ração e estes minerais são encontrados em quantidades iguais nas rações, verificamos que não houve alterações em suas proporções. Apesar da DP causa alterações da microarquitetura óssea com comprometimento da região trabecular (TSUJITA, 2016), essas alterações não são decorrentes de uma deficiência na ingestão ou absorção de cálcio.

## 4.2 Avaliação hematológica

### 4.2.1 Hemograma

#### 4.2.2 Eritrograma

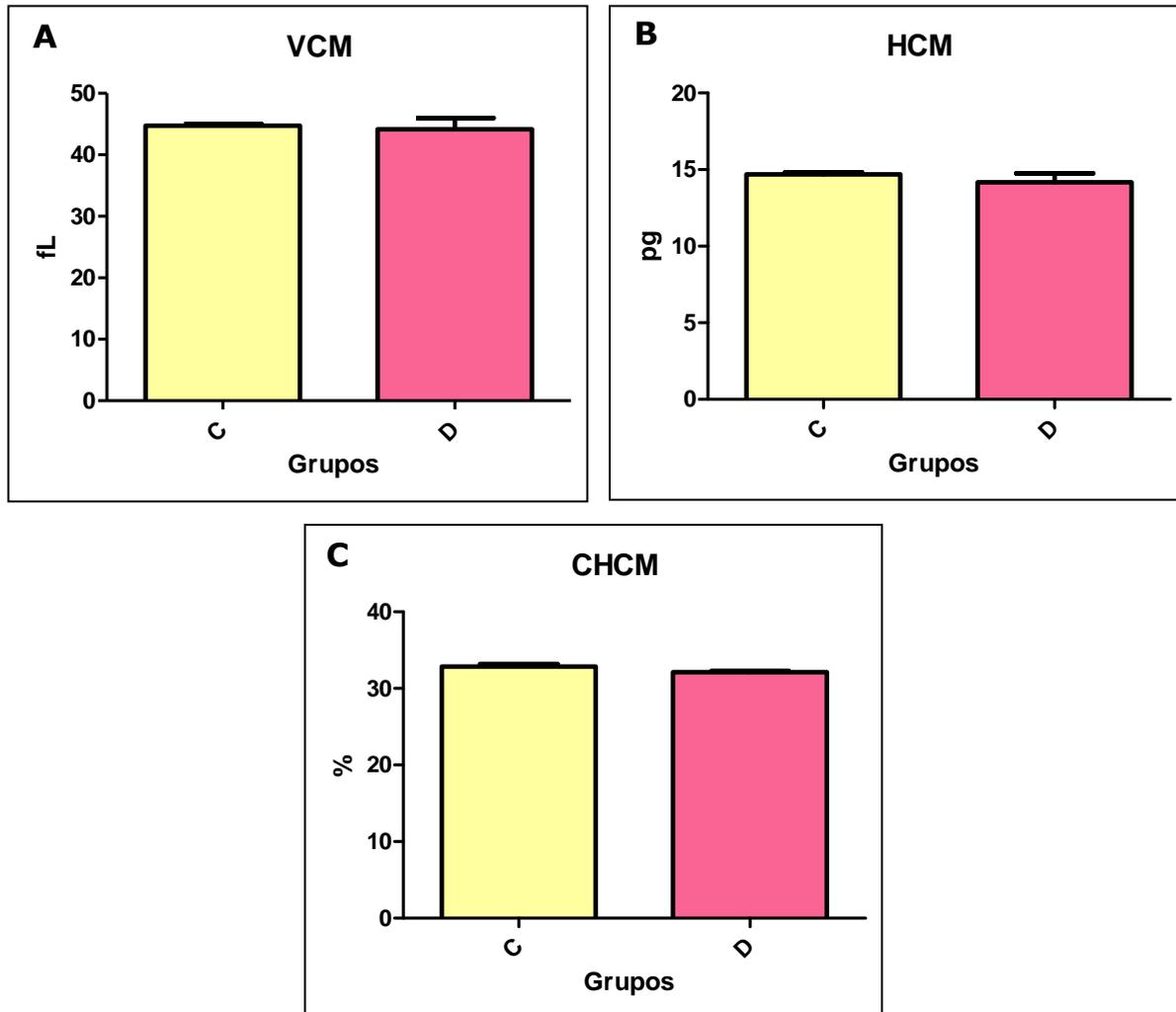
Os animais do grupo D apresentaram redução significativa do número de hemácias, hematócrito e hemoglobina, respectivamente ( $7,5 \pm 0,2 \times 10^6/\text{mm}^3$ ;  $32,9 \pm 3,2\%$ ;  $10,6 \pm 0,3$  g/dL, respectivamente) em relação aos animais do grupo C ( $8,7 \pm 0,2 \times 10^6/\text{mm}^3$ ;  $38,9 \pm 1,3\%$ ;  $12,7 \pm 0,3$  g/dL, respectivamente) (**Fig. 8**).



**Figura 8.** Resultados, em valores médios  $\pm$  SDM, do número de hemácias (A), hematócrito (B) e hemoglobina (C) dos grupos C - Controle (n=28) e D - Desnutrido (n=28). \*\*Valores significativos para  $p < 0,01$ ; \*\*\*Valores significativos para  $p < 0,001$ . n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

### 4.2.3 Índices hematimétricos

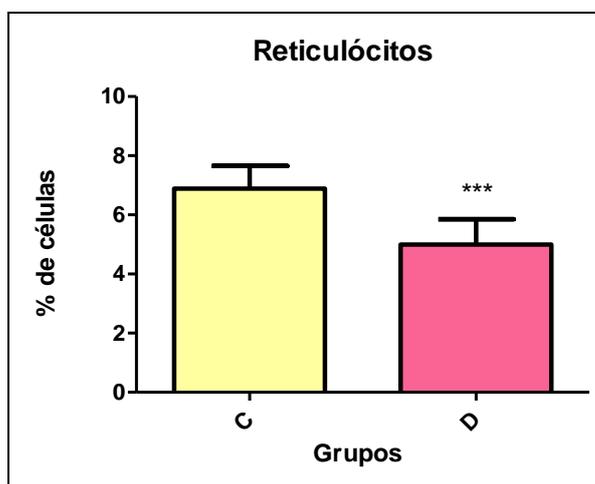
Os índices hematimétricos não apresentaram nenhuma diferença significativa entre os grupos. O VCM (volume corpuscular médio), HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) mostraram-se semelhantes entre o controle ( $44,7 \pm 0,2$  fl;  $14,7 \pm 0,1$  pg;  $32,8 \pm 0,3$  %, respectivamente) e desnutrido ( $44,1 \pm 1,8$  fl;  $14,2 \pm 0,5$  pg;  $32,1 \pm 0,2$  %) (**Fig. 9**).



**Figura 9.** Resultados, em valores médios  $\pm$  SDM, dos índices hematimétricos: VCM (A), HCM (B) e CHCM (C) dos grupos C - Controle (n=28) e D - Desnutrido (n=28). **n** representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

#### 4.2.4 Reticulócitos

A porcentagem de reticulócitos no sangue periférico apresentou diferença estatística em relação aos animais desnutridos (**Fig. 10**). Os animais do grupo desnutrido apresentaram média de  $5,14 \pm 0,36\%$  enquanto que os animais do grupo controle apresentaram  $6,95 \pm 0,33\%$ .



**Figura 10.** Resultados, em valores médios $\pm$ SDM, da porcentagem de reticulócitos no sangue periférico dos grupos C – Controle (n=14) e D - Desnutrido (n=14). \*\*Valores significativos para  $p < 0,001$ . n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

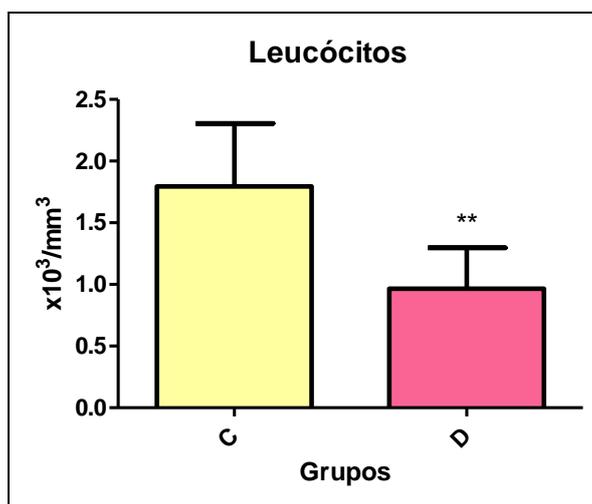
O hemograma apresentou valores reduzidos de hemoglobina, número de hemácias e hematócrito. No entanto, os índices hematimétricos (VCH, HCM e CHCM) apresentaram-se semelhantes nos dois grupos, caracterizando uma anemia normocítica, normocrômica. O tecido hemopoético, como todos os tecidos que apresentam uma alta taxa de renovação celular, tem uma alta demanda de nutrientes. A necessidade de proteína pelo processo de hemopoese poderia, por si só justificar a ocorrência de anemia e leucopenia, que são frequentemente encontrados em indivíduos desnutridos (IBRAHIM *et al.*, 2017).

A anemia, decorrente da desnutrição, apresenta, em nosso modelo, diminuição do número de reticulócitos que, associada à hipoplasia de medula observada, inclusive no setor eritróide, evidencia uma anemia não regenerativa, decorrente de alteração no processo de maturação de eritroblastos. A eritropoiese medular em animais desnutridos apresenta diminuição de células eritróides primitivas verificando-se que a maturação de eritroblastos encontra-se alterada. Também foi observado que os animais desnutridos apresentaram redução no número de células das unidades formadoras de colônias granulo-monocítica, unidades de formação expansiva eritróide (BFU-E) e unidades

formadoras de colônias eritróide (BORELLI *et al.*, 2007; ÖZKALE & SIPAHI, 2014) e, já demonstramos que a mesma não é decorrente da redução de ferro.

#### 4.2.5 Leucograma

O consumo de dieta hipoproteica causou redução significativa do número de leucócitos circulantes no sangue periférico ( $1,0 \pm 0,1 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) em relação ao grupo controle ( $1,9 \pm 0,2 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) (Fig. 11).



**Figura 11.** Resultados, em valores médios±SDM, do número de leucócitos no sangue periférico dos grupos C – Controle (n=28) e D - Desnutrido (n=28). \*\*Valores significativos para  $p < 0,01$ . n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

A desnutrição leva à leucopenia, com neutropenia, eosinopenia, monocitopenia e linfopenia. Tanto *in vivo* (BORELLI *et al.*, 1995) quanto *in vitro* (BORSATTO, 1999) desnutridos têm uma menor produção de progenitores de granulo-monocítica (GM-CFU), o que sugere que este é um dos fatores responsáveis pela hipoplasia nestas indivíduos, já que em nosso estudo encontramos uma menor produção de GM-CSF a partir do 21º dia de cultura (ÖZKALE & SIPAHI, 2014; SANTOS *et al.*, 2017).

As populações de linfócitos parecem ser afetadas pela desnutrição de maneira diferente: em áreas dependentes do timo, há uma redução do número de linfócitos T, especialmente a população de células CD4+, ao passo que o número de linfócitos B do baço, nódulos linfáticos e no sangue permanecer normal (BLATT *et al.*, 2010). De acordo com Frayn (1986), a linfopenia é resultado da redução da proliferação celular que, por sua vez, pode ser uma consequência direta da falta de proteínas ou elementos como ferro, zinco e cobre, ou devido ao desequilíbrio hormonal que envolve a adrenalina, insulina, tiroxina ou cortisol (FRAYN *et al.*, 1986).

Ao realizarmos a contagem diferencial relativa, não encontramos diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos tipos celulares presentes no sangue

periférico, no entanto, ao realizar a contagem diferencial absoluta, verificamos que o animal desnutrido apresenta linfopenia e neutropenia significativas.

**Tabela 7 – Contagem relativa de leucócitos no sangue periférico**

	<b>Controle</b>	<b>Desnutrido</b>
<b>Neutrófilos segmentados (%)</b>	13,7 ± 4,5	12,9 ± 3,1
<b>Eosinófilos (%)</b>	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,1
<b>Basófilos (%)</b>	0	0
<b>Monócitos (%)</b>	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
<b>Linfócitos (%)</b>	85,0 ± 4,5	87,3 ± 4,4

Resultados, em valores médios±SDM, do número relativo de neutrófilos segmentados, eosinófilos, monócitos, basófilos e linfócitos dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=8). n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

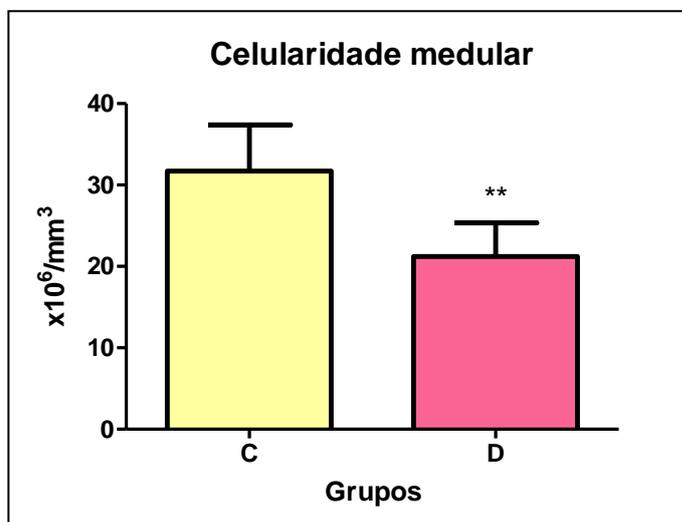
**Tabela 8 – Contagem absoluta de leucócitos no sangue periférico**

	<b>Controle</b>	<b>Desnutrido</b>
<b>Neutrófilos segmentados (/mm<sup>3</sup>)</b>	341,0 ± 150,7	128,2 ± 38,8**
<b>Eosinófilos (/mm<sup>3</sup>)</b>	7,6 ± 1,5	2,3 ± 0,4**
<b>Basófilos (/mm<sup>3</sup>)</b>	0	0
<b>Monócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	18,5 ± 2,2	5,4 ± 0,8**
<b>Linfócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	2164 ± 736,6	1044,0 ± 456,5**

Resultados, em valores médios±SDM, do número absoluto de neutrófilos segmentados, eosinófilos, monócitos, basófilos e linfócitos dos grupos Controle (n=8) e Desnutrido (n=8). n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Mann-Whitney. \*\*Valores significativos para p<0,01.

### 4.3 Mielograma

Foi observada redução significativa da celularidade da medula óssea em decorrência do quadro de desnutrição proteica ( $21,8 \pm 3,5 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) em relação aos animais do grupo controle ( $32,3 \pm 4,3 \times 10^6/\text{mm}^3$ ) (**Fig. 12**).



**Figura 12.** Resultados, em valores médios±SDM, do número de células nucleadas da medula óssea dos grupos C - Controle (n=28) e D - Desnutrido (n=28). \*Valores significativos para  $p < 0,01$ . n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

Realizamos também a contagem diferencial absoluta (**Tabela 8**) e relativa (**Tabela 9**) de células da medula óssea do fêmur e tíbia dos animais dos dois grupos. Verificamos que os valores absolutos encontram-se reduzidos em quase todas as linhagens do grupo desnutrido. A contagem relativa evidenciou redução significativa na quantidade de monócitos/macrófagos e eritroblastos jovens (pró-eritroblastos e eritroblastos basófilos) no grupo desnutrido.

**Tabela 9 – Distribuição absoluta das populações medulares**

<b>Tipo celular</b>	<b>Controle (x10<sup>7</sup>/mL)</b>	<b>Desnutrido (x10<sup>7</sup>/mL)</b>
Blasto	1,08 ± 0,32	0,94 ± 0,22 <sup>*</sup>
Forma jovem	1,01 ± 0,23	0,87 ± 0,11 <sup>**</sup>
Forma em anel	1,57 ± 0,11	1,42 ± 0,43
Segmentado	14,61 ± 4,5	9,33 ± 2,4 <sup>*</sup>
Eosinófilo	0,54 ± 0,24	0,52 ± 0,31 <sup>*</sup>
Monócito/macrófago	0,87 ± 0,26	0,46 ± 0,33 <sup>**</sup>
Plasmócito	0,18 ± 0,07	0,09 ± 0,05 <sup>**</sup>
Linfoblasto/Linfócito	3,8 ± 0,92	2,6 ± 0,85 <sup>*</sup>
Pró-eritroblastos e eritroblastos basófilo	1,62 ± 0,38	1,59 ± 0,34
Eritroblastos policromático e ortocromático	9,2 ± 2,8	6,0 ± 1,6 <sup>*</sup>

Resultados, em valores médios±SDM, dos valores absolutos das populações medulares dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=6). \*Valores significativos para p<0,05. \*\*Valores significativos para p<0,01. n representa número de animais analisados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

**Tabela 10 – Distribuição relativa das populações medulares**

<b>Tipo celular</b>	<b>Controle (%)</b>	<b>Desnutrido (%)</b>
Blasto	2,85 ± 0,89	2,74 ± 0,90
Forma jovem	3,90 ± 0,52	3,98 ± 0,55
Forma em anel	5,66 ± 0,55	5,57 ± 0,72
Segmentado	39,5 ± 0,67	39,4 ± 1,82
Eosinófilo	2,68 ± 0,81	2,63 ± 0,92
Monócito/macrófago	2,78 ± 0,89	1,67 ± 0,85 <sup>*</sup>
Plasmócito	0,29 ± 0,32	0,34 ± 0,29
Linfoblasto/Linfócito	14,1 ± 1,32	13,5 ± 2,23
Pró-eritroblastos e eritroblastos basófilo	2,66 ± 1,02	1,78 ± 0,89 <sup>*</sup>
Eritroblastos policromático e ortocromático	22,6 ± 1,33	24,1 ± 1,67

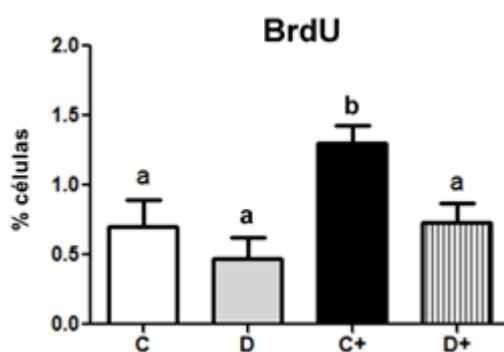
Resultados, em valores médios±SDM, da porcentagem das populações medulares dos grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=6). \*Valores significativos para p<0,05. n representa número de animais analisados. Teste estatístico de Mann-Whitney.

A atrofia medular encontrada em DP, assim como a anemia e leucopenia presente no sangue periférico, sugere um impedimento da capacidade proliferativa das células progenitoras, uma vez que a diminuição do compartimento da medula não foi devido ao efluxo acelerado de células de sangue periférico. Alterações bioquímicas, estruturais e celulares do microambiente hemopoético na DP podem contribuir para a atrofia medular observada nesse estado (XAVIER *et al.*, 2007; BORELLI *et al.*, 2009).

Foi observada menor celularidade em todas as populações da medula óssea dos animais desnutridos, isto acontece devido à diminuição da população das CTH presentes no nicho medular. O uso de BrdU (BromodeoxiUridina) como um análogo de timidina incorporado seletivamente no DNA celular na fase S do ciclo celular, promove a identificação da síntese de DNA em suspensões celulares. Com isso, podemos avaliar o estado proliferativo na presença de fatores de crescimento, como a IL-3. A menor incorporação de BrdU pelos desnutridos reflete uma menor atividade mitótica, o que pode explicar a diminuição dos blastos evidenciado no mielograma e nos ensaios proliferativos (ROTHAEUSLER & BAUMGARTH, 2006).

#### 4.4 Ensaio de BrDU

A proliferação celular estimulada por IL-3 foi avaliada pelo ensaio de BrDU nos animais controle e desnutridos, mostrando uma incorporação elevada no animal controle em relação ao não estimulado. O estímulo de IL-3 em células oriundas de animais desnutridos demonstrou menor incorporação em relação ao animal control (**Fig. 13**).



**Figura 13.** Avaliação da proliferação celular por BrDU em células tronco hemopoéticas de animais do grupo (C) controle (n=6) e (D) desnutrido (n=6). (+) Estimulo de IL-3. n representa número de animais avaliados. Letras diferentes demonstram que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Teste estatístico de Kruskal-Wallis e *Post test* de Dunns. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

Apesar de animais desnutridos apresentarem uma menor incorporação do BrdU, demonstrando um menor potencial proliferativo, observamos que o estímulo por IL-3 promoveu um aumento dessa incorporação tanto em células oriundas de animais controle quanto de desnutridos. O ciclo celular também é afetado, com os desnutridos permanecendo mais tempo em G0/G1 (quiescência), com diminuição das fases S/G2/M (proliferação), redução das proteínas indutoras do ciclo celular (Ciclina D1, Ciclina E, Cdk2, Cdk4 e Cdc25a) e o aumento das proteínas inibitórias do ciclo celular (p21 e p27) (XAVIER *et al.*, 2007; BORELLI *et al.*, 2009; NAKAJIMA *et al.*, 2014).

Cortez-Barberena e colaboradores mostraram proporções reduzidas de células em S e G2/M em ratos com desnutrição moderada e grave. A incorporação de BrdU foi menor nos dois grupos de ratos desnutridos. Em células de ratos com desnutrição moderada, G1 mostrou-se mais curto, enquanto a fase S aumentou. Neste estudo, a desnutrição grave não afetou significativamente a duração das fases do ciclo celular, embora as frações das células em proliferação tenham sido dramaticamente reduzidas (CORTÉS-BARBERENA *et al.*, 2013).

Em comparação com estudos em humanos, aspirados de medula óssea de crianças com desnutrição proteica apresentaram a maioria dos eritroblastos ultraestruturalmente normais, a distribuição dos eritroblastos policromáticos iniciais entre os vários estágios do ciclo celular era normal ou quase normal, e os macrófagos não continham eritroblastos ingeridos (WICKRAMASINGHE *et al.*, 1988).

Podemos, então, observar que a diminuição da proliferação de células-tronco hemopoéticas em animais desnutridos é decorrente não da deficiência na produção de DNA, mas em alterações no ciclo celular da CTH, resultando na redução dos progenitores hemopoéticos (YIN & LI, 2006; SIGNER *et al.*, 2014).

#### **4.5 Avaliação do estabelecimento do estroma medular: culturas de longa duração**

A matriz extracelular é composta de moléculas como colágeno, proteínas não colágenas (principalmente fibronectina, laminina e trombospondina) e macromoléculas de glicosaminoglicanos e proteoglicanos (ABBOUD & LICHTMAN, 2000; ROZARIO & DESIMONE, 2010). Essas proteínas estão presentes no estroma da medula óssea. A matriz extracelular é essencial para fornecer suporte estrutural, bem como para auxiliar na regulação da proliferação, migração e adesão de células hemopoéticas (BOWERS *et al.*, 2010).

Em um modelo murino de desnutrição protéica, a expressão protéica de fibronectina, laminina e trombospondina aumentou na matriz extracelular de ratos com DP

(VITURI *et al.*, 2000). Camundongos adultos submetidos a uma dieta restrita a calorias apresentaram diminuição da expressão gênica dos tipos de colágeno I, III, IV, V e VI no tecido adiposo branco epididímico. Essas mudanças podem estar envolvidas na redução da expressão gênica de proteínas reguladoras de colágeno, como Hsp47, que também se verificou ser reduzido nestes ratos (HIGAMI *et al.*, 2006).

Em outro estudo de camundongos com idade de 21 dias ou nove meses mantidos com restrição de dieta materna exibiram aumento de elastina e actina-alfa do músculo liso no pulmão. Além disso, a imunolocalização da elastina no alvéolo foi alterada e esta pode estar associada à função pulmonar prejudicada em ratos de retardo do crescimento intra-uterino (REHAN *et al.*, 2012).

O estabelecimento do estroma medular foi avaliado após 7, 14, 21 e 28 dias de cultura. No 7º dia cultivo havia células hemopoéticas mortas e também foram visualizadas frequentes células com aparência fibroblastóide. No 14º dia de cultivo, diminuiu a quantidade de células hemopoéticas e foram visualizadas células com aparência fibroblastóide, sendo possível verificar o aparecimento de áreas de confluência e ainda, foram visualizados também poucos adipócitos *like*. Importante ressaltar que estas células não foram visualizadas no 7º dia de cultivo celular. No 21º dia de cultivo foram visualizadas abundantes células com aparência fibroblastóide, aumento da frequência de adipócitos *like* e aumento das áreas de confluência. No 28º dia de cultivo foram visualizadas abundantes células com aparência fibroblastóide e adipócitos *like* e aumento das áreas de confluência (**Figura 14**).

Os adipócitos *like* não foram encontrados no 7º dia de cultivo, surgindo apenas a partir do 14º dia de cultivo. Essas células aumentam de quantidade e tamanho no 21º dia de cultivo, mas sem diferença entre os grupos. No entanto, ao avaliarmos no 28º dia de cultivo, os adipócitos *like* encontravam-se em maior quantidade no grupo desnutrido (**Figura 14**).

Observamos que o conteúdo lipídico dos adipócitos *like* aumentou ao longo do tempo, de tal maneira que iniciavam como pequenas gotículas e estas aumentavam o seu tamanho e coalesceram; constituindo uma única gotícula que preenchia todo o citoplasma das células (**Figura 14**).

Não foi observada diferença quantitativa nas células com aparência fibroblastóide entre os grupos e dias analisados. Em relação à confluência, as culturas com células oriundas do grupo desnutrido no 28º dia apresentaram menor confluência quando comparadas ao grupo controle (**Figura 14**).

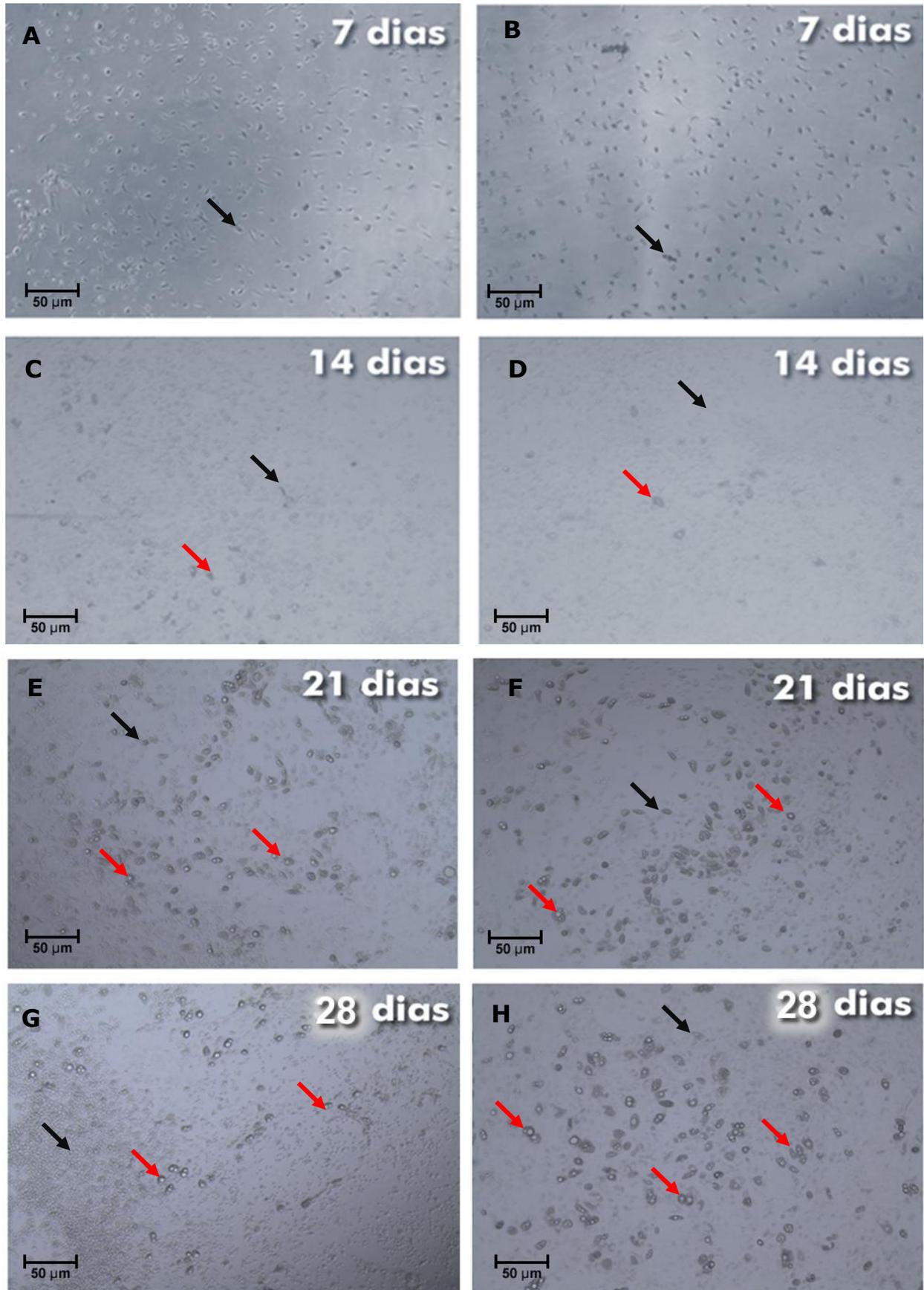
Trabalhos demonstram que o estroma medular estabelecido por meio das culturas de longa duração a partir de células da medula óssea dos animais desnutridos não é capaz de manter a hemopoese devido a um comprometimento estrutural do estroma da medula óssea (XAVIER *et al.*, 2007).

Para que a hemopoese normal ocorra é necessário que a célula-tronco esteja localizada em microambientes específicos que permitem a interação entre essas células e a MEC, sendo que essa localização depende de uma migração efetiva na medula óssea (MORRISON & SCADDEN, 2014). Uma vez que as moléculas da MEC estão envolvidas na regulação da adesão, migração, proliferação e diferenciação de células hemopoéticas (MAYANI *et al.*, 1992; KLEIN, 1995), tais mudanças podem interferir nos processos de crescimento e diferenciação de células hemopoéticas (SANTOS *et al.*, 2017; VITURI *et al.*, 2000).

Podemos observar então que as alterações encontradas *in vitro* reproduzem as encontradas *in vivo* e as possíveis alterações das células estromais, devido à desnutrição proteica, poderiam ainda permanecer mesmo *in vitro*, pois as condições do microambiente hemopoético ainda se mantêm preservadas.

## CONTROLE

## DESNUTRIDO



**Figura 14.** Fotomicrografia do estabelecimento do estroma medular em culturas de longa duração. Objetiva de 10x. Setas vermelhas indicam os adipócitos *like*, setas pretas indicam as células fibroblastóides.

#### 4.5.1 Identificação dos tipos celulares por citometria de fluxo

As células-tronco hemopoéticas de animais controle estão em maior número nos dias 14 e 21 de cultivo. Observamos que as células hemopoéticas, como formas jovens da série eritróide, megacariocítica, granulocítica e linfocítica, são encontradas em maior quantidade no 7º dia de cultura e ao longo do tempo vão diminuindo em quantidade, sendo vista ainda poucas células hemopoéticas aos 28 dias de cultura (**Fig. 15**), resultados estes esperados uma vez que não foram adicionados fatores de crescimento específicos.

Os monócitos/macrófagos são células que permanecem em proporções semelhantes durante todos os tempos analisados, tanto nos animais controle quanto nos desnutridos (**Fig. 15**).

A quantidade de células-tronco mesenquimais e fibroblastos apresenta queda na cultura ao longo dos tempos analisados, porém sem diferenças estatísticas entre os grupos controle e desnutrido (**Fig. 16**).

Os adipócitos não foram detectados de maneira significativa no 7º dia de cultivo. Eles começam a aparecer após este período e já encontramos estas células ocupando cerca de 10% da cultura. Aos 21 dias de cultura esse número cresce para em torno de 20% e, assim como no tempo anterior, não há diferenças significativas entre o grupo controle e o desnutrido. No entanto, ao analisarmos no 28º dia de cultura, observamos que os animais do grupo desnutrido apresentam uma maior quantidade de adipócitos (chegando até a 50% da população) em relação ao grupo controle (**Fig. 16**).

A população de adipócitos-*like* aumenta conforme aumentam os dias em cultura. Sendo que no 28º dia de cultura há maior quantidade de adipócitos-*like* nas culturas de animais desnutridos. O adipócito da medula óssea é um tipo de célula que atualmente tem recebido maior atenção por ser capaz de modular a hemopoese e não ser apenas um tipo de preenchimento de tecido (NAVEIRAS *et al.*, 2009).

Relatos na literatura apontam a importância dos adipócitos estromais na regulação hemopoética e sobre a influência desses adipócitos como reguladores negativos da hemopoese, comprometendo a capacidade de produção de fatores de crescimento tais como o fator de estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) (NAVEIRAS *et al.*, 2009).

O aumento da população de adipócitos, leva ao comprometimento da produção desses fatores de crescimento (GM-CSF e G-CSF) como descrito em nosso trabalho, mostrando que no desnutrido há um aumento mais expressivo dos adipócitos, levando a uma redução na produção dos fatores de crescimento. Outros trabalhos com animais

desnutridos demonstraram a redução da capacidade de macrófagos em produzir GM-CSF (OLIVEIRA *et al.*, 2016) e de células-tronco mesenquimais de produzirem GM-CSF e G-CSF (CUNHA *et al.*, 2013).

Ao realizarmos a marcação para osteoblastos, observamos que praticamente não há osteoblastos aos 7 dias de cultura. Um sensível aumento da celularidade é vista em 14 e 21 dias, porém sem diferença estatística entre os grupos. No 28º dia de cultura os osteoblastos encontram-se em maior quantidade nos animais desnutridos (**Fig. 16**).

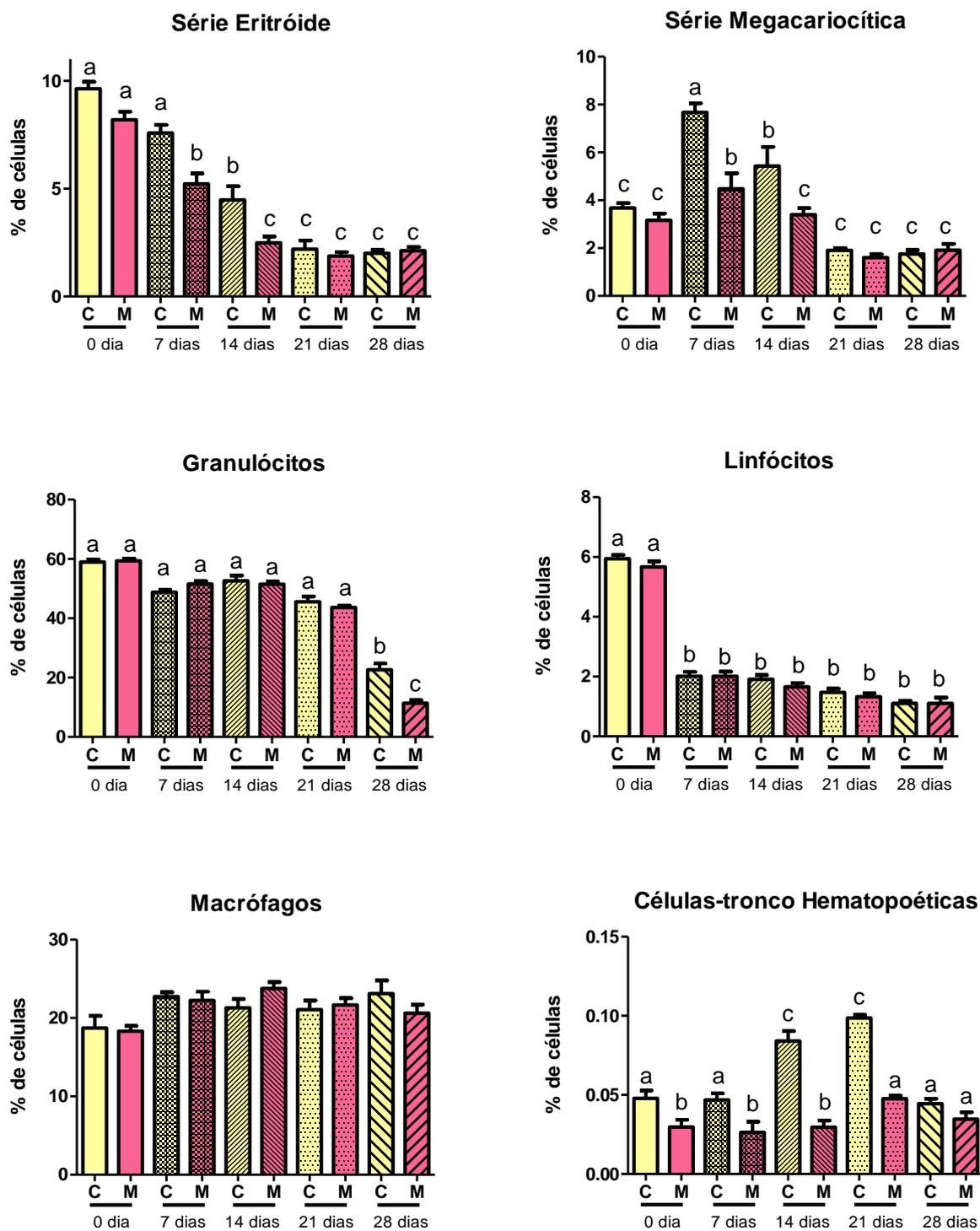
A diferenciação das CTHs ocorre em proximidade direta de osteoblastos dentro da cavidade da medula óssea. Recentemente, foi proposto que os osteoblastos apoiam o crescimento de células hemopoéticas primitivas *in vitro* e *in vivo* (WU *et al.*, 2009).

As alterações encontradas *in vitro* são as mesmas encontradas *in vivo* e as alterações nas células do estroma devido à desnutrição protéica podem ainda permanecer, mesmo *in vitro*. A falha estrutural do microambiente hemopoético em camundongos desnutridos pode afetar as interações entre células e sinalização celular (XAVIER *et al.*, 2007). Com a complexidade do estroma da medula óssea, uma grande variedade de componentes estromais pode ser alterada sob condições de desnutrição protéica.

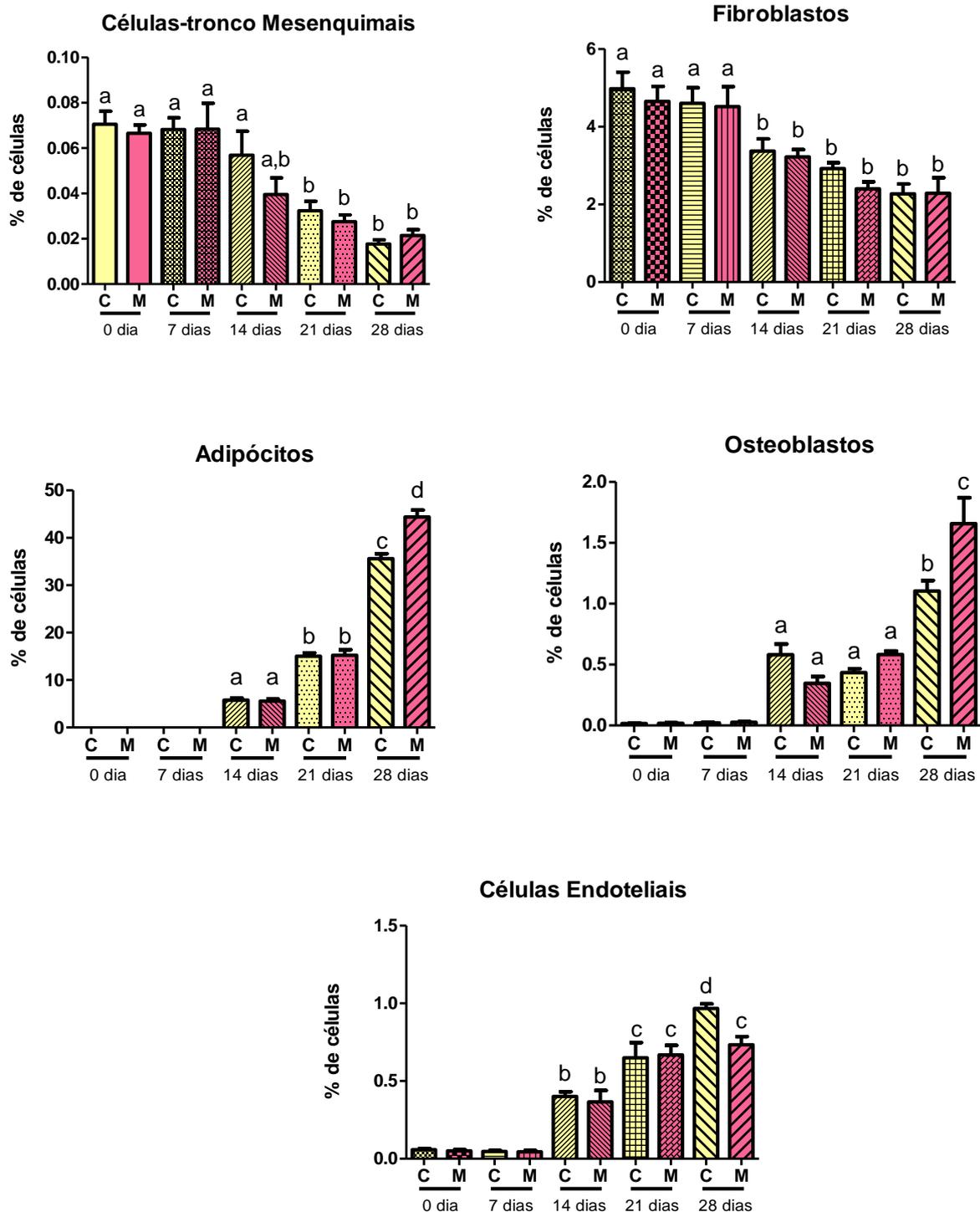
Evidências que apoiam essa hipótese são: a influência dos osteoblastos no desenvolvimento dos osteoclastos; a participação de osteoblastos em CMOLD; a produção de moléculas reguladoras hemopoéticas positivas por osteoblastos; a produção de fatores inibitórios do ciclo celular por osteoblastos e as interações célula-célula entre células hemopoéticas precoces e osteoblastos (NEIVA *et al.*, 2005). A DP promove alterações no tecido ósseo, como nos osteoblastos e osteoclastos. Essas alterações podem influenciar o ciclo da CTH, acarretando em problemas na proliferação e diferenciação hemopoética (TSUJITA, 2016).

As células endoteliais aumentam em número ao longo dos dias de cultura, porém sem diferenças significativas entre os grupos nos tempos 7, 14 e 21 dias. No 28º dia há um aumento da população nos animais controle, porém não no desnutrido (**Fig. 16**).

A estratégia de imunofenotipagem das células da medula óssea é descrita a seguir e imagens representativas são demonstradas nas **Figuras 17-21**. Para isso utilizamos vários marcadores das séries eritróide (TER119<sup>+</sup>), megacariocítica (CD41<sup>+</sup>), granulocítica (Gr-1<sup>+</sup>), série monocítica/macrofágica (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>), linfócitos T (CD3<sup>+</sup>) ou B (B220<sup>+</sup>), adipócitos (Bodipy<sup>+</sup> F4/80<sup>-</sup>), células endoteliais (CD45<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup>CD106<sup>+</sup>), osteoblastos (OPN<sup>+</sup>), célula-tronco hemopoética de longa duração (Lin<sup>-</sup> c-Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> FLK2<sup>-</sup> Thy-1.1<sup>low</sup>) e célula-tronco mesenquimal (CD45<sup>-</sup> CD105<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD44<sup>+</sup>).



**Figura 15.** Populações de origem hemopoética presentes na cultura de células da medula óssea de animais do grupo Controle (n=6) e Desnutrido (n=6) nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias. n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Kruskal-Wallis e Post test de Dunns. Letras diferentes demonstram que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Valores significativos para  $p < 0,05$ .



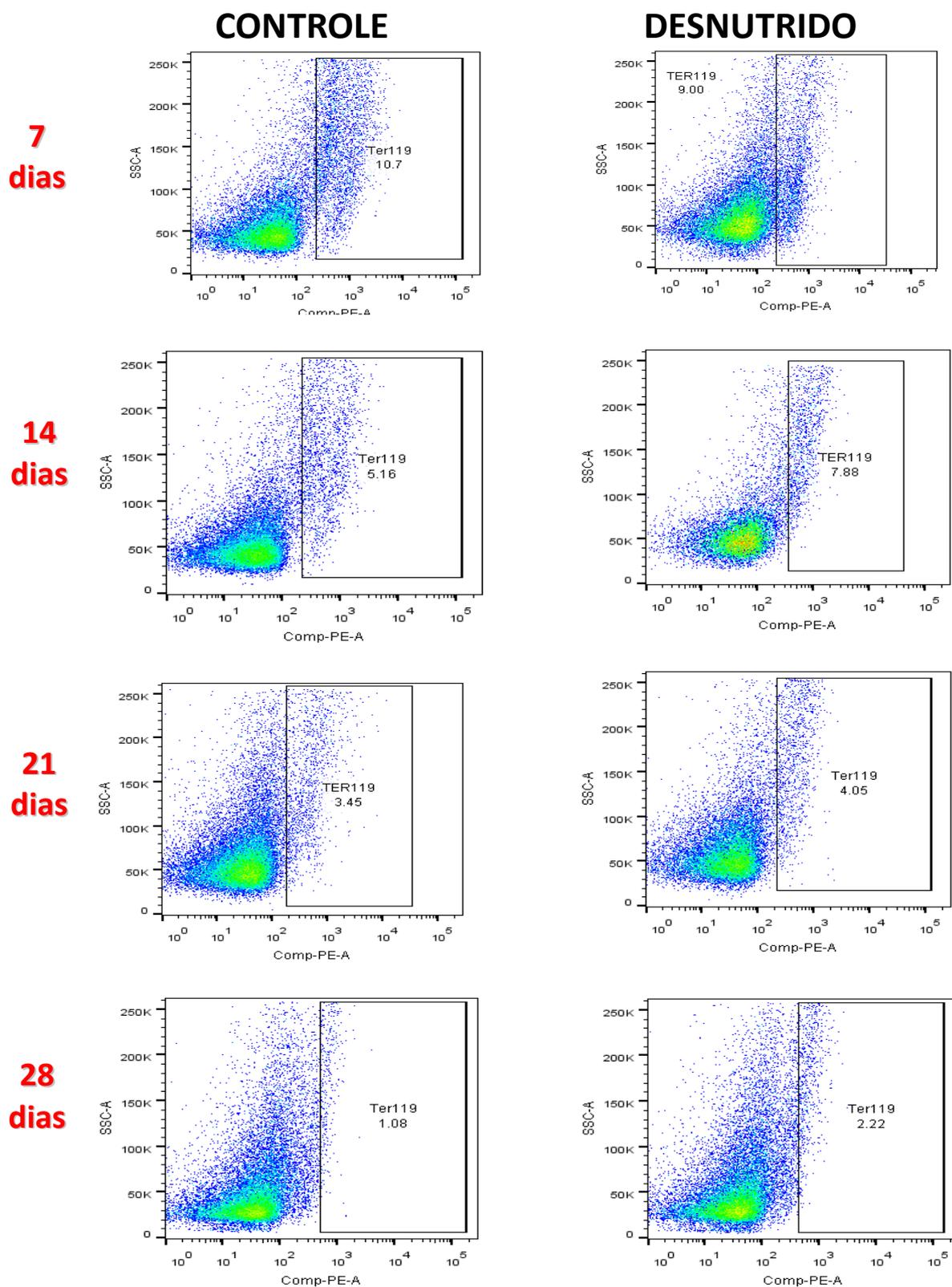
**Figura 16.** Populações de origem mesenquimal presentes na cultura de células da medula óssea de animais do grupo Controle (n=6) e Desnutrido (n=6) nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias. n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Kruskal-Wallis e Post test de Dunns. Letras diferentes demonstram que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

As células-tronco mesenquimais são precursores multipotentes na medula óssea, dando origem a células que constituem o estroma medular, como adipócitos e

osteoblastos. Elas são intimamente relacionadas com a formação do microambiente da medula óssea, além disso, é relatado na literatura que os adipócitos derivados da medula óssea reduzem a expansão de células hemopoéticas num sistema de co-cultura, indicando que os adipócitos podem atuar regulando negativamente o microambiente hemopoético (NAVEIRAS *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2013).

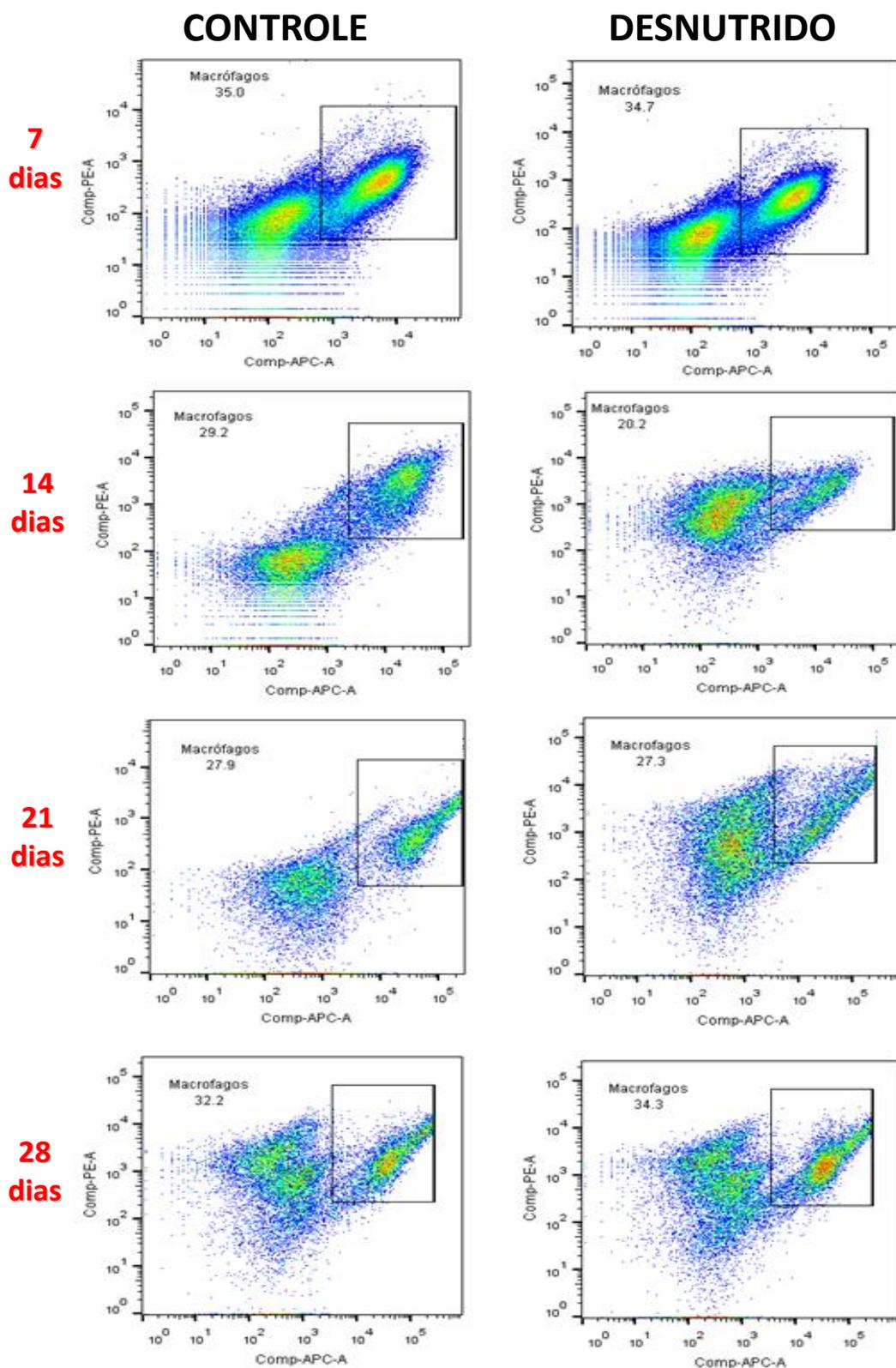
As alterações encontradas nos animais desnutridos, como diminuição das células-tronco mesenquimais (CTM) com aumento de adipócitos e osteoblastos, nos permitiram concluir que a desnutrição tenha acometido a diferenciação da CTM. Trabalhos anteriores demonstraram que a CTM de camundongos desnutridos apresenta diminuição da produção de G-CSF e GM-CSF, contribuindo para um microambiente hemopoético prejudicado, induzindo a falência da medula óssea comumente observada em estados de desnutrição proteica (CUNHA *et al.*, 2013).

# SÉRIE ERITROCÍTICA



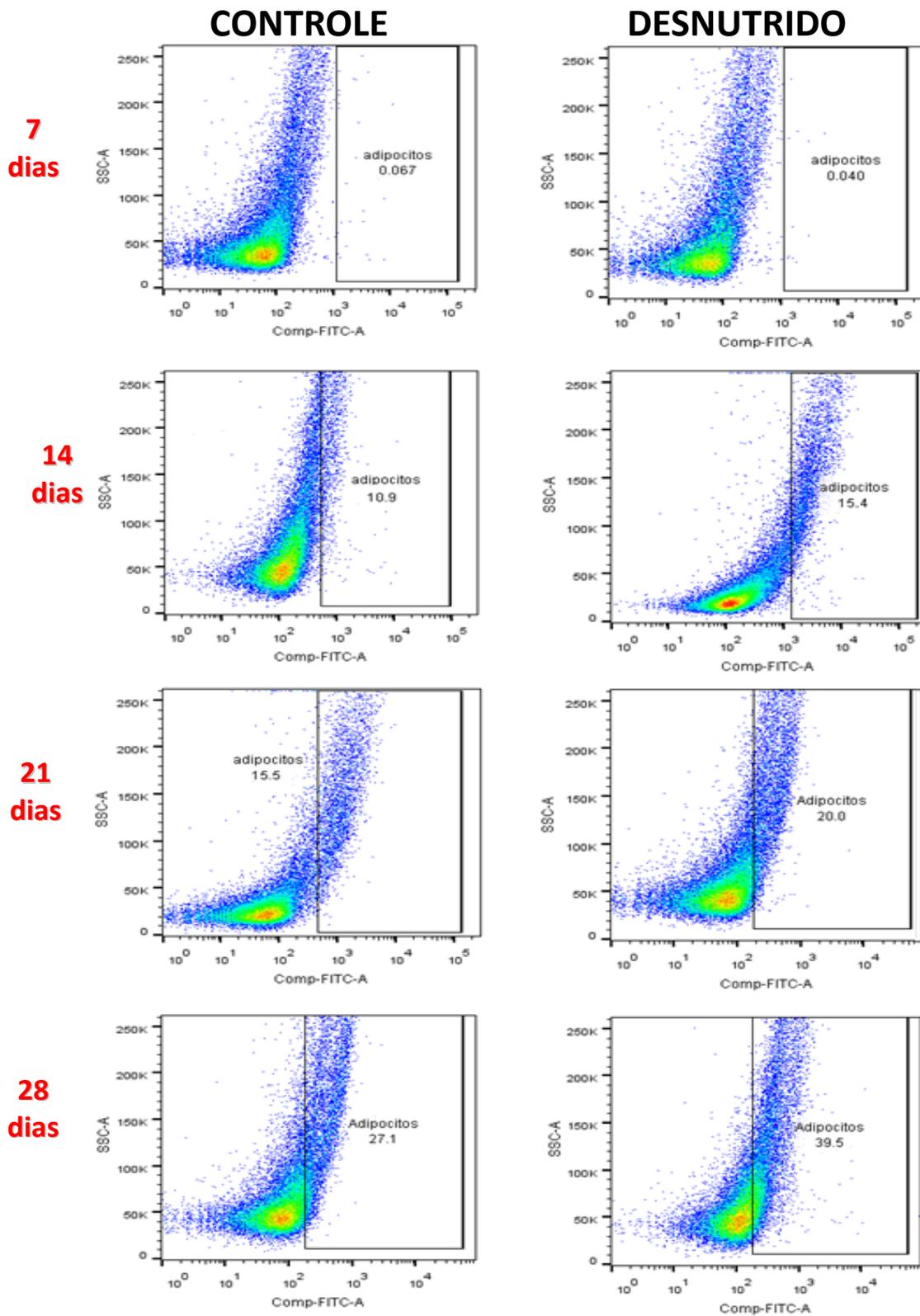
**Figura 17.** Figura representativa das aquisições por citometria de fluxo representativa dos grupos Controle e Desnutrido, nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias, demonstrando a proporção de células da série eritrocítica da cultura de estroma da medula óssea marcado por Ter119 (PE).

# MACRÓFAGOS



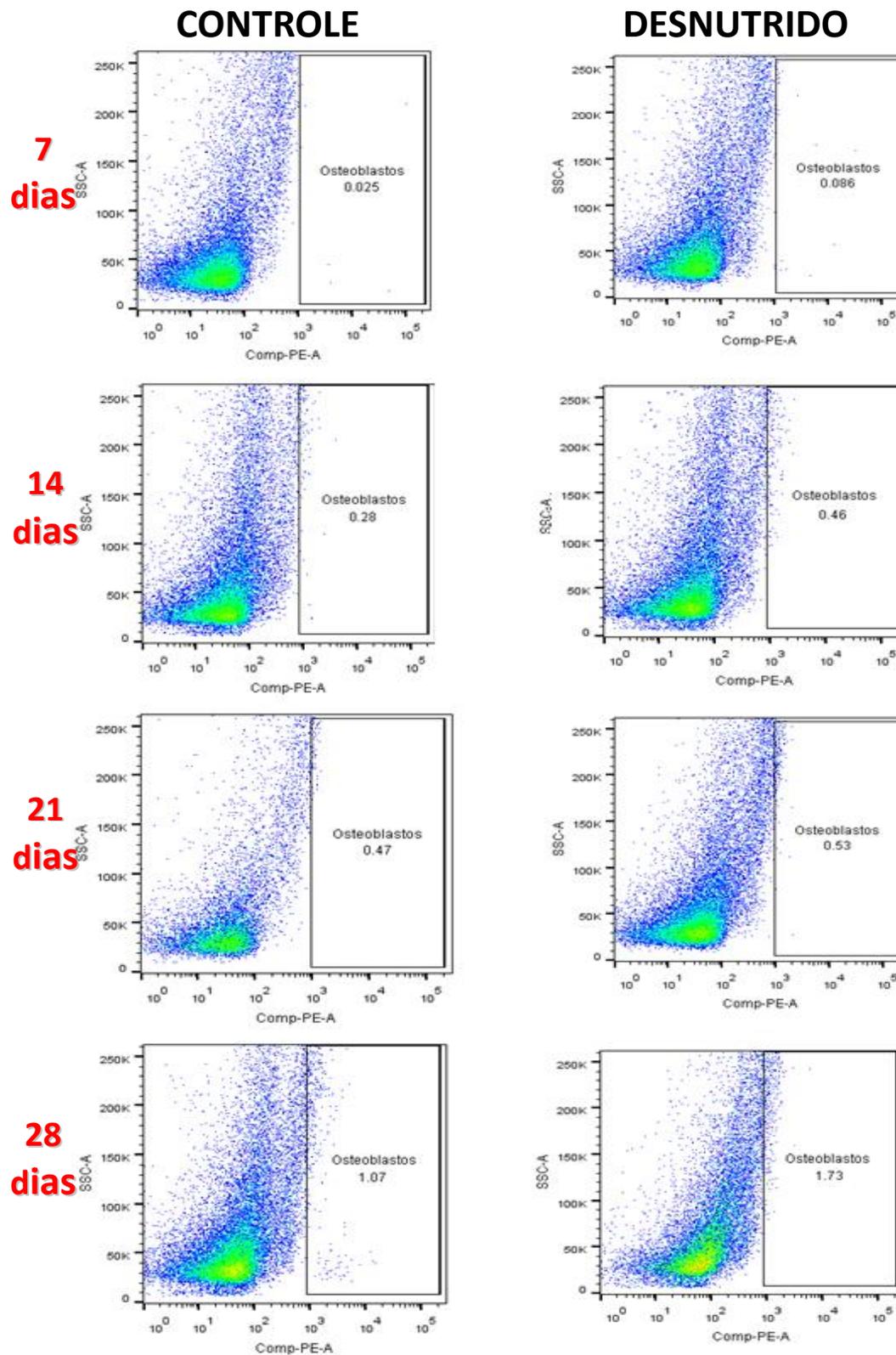
**Figura 18.** Figura representativa das aquisições por citometria de fluxo representativa dos grupos Controle e Desnutrido, nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias, demonstrando a proporção de células da série macrofágica da cultura de estroma da medula óssea marcadas por F4/80 (APC) e CD11b (PE).

# ADIPÓCITOS



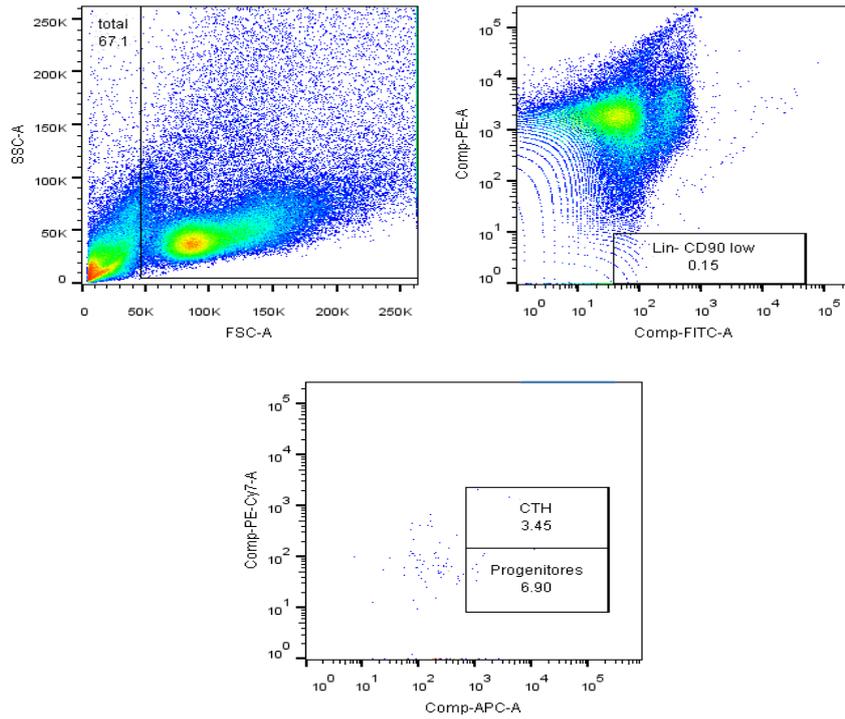
**Figura 19.** Figura representativa das aquisições por citometria de fluxo representativa dos grupos Controle e Desnutrido, nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias, demonstrando a proporção de adipócitos na cultura de estroma da medula óssea marcados por Bodipy (FITC).

# OSTEOBLASTOS

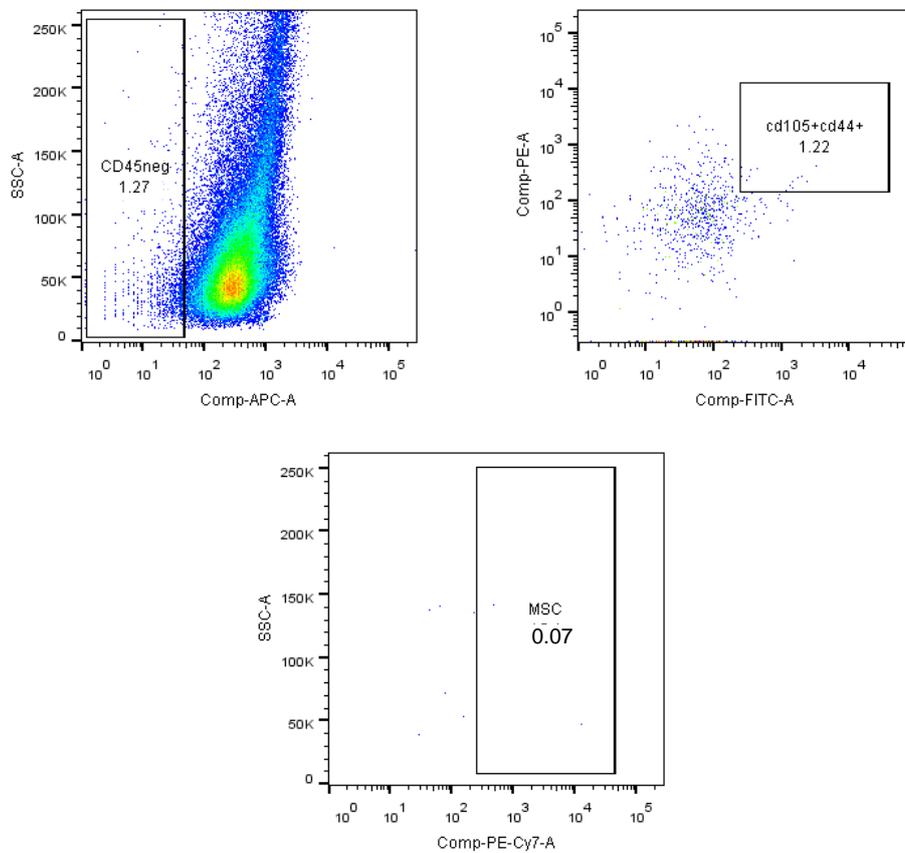


**Figura 20.** Figura representativa das aquisições por citometria de fluxo representativa dos grupos Controle e Desnutrido, nos tempos de 7, 14, 21 e 28 dias, demonstrando a proporção de osteoblastos na cultura de estroma da medula óssea marcados por OPN (PE).

## CÉLULA-TRONCO HEMOPOÉTICA



## CÉLULA-TRONCO MESENQUIMAL



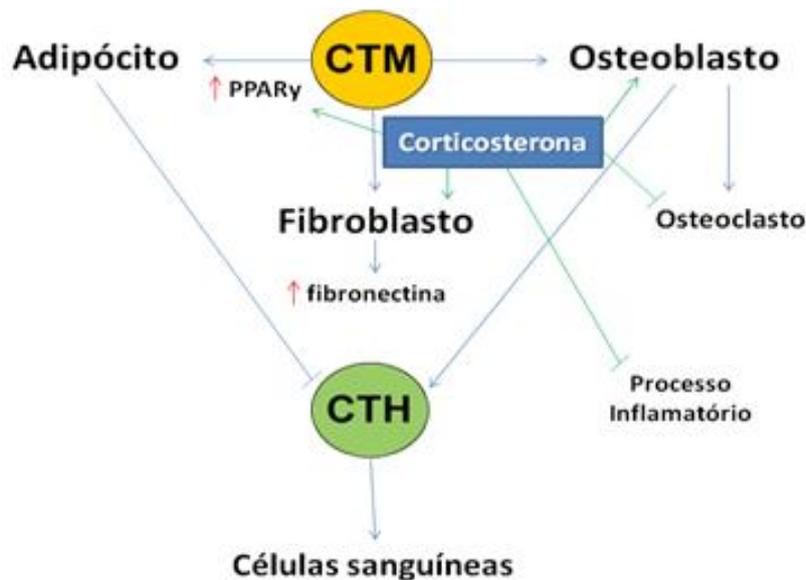
**Figura 21.** Figura representativa das aquisições por citometria de fluxo demonstrando a estratégia de marcação de células-tronco hemopoética e mesenquimal na cultura de estroma da medula óssea.

Trabalhos com camundongos constataram que corticoides agem diretamente sobre os osteoblastos e os osteoclastos, provocando a autodestruição dos osteoblastos e inibindo o poder de destruição dos osteoclastos, o que faz com que o processo de renovação do osso seja interrompido (KIM *et al.*, 2006).

Os corticóides inibem a formação de novas estruturas ósseas, por redução da síntese de colágeno tipo I (componente fundamental da matriz óssea), redução da velocidade de diferenciação de células-osteoprogenitoras em osteoblastos ativos, diminuição da absorção de  $\text{Ca}^{2+}$  pelo trato gastrointestinal (por antagonismo à vitamina D3) e por aumento da velocidade de reabsorção óssea por osteoclastos (BUENO & GOUVÊA, 2011).

O estresse fisiológico induzido pela DP está associado ao aumento da concentração sérica de corticosterona, a qual promove diminuição da massa magra e, conseqüentemente, da capacidade de manutenção dos níveis de glutamina (CRISMA, 2010). O aumento da corticosterona leva a elevação dos níveis de PPAR $\gamma$ , estimulando a diferenciação das CTMs em adipócitos, células que modulam negativamente a hemopoese, reduzindo a quantidade de leucócitos e eritrócitos (**Fig. 22**). Além disso, o processo inflamatório é prejudicado, não apenas pela diminuição de leucócitos, mas pela diminuição da glutamina, que diminui a capacidade funcional de neutrófilos, macrófagos e linfócitos uma vez que esse aminoácido é considerado indispensável para leucócitos. Outro fator importante é a inibição da expressão de moléculas de adesão de leucócitos e diminuição da permeabilidade vascular, comprometendo a transmigração leucocitária para o tecido (BARJA-FIDALGO *et al.*, 2003; ROGERO *et al.*, 2006).

A corticosterona também leva a um aumento da produção de fibronectina, principalmente pelos fibroblastos, e que são responsáveis por não só preencherem os espaços extracelulares mas por controlarem a adesão, migração e proliferação de diferentes células por meio de proteínas de superfície de membrana como as integrinas e as selectinas (TAICHMAN, 2005), além de influenciar as interações célula-célula e célula-matriz, o que sugere que eles têm um papel importante no controle da hemopoese (KOLSET & GALLAGHER, 1990).



**Figura 22.** Via de diferenciação da célula-tronco mesenquimal (CTM) e célula-tronco hemopoética, alterada em casos de desnutrição protéica, com o aumento da produção de corticosterona. Figura gentilmente cedida por Primavera Borelli, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP.

Embora os corticóides desempenhem um papel central na tentativa de adaptação à perda de peso (WOODWARD *et al.*, 2004), o aumento de glicocorticóides no sangue em decorrência do estado de inanição promove alterações metabólicas deletérias (MONK *et al.*, 2006), contribuindo para aumentar o estado catabólico do indivíduo.

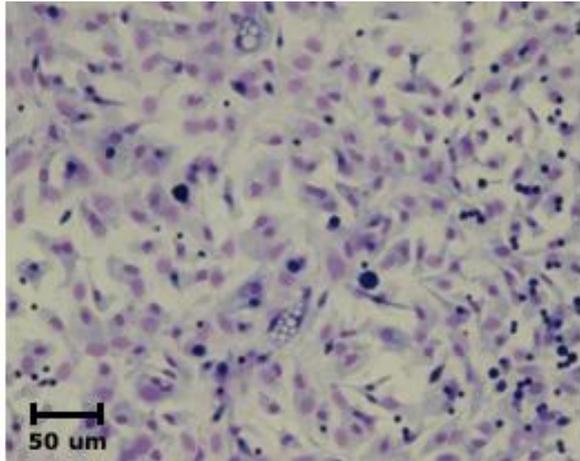
Diversos estudos relatam aumento de corticóides em resposta à redução da quantidade de proteína e energia da dieta (HAMMARQVIST *et al.*, 2005; LING *et al.*, 2009). Esse aumento seria uma resposta do organismo a uma situação de estresse fisiológico e estaria relacionado ao aumento do hormônio do crescimento (GH) e à redução de insulina e leptina no sangue, compondo o quadro hormonal característico da desnutrição (MONK *et al.*, 2006).

#### 4.5.2 Identificação de células medulares em cultura de longa duração

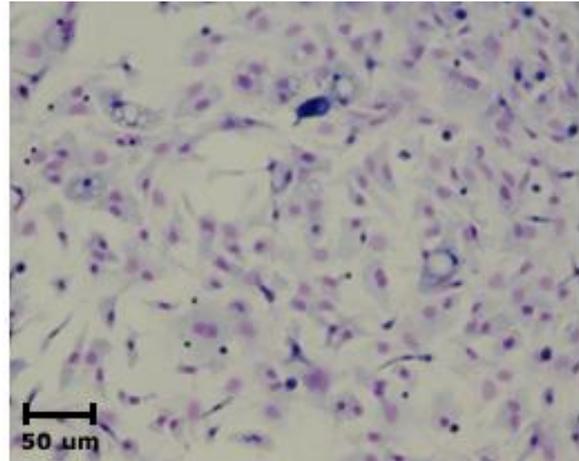
No 28º dia de CMOLD as lamínulas foram coradas pelos seguintes métodos:

1. Corante May-Grunwald-Giemsa, mod. Rosenfeld e após secagem foi realizada microscopia para identificação de células nucleadas (**Fig. 23**);
2. Imunocitoquímica (ICQ) para verificação de granulócitos, linfócitos, eritrócitos e megacariócitos (**Fig. 24-25**), observando em microscópio óptico.

**Controle**



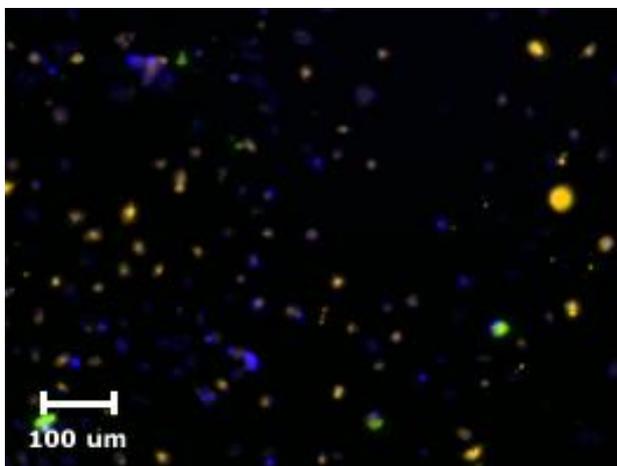
**Desnutrido**



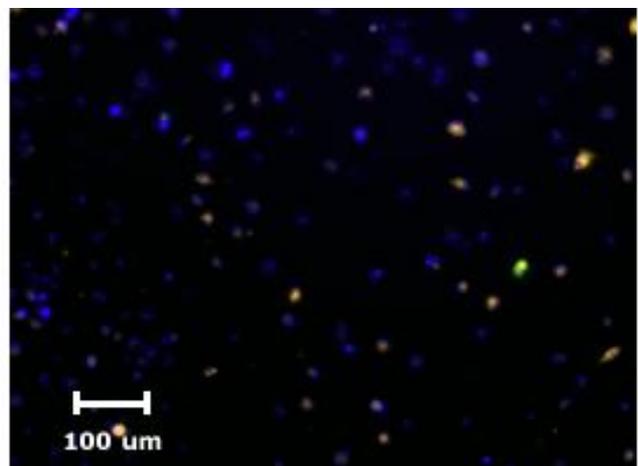
**Figura 23.** Fotomicrografia de células estromais de cultura de longa duração de células da medula óssea oriundas de animais controles e desnutridos. Coloração por May-Grunwald-Giemsa, modificado por Rosenfeld. Aumento de 40x em microscópio óptico.

Ao realizar a IHQ das culturas, fizemos marcações para granulócitos e megacariócitos. Pudemos observar que os desnutridos apresentavam menor quantidade de granulócitos (marrom) e megacariócitos (verde) no 28<sup>o</sup> dia de cultura (**Fig. 25**).

**Controle**

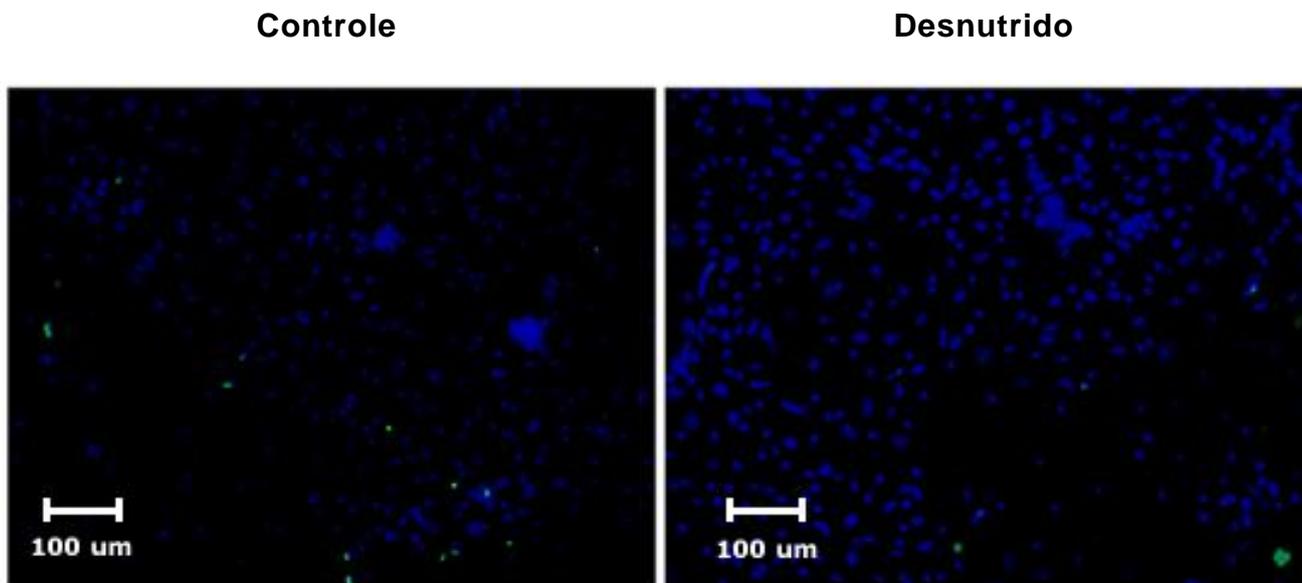


**Desnutrido**



**Figura 24.** Fotomicrografia de células estromais de cultura de longa duração de células da medula óssea. Oriundas de animais controles e desnutridos. Colorações imunocitoquímica para megacariócitos (CD41<sup>+</sup>FITC corado em verde), granulócitos (Gr1<sup>+</sup>PE corado em marrom) e DAPI (APC corado em azul). Aumento de 40x em microscópio de fluorescência.

A marcação para eritrócitos (verde) também demonstrou diminuição nos animais desnutridos no 28<sup>o</sup> dia de cultura (**Fig. 25**).



**Figura 25.** Fotomicrografia de células estromais de cultura de longa duração de células da medula óssea. Oriundas de animais controles e desnutridos. Colorações imunocitoquímica para eritrócitos (TER119+FITC corados em verde) e DAPI (APC corado em azul). Aumento de 40x em microscópio de fluorescência.

#### 4.5.3 Identificação de adipócitos por oil red

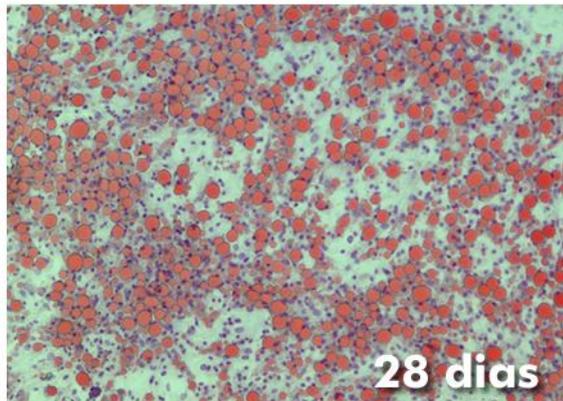
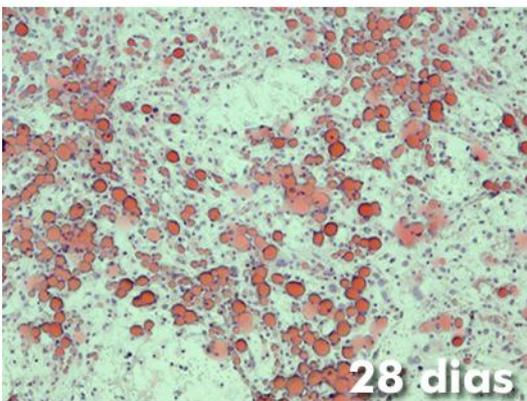
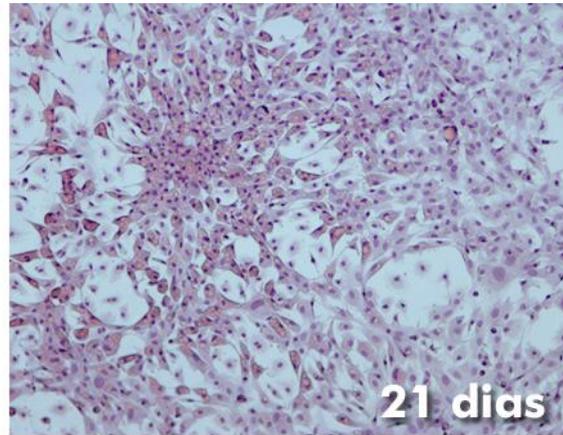
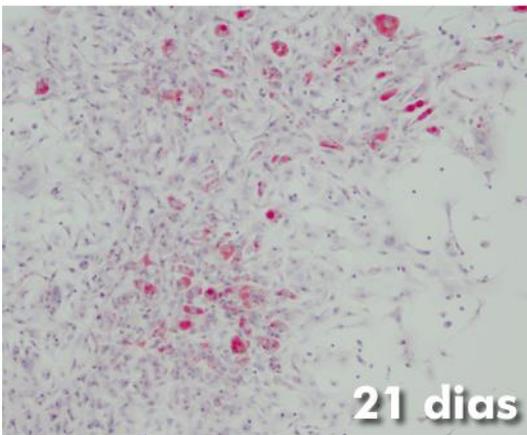
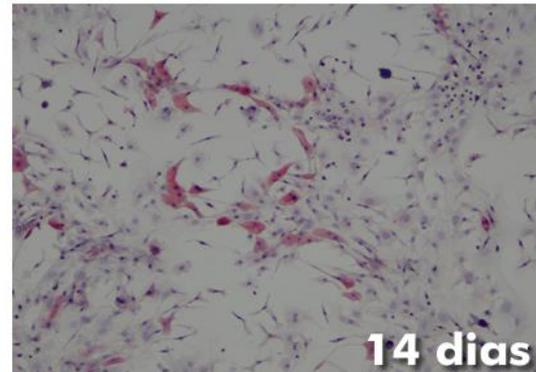
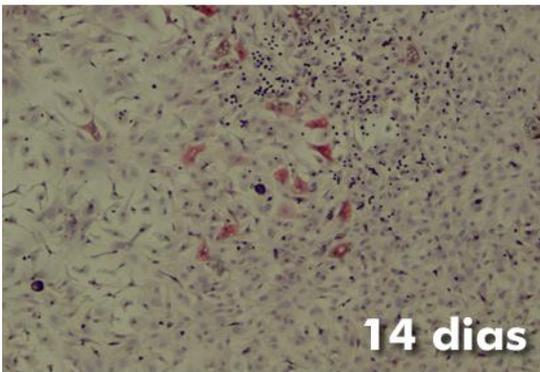
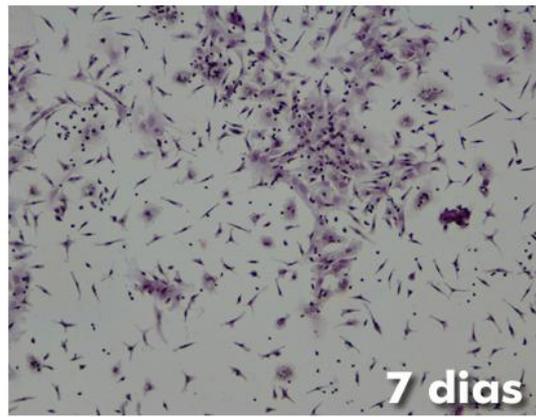
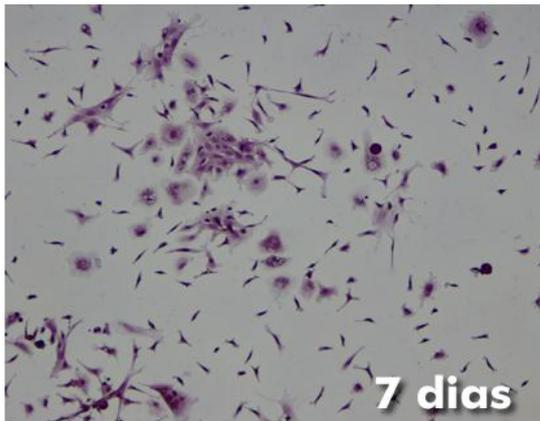
Fizemos a coloração para identificação de adipócitos e, como já descrito na cultura em placa, os adipócitos não apareceram no 7<sup>o</sup> dia de cultura, sendo identificados em pequena quantidade no 14<sup>o</sup> dia, no entanto, sem diferença significativa entre os grupos controle e desnutrido. No 21<sup>o</sup> dia de cultura, verificamos que há uma maior quantidade de adipócitos e que estes passam a ser mais abundantes no grupo desnutrido. No 28<sup>o</sup> dia de cultura essa tendência se confirma com uma maior quantidade de adipócitos no animal desnutrido (**Fig. 26**).

#### 4.5.4 Identificação de osteoblastos por vermelho de alizarina

A identificação de osteoblastos foi realizada pela coloração de vermelho de alizarina, onde não identificamos presença no 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias de cultura, sendo possível identificar apenas no 21<sup>o</sup> dia de cultura poucas células, que aumentam seu número no 28<sup>o</sup> dia. Apenas no 28<sup>o</sup> dia de cultura é possível identificar diferenças significativas entre o animal desnutrido e controle, com uma maior produção de osteoblastos pelo animal desnutrido (**Fig. 27**).

**Controle**

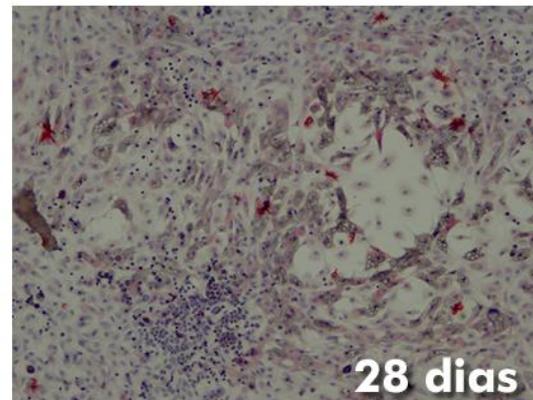
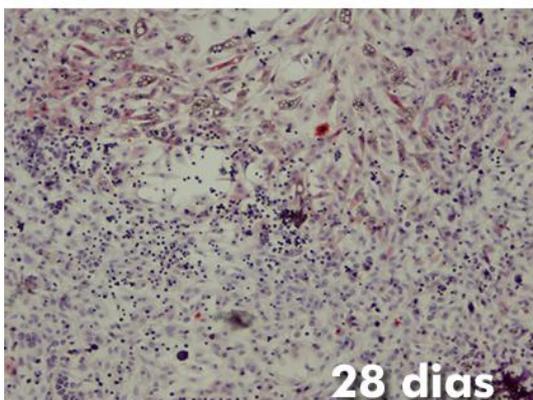
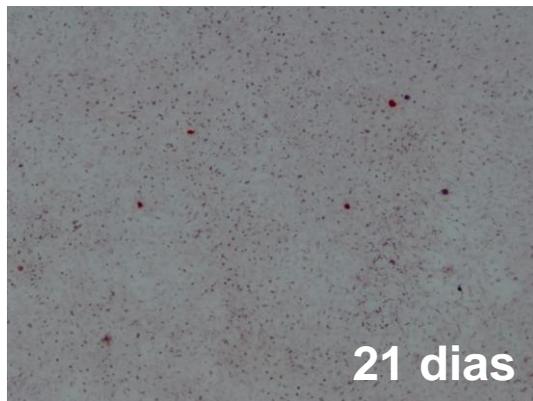
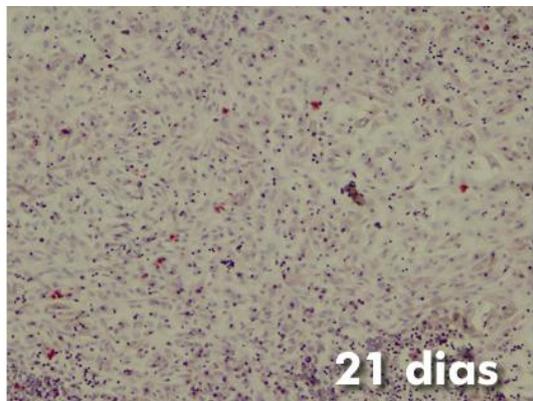
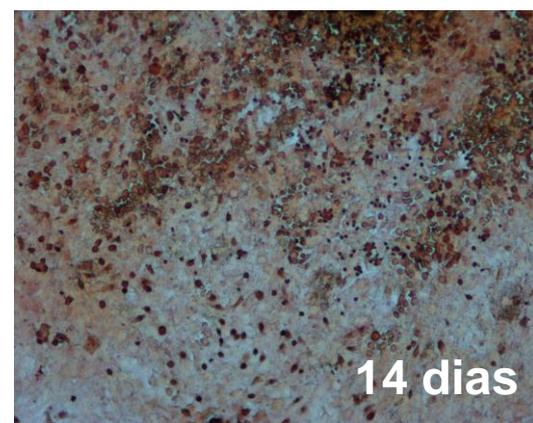
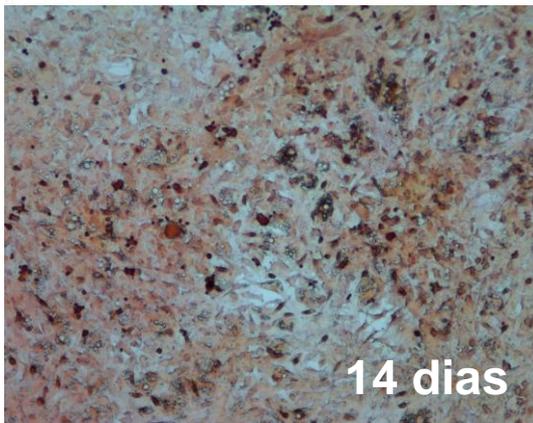
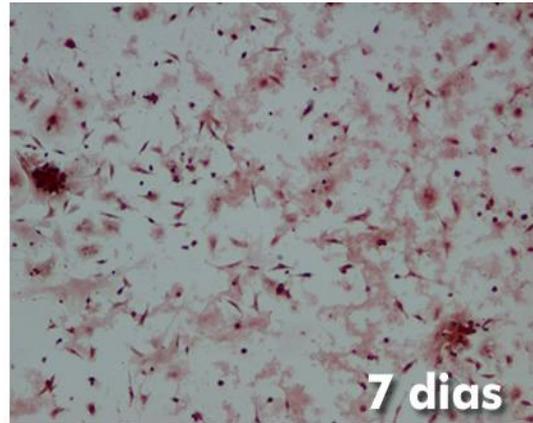
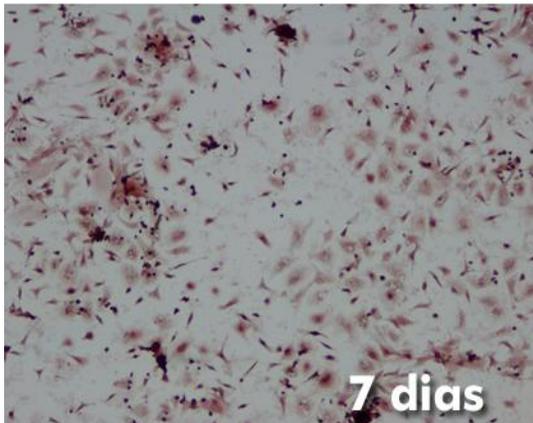
**Desnutrido**



**Figura 26.** Fotomicrografia de células estromais de cultura de longa duração de células da medula óssea. Oriundas de animais controles e desnutridos. Coloração por *oil red* onde podemos identificar adipócitos corados em vermelho. Aumento de 40x em microscópio óptico.

**Controle**

**Desnutrido**



**Figura 27.** Fotomicrografia de células estromais de cultura de longa duração de células da medula óssea oriundas de animais controles e desnutridos. Coloração por vermelho de alizarina onde podemos identificar osteoblastos corados em marrom. Aumento de 40x em microscópio óptico.

#### 4.6 Medidas de ondas de cálcio intracelular

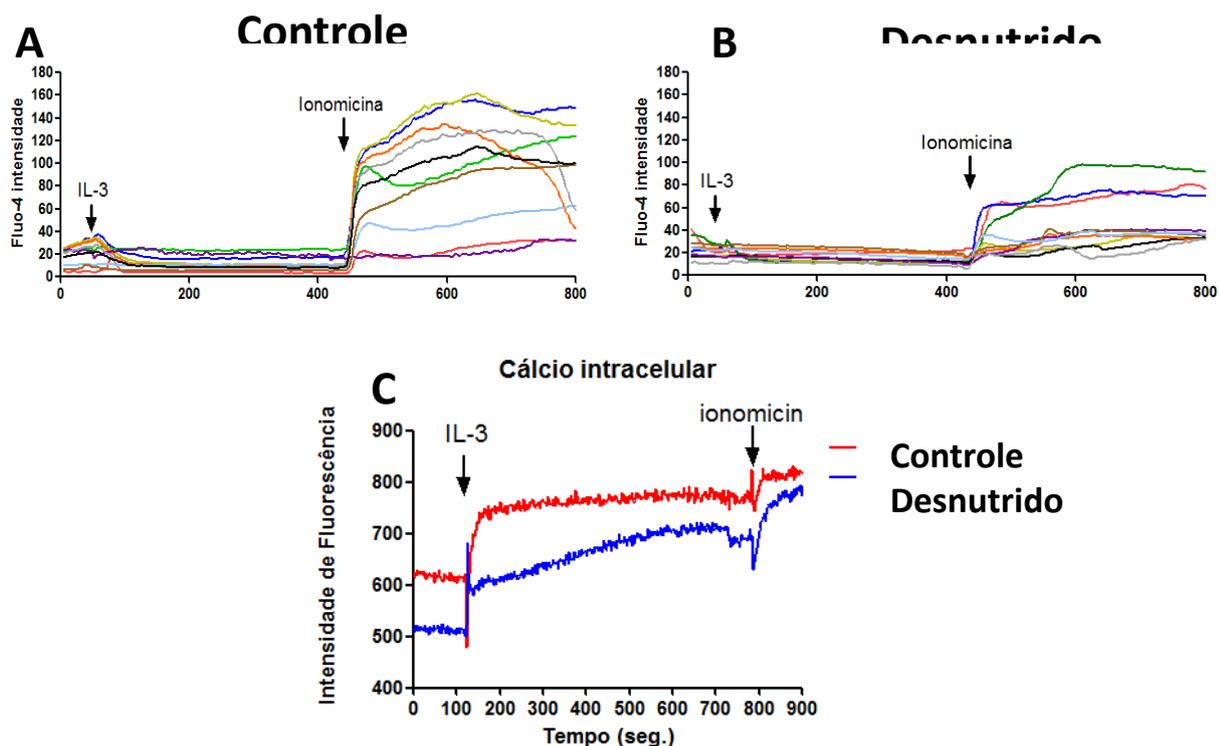
O  $\text{Ca}^{2+}$  é fundamental para a proliferação de células eucarióticas. Várias proteínas são moduladas direta ou indiretamente pela ação do cálcio, como quinases, fosfatases e fatores de transcrição (BOOTMAN *et al.*, 2012). O cálcio atua como um segundo mensageiro por causa de sua alta concentração no meio extracelular e organelos, e em baixa concentração no ambiente intracelular. Podem ser respostas de curta duração, como secreção de citocinas, motilidade muscular ou contração, mas também transcrição de genes de longa duração, divisão e morte celular (BERRIDGE *et al.*, 2003).

As células utilizam vários mecanismos para controlar os níveis citoplasmáticos de cálcio (DUPONT *et al.*, 2011). Adams e colaboradores mostraram redução da celularidade e do número de CTH em camundongos cujas células-tronco eram deficientes em receptores de cálcio (CaR). O receptor de cálcio favorece a adesão com consequente permanência das CTHs em estado quiescente no endóstio (ADAMS *et al.*, 2006).

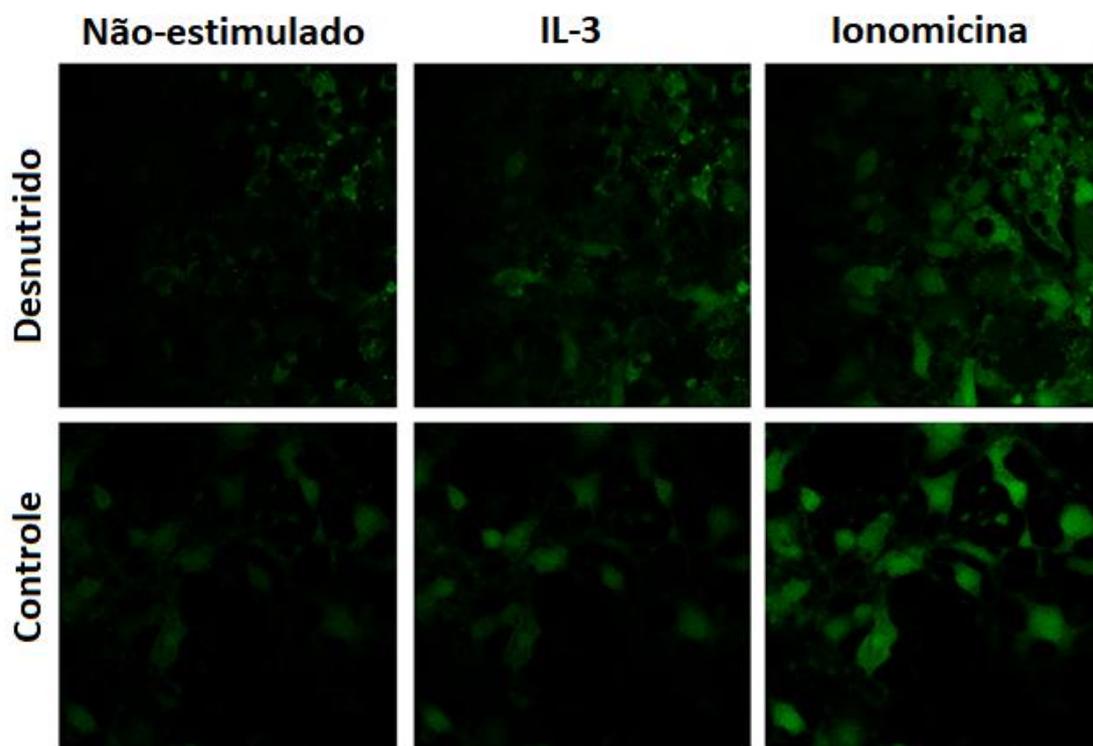
Realizamos a avaliação das ondas de cálcio em células de cultura de medula óssea de longa duração (CMOLD) e células-tronco hemopoéticas (LSK). As células foram fotografadas a cada 8 segundos durante 10 minutos. As células foram estimuladas com IL-3 após 3 minutos e com ionomicina com 6 minutos de exposição com o objetivo de observar eventuais alterações na concentração de cálcio intracelular.

Observamos que a maioria das células da medula óssea dos animais controle não responderam significativamente ao estímulo por IL-3, sendo que algumas células dos animais desnutridos responderam com maior intensidade, no entanto, decaindo de maneira rápida. A resposta ao estímulo de ionomicina foi bem mais pronunciada e prolongada, mas algumas células mostraram-se não responsivas ao estímulo em ambos os grupos (**Fig. 28 e 29**).

Ao avaliar as ondas de cálcio em células-tronco hemopoéticas, foi observado que o estímulo de IL-3 promove um efeito antagônico, promovendo uma queda nas células de animais controle e um aumento em células de desnutridos. O estímulo de ionomicina gerou um efeito contrário, com a elevação nos animais controle e queda no desnutrido (**Fig. 28**).



**Figura 28.** Ondas de cálcio em células de medula óssea estimuladas por IL-3 e ionomicina. A e B representam ondas de cálcio em células estromais; C representa ondas de cálcio em células-tronco hemopoéticas.



**Figura 29.** Fotomicrografia de células da medula óssea, demonstrando fluorescência ao serem estimuladas com IL-3 e ionomicina em microscópio confocal.

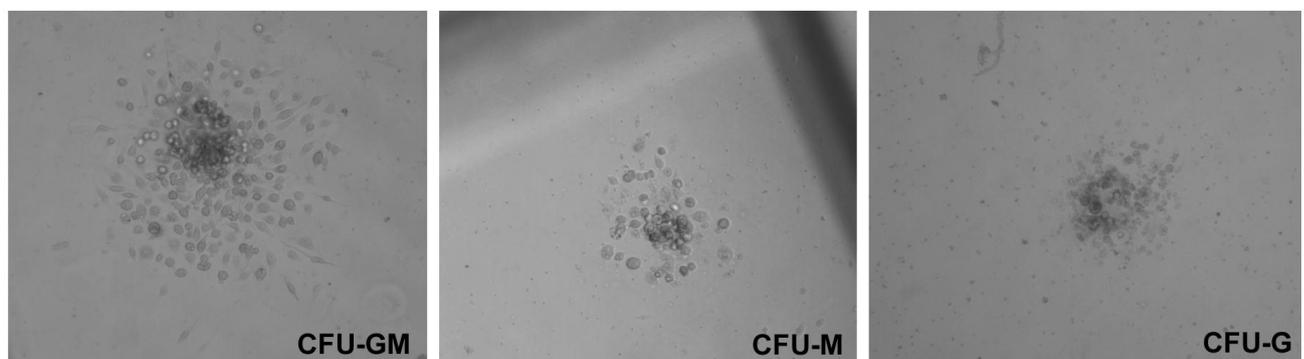
A IL-3 é uma citocina que favorece a proliferação e diferenciação de várias linhagens celulares como os eritrócitos, megacariócitos, granulócitos e macrófagos. Ela é sintetizada principalmente por células T ativadas por antígenos e mitógenos, mas células NK e células endoteliais também podem sintetizá-la. A produção desta citocina pode ser inibida por substâncias inativadoras de linfócitos. A IL-3 habitualmente associa-se à matriz extracelular, formando complexos com heparina/sulfato, mas ainda assim exerce ação parácrina. Macrófagos, mastócitos, eosinófilos, basófilos e células progenitoras da medula óssea produzem e expressam receptores para esta citocina (IHLE, 1992).

Com o objetivo de avaliar melhor a ação da IL-3 em processos celulares na célula-tronco hemopoética, foram realizados ensaios de proliferação e diferenciação, identificando as diferenças entre animais controle desnutridos, estimulados ou não por IL-3.

A diferenciação celular foi avaliada em dois experimentos distintos. O primeiro (**Fig. 30**) avaliou a produção de Unidades Formadoras de Colônias após sete dias de cultura. Observamos que o total de colônias de origem mielóide estava reduzido em culturas de animais desnutridos. Essa diminuição da diferenciação pode estar relacionada com a redução de fatores de crescimento, como CSF-GM (OLIVEIRA *et al.*, 2016). As colônias mielóides (CFU-GM, CFU-G e CFU-M) de animais desnutridos não responderam ao estímulo de IL-3, ao passo que, as colônias de animais controle responderam ao estímulo. Para compreender essa resposta, é preciso compreender a via de ativação por IL-3, que será descrita mais a frente.

#### 4.7 Ensaio de unidades formadoras de colônias mielóides

Ensaio de unidades de formação de colônias (CFU) realizado em meio de metilcelulose utilizando  $2 \times 10^4$  células (**Fig. 30**). As colônias (aglomerados de mais de 50 células) e *clusters* (aglomerados de 2 a 49 células) foram contadas em microscópio invertido TS-100 após sete dias de cultura, utilizando uma lente objetiva 40 seca (abertura numérica: 0,10) (**Tabela 11**).



**Figura 30.** Imagens representativas de tipos de colônias de proliferação hemopoética. Imagens representativas de cada tipo de colônia, adquiridas usando uma câmera digital conectada a microscópio invertido. Aumento de 100x em microscópio óptico.

**Tabela 11.** Número absoluto do total de colônias e *clusters* contados em metilcelulose.

Tipo	Controle	Desnutrido	CTR + IL-3	DESN + IL-3
<b>Clusters</b>	75 ± 18	70 ± 15	95 ± 11 <sup>b</sup>	72 ± 9
<b>Colônias</b>	58 ± 7	38 ± 13 <sup>a</sup>	72 ± 8 <sup>b</sup>	39 ± 11
<b>CFU-GM</b>	29 ± 3	18 ± 2 <sup>a</sup>	38 ± 4 <sup>b</sup>	21 ± 4
<b>CFU-G</b>	6 ± 2	5 ± 3	9 ± 3 <sup>b</sup>	6 ± 2
<b>CFU-M</b>	13 ± 2	9 ± 1 <sup>a</sup>	18 ± 3 <sup>b</sup>	9 ± 2
<b>CFU-GEMM</b>	1 ± 1	0	2 ± 1	1 ± 1

Os dados são expressos como a média ± SEM de 6 experimentos independentes de ensaios de cultura em metilcelulose. Abreviações: CTR (controle); DESN (desnutrido); CFU (unidade de formação de colônias); GM (granulócito-macrófago); G (granulócito); M (monócito/macrófago); GEMM (granulócitos, eritrócitos, macrófagos, megacariócitos); \*P<0,05. n = 6. <sup>a</sup>Valores significativos para p<0,05 do grupo Desnutrido em relação Controle. <sup>b</sup>Valores significativos para p<0,05 do Grupo estimulado (IL-3) em relação ao não estimulado.

Outro experimento avaliou a diferenciação numa cultura de curta duração (24h), onde observamos que as populações de progenitores mielóides, como CMP e GMP apresentaram valores semelhantes em colônias de animais controle e desnutridos. Ao serem estimuladas por IL-3, células de ambos os grupos responderam ao estímulo, promovendo aumento da porcentagem celular, o que mostra que os efeitos inibitórios ao estímulo por IL-3 ocorrem em longo prazo. Esse dado é corroborado pelos níveis de granulócitos e macrófagos, que apresentaram valores semelhantes entre controles e desnutridos, no entanto, ao serem estimulados por IL-3 tiveram os valores aumentados.

A diferenciação mielóide é um processo complexo em que os granulócitos maduros ou de monócitos/macrófagos são derivados a partir de um progenitor mielóide comum através da ação coordenada de citocinas hemopoéticas (KANJI *et al.*, 2011). Ao longo dos dias de cultura, torna-se evidente a diminuição da produção de fatores de crescimento como CSF-GM, CSF-G e CSF-M em animais desnutridos. Além disso, alterações no ciclo celular da CTH também podem influenciar na diferenciação em células maduras. Os linfócitos não tiveram o mesmo resultado, não respondendo ao estímulo. Esse resultado pode ser explicado por IL-3 não estimular a diferenciação da linhagem linfóide.

A diferenciação mielóide é regulada por uma interação complexa de múltiplas citocinas. Tem sido relatado que, após o acoplamento de uma citocina ao seu receptor, um número de proteínas de transdução de sinal intracelular tornar-se ativadas, incluindo as quinases cálcio-dependentes (KRUTZIK *et al.*, 2005).

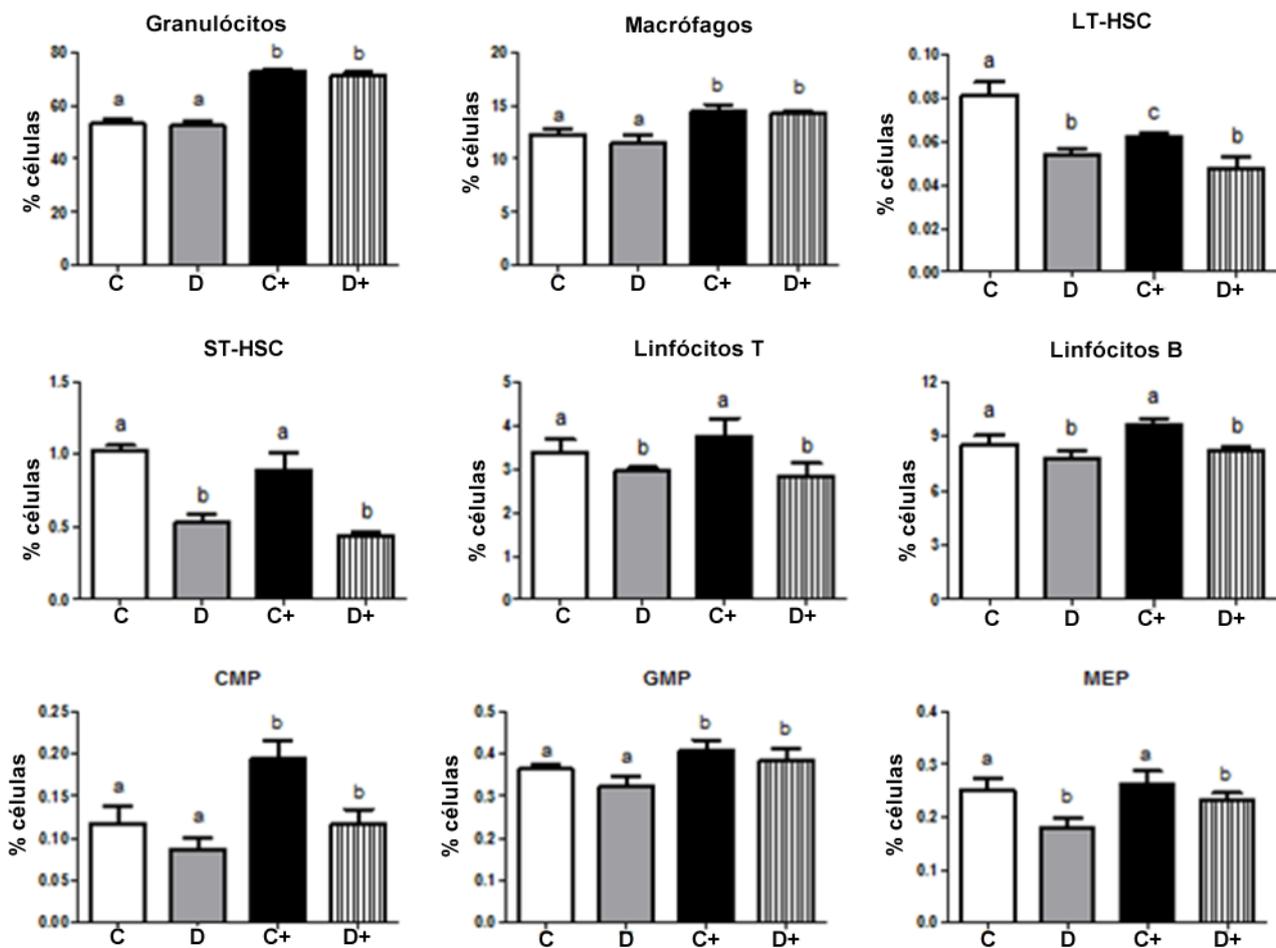
#### **4.8 Imunomarcção em culturas de curta duração**

Foram realizadas culturas de curta duração (24h) com ou sem estímulo de IL-3 para avaliar a diferenciação das diferentes populações de células da medula óssea, como progenitores mielóide e linfóide, macrófagos, granulócitos, eritrócitos e linfócitos (**Fig. 31**).

As populações de linfócitos T e B também estavam reduzidas no grupo desnutrido, no entanto, não responderam ao estímulo de IL-3 nos grupos controle e desnutrido. As células progenitoras de eritrócitos e megacariócitos estavam reduzidas no desnutrido e não responderam ao estímulo por IL-3.

As populações maduras de granulócitos e macrófagos não apresentaram diferenças significativas entre o controle e desnutrido, além disso, ambas responderam ao estímulo de IL-3. De modo semelhante, as células progenitoras mielóide comum (CMP) e progenitora de granulócitos/monócitos também não apresentou diferenças entre os grupos controle e desnutrido, mas também responderam ao estímulo de IL-3.

As células-tronco hemopoéticas de longa duração (LT-HSC) e de curta duração (ST-HSC) apresentaram número significativamente reduzidos nos animais desnutridos, sendo que as LT-HSC reduziram ainda mais o número com o estímulo em animais controle, devido a sua diferenciação e não-renovação, e a ST-HSC permaneceu com os mesmos valores tanto em animais controle quanto nos desnutridos.



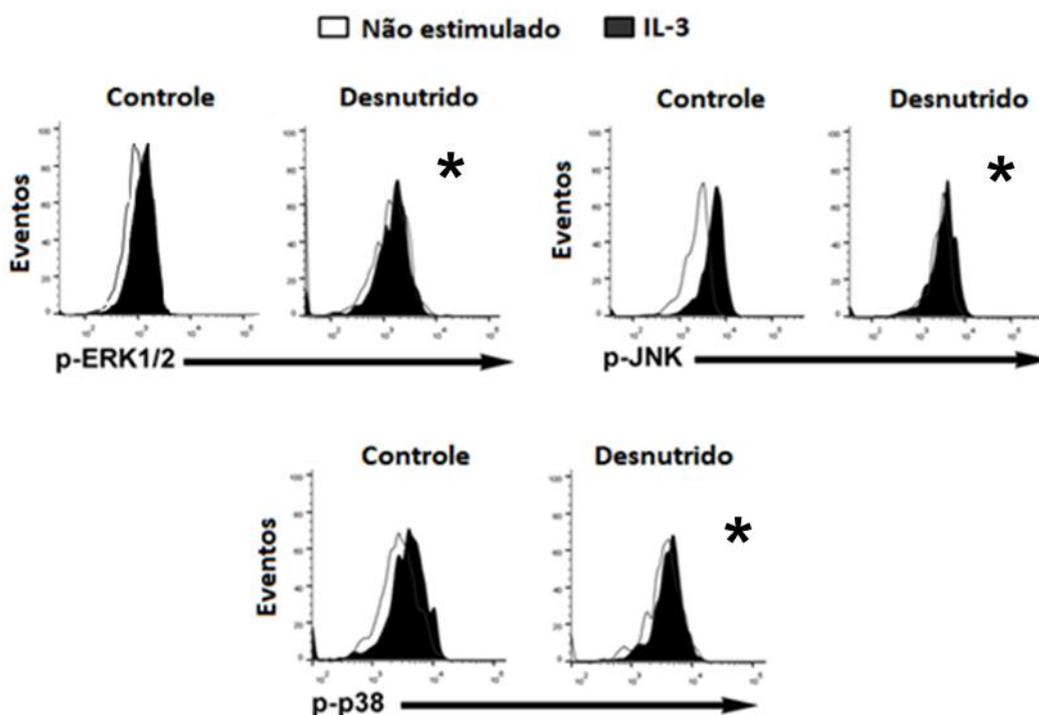
**Figura 31.** Populações de origem hemopoética presentes na cultura de células medulares de curta duração (24h) de animais do grupo C (Controle), D (Desnutrido), C+ (Controle estimulado com IL-3) e D+ (Desnutrido estimulado com IL-3). (n=6). **n** representa número de animais avaliados. Abreviações: HSC (célula-tronco hemopoética); LT (longa duração); ST (curta duração); CMP (progenitor mielóide comum); GMP (progenitor de granulócitos/monócitos); MEP (progenitor de megacariócitos/ eritrócitos). Teste estatístico de Kruskal-Wallis e *post-hoc test de Dunns*. Letras diferentes demonstram que há diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Valores significativos para  $p < 0,05$ .

#### 4.9 Avaliação da expressão e ativação de proteínas por citometria de fluxo

O cálcio é uma molécula de sinalização que regula diversos sistemas, como hemopoéticos. Apesar de a participação do cálcio na hemopoese ainda não ser totalmente compreendida, sabe-se que o cálcio intracelular atua na sinalização de vários processos, como a via das MAPKs (Erk1/Erk2, p38 e JNK), promovendo ativação de proteínas responsáveis pela proliferação, diferenciação e morte celular (PAREDES-GAMERO *et al.*, 2012).

As MAPKs mais conhecidas são a Erk1/Erk2 (p42/p44), mas além da família das Erk existe a família da p38 e da JNK (c-Jun NH2-terminal kinase). A via da Ras-Raf-MEK-MAPK controla muitos eventos celulares como embriogênese, diferenciação, proliferação e morte celular (CULLEN & LOCKYER, 2002). Além disso, DAG parece atuar aumentando a afinidade de PKC (proteína quinase C) para cálcio e CAMKII, proteínas envolvidas com a proliferação e diferenciação de células hemopoéticas primitivas (LEON *et al.*, 2011).

Avaliamos a via de sinalização das MAPKs (ERK, JNK e p38) e observamos que ERK1/2, JNK e p38 em células-tronco hemopoéticas dos animais controle respondem ao estímulo de IL-3, mas não no grupo desnutrido (Fig. 32).



**Figura 32.** Avaliação da expressão e ativação de fatores de transcrição ERK, JNK e p-38 por citometria de fluxo de animais do grupo controle (n=6) e desnutrido (n=6). Gráficos representativos demonstrando a não ativação da via nos animal desnutrido após estímulo por IL-3(\*). n representa número de animais avaliados. Adquiridos 200.000 eventos em citômetro Accuri C6®.

Para entender a não ativação desses fatores de transcrição fomos avaliar as proteínas presentes nessa via que podem influenciar a auto-renovação, proliferação e diferenciação da célula tronco hemopoética (CTH). Com marcações específicas na CTH, avaliamos as seguintes proteínas: p-PKC, p-PLC $\gamma$ , p-RAS, p-CaMKII, p-STAT3, p-STAT-5, p-JAK1, p-JAK2, p-AKT e p-PI3K.

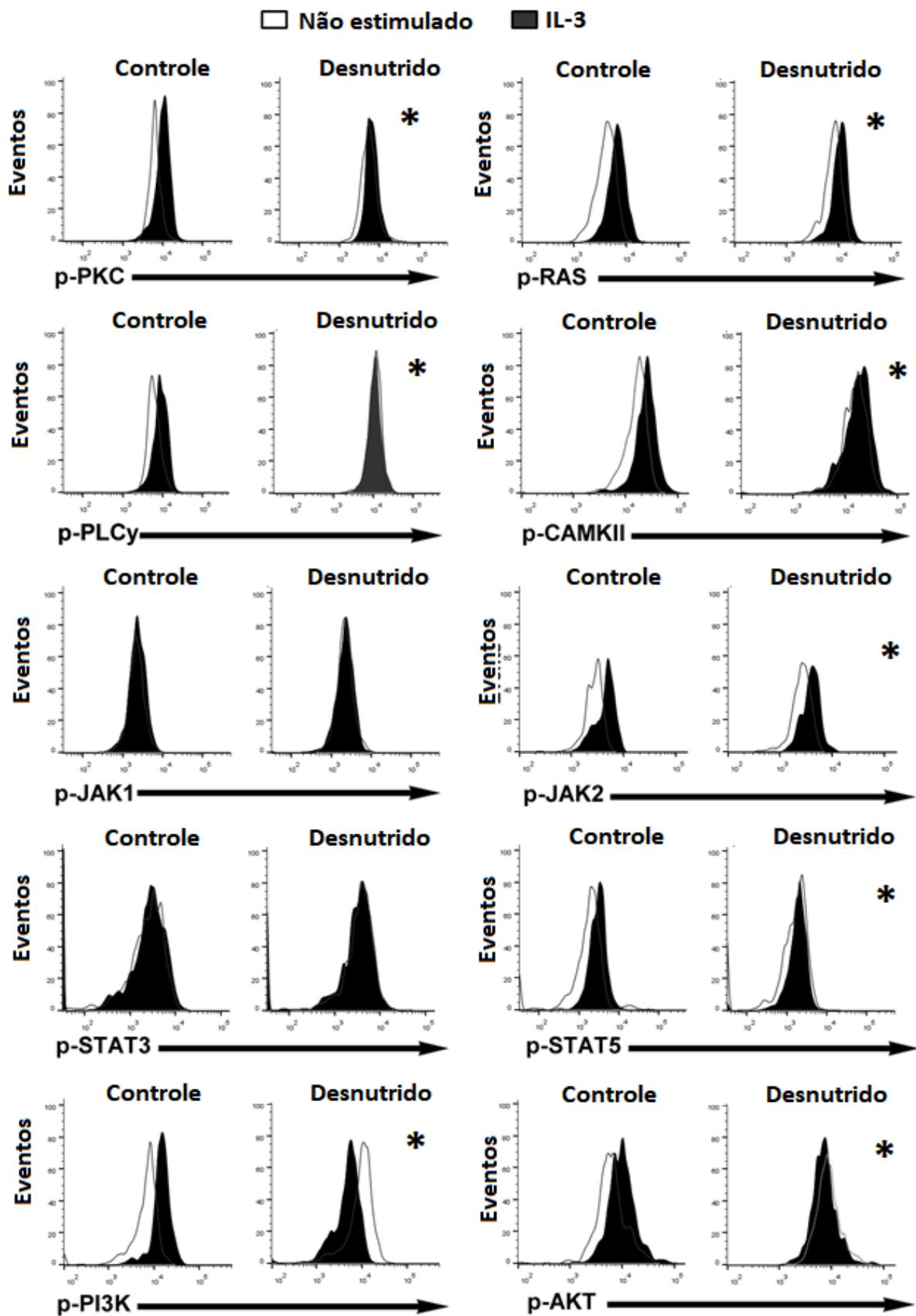
Em nosso modelo de desnutrição proteica, encontramos várias proteínas dessa via de sinalização com a ativação prejudicada na CTH, tais como p-PKC, p-PLC $\gamma$ , CAMKII, p-STAT5 e p-AKT, enquanto que p-PI3K encontra-se aumentada (**Fig. 33**).

Paredes-Gamero e colaboradores demonstraram que G-CSF ativa JAK1 e ao mesmo tempo ativa PLC $\gamma$  e PKC. Além disso, CaMKII é também ativada por G-CSF, bem como por GM-CSF em CTHs (PAREDES-GAMERO *et al.*, 2008; LEON *et al.*, 2011). PLC $\gamma$ 2 é importante para a ativação de fatores de transcrição STAT3 e PU.1 porque a inibição de PLC $\gamma$  provoca uma redução da ativação de STAT3, a expressão aumentada de PU.1.

Foi demonstrada a importância da PLC $\gamma$  e PKC na proliferação e diferenciação que são causados pelas cascatas de sinalização gerados por G-CSF e M-CSF e no comprometimento das células-tronco em monócitos e granulócitos. Também foi demonstrado que a participação de ERK1/2 está associada com os efeitos induzidos por M-CSF e que a participação de JAK1, STAT-3 e PU.1 está associada com os efeitos induzidos por G-CSF. Essas alterações prejudicam a transcrição de genes responsáveis pela proliferação e diferenciação celular por meio da via das MAPKs (BARBOSA *et al.*, 2011).

JAK1 e STAT3 não apresentaram diferenças entre os grupos controle e desnutrido, devido ao fato de IL-3 não estimular essa via, mas a via de JAK2/STAT5. JAK1/STAT3 é ativada por estímulos como IL-6 e IL-10. A ligação de IL-3 e GM-CSF aos seus receptores promove a dimerização destes receptores de citocinas e provoca as vias JAK/STAT e RAS/ERK (PAREDES-GAMERO *et al.*, 2012).

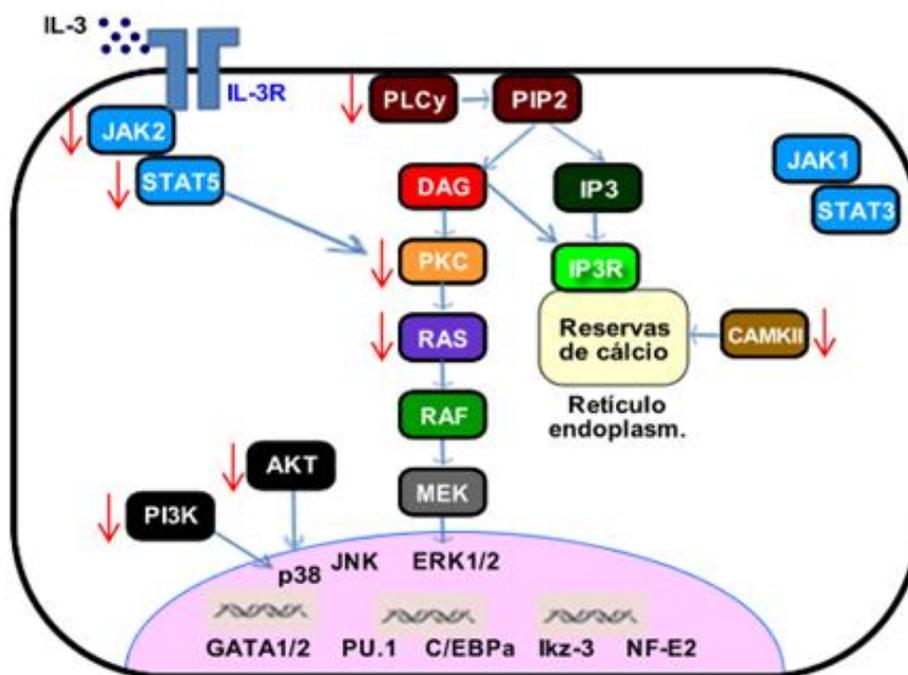
A limitação da resposta ao estímulo de IL-3 em p-ERK1/2, JNK e p38 estimuladas por IL-3 nos animais desnutridos pode estar ligada à diminuição da fosforilação de outras proteínas da via, tais como p-PKC, p-PLC $\gamma$ , JAK1 e CAMKII. Como pode ser visto, a ativação de cinases, como a PKC, ou CaMKs, promove cascatas de fosforilação de proteínas que levam a outras vias intracelulares como a da MAPK (via da Ras→Raf→MEK), (**Fig. 34**) ou proteínas como a Ras poderiam promover a ativação da sinalização de Ca<sup>2+</sup><sub>i</sub> (LEON *et al.*, 2011).



**Figura 33.** Avaliação da expressão e ativação por IL-3 de proteínas de interesse por citometria de fluxo de animais do grupo controle (n=6) e desnutrido (n=6). Gráficos representativos demonstrando a não ativação da via nos animal desnutrido após estímulo por IL-3(\*). n representa número de animais avaliados. Adquiridos 200.000 eventos em citômetro Accuri C6®.

Barbosa e colaboradores também demonstraram o papel da via de sinalização de cálcio sem envolvimento mielóide, relacionando uma ação de PLC $\gamma$ 2 (Phospholipase C gamma 2) e PKC (proteína quinase C) com uma diferenciação mediada por M-CSF e G-CSF ativada por citocinas. Além disso, um PLC $\beta$ 2 (Phospholipase C beta 2) é ativado pelo ATP. Tanto PLC $\gamma$  quanto PLC $\beta$  induzem a liberação de cálcio intracelular pela formação de IP3 (BARBOSA *et al.*, 2011).

Embora várias citocinas regulem a proliferação e sobrevivência de células progenitoras e CTHs, alguns estudos têm explorado o papel destas citocinas nos eventos de comprometimento específicos de linhagem mielóide. Jack e colaboradores compararam diretamente a transdução de sinal em células mielóides imaturas, e indicaram que o M-CSF activa a ERK, induzindo desse modo os níveis mais elevados de c-fos e C/EBP $\alpha$ , ao passo que o G-CSF estimula a fosforilação STAT3 (JACK *et al.*, 2009).



**Figura 34. Alterações na ativação da via de sinalização das MAPKs por IL-3 em desnutrição proteica.** A ativação da via de sinalização das MAPK em células-tronco hemopoéticas estimuladas por IL-3 é prejudicada em casos de desnutrição proteica. Diversas proteínas da via, como PLC $\gamma$ , JAK2, STAT3, PKC e RAS não respondem ao estímulo, levando a menor ativação de ERK1/2 e conseqüentemente a uma menor produção dos fatores de transcrição hemopoéticos GATA1/2, PU.1, C/EBP $\alpha$ , NF-E2 e Ikz-3.

#### 4.10 Detecção de citocinas e fatores de crescimento no sobrenadante de cultura de estroma de longa duração

Em relação à produção de citocinas em estados de desnutrição, não existe consenso na literatura. Em nosso estudo, foi observado que a desnutrição proteica não alterou a produção das citocinas IL-3, IL-7, IL9, IL-11 e TNF $\alpha$ , sendo a secreção delas

semelhantes em todos os tempos avaliados, com exceção da IL-7 e TNF $\alpha$  que têm uma maior produção no 28<sup>o</sup> dia.

Realizamos a cinética da produção de fatores de crescimento e citocinas no sobrenadante de cultura nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias de cultura de estroma de medula óssea (**Fig. 35 e 36**) para avaliar alterações na função das células presentes na cultura.

A produção de *stem cell factor* (SCF) é semelhante aos 7 e 14 dias de cultivo, apresentando aumento aos 21 e 28 dias de cultura. Em todos os tempos avaliados a produção de SCF no sobrenadante de cultura de células de animais desnutridos mostrou redução significativa, mas proporcional (**Fig. 35**).

Quando GM-CSF foi dosado, verificamos que há produção semelhante no sobrenadante de cultura de células de animais nas culturas dos grupos controle e desnutrido tanto em 7 como em 14 dias, no entanto; identificamos uma menor produção desse fator de crescimento nos tempos de 21 e 28 dias no grupo desnutrido (**Fig. 35**).

A produção de G-CSF foi significativa a partir do 21<sup>o</sup> dia de cultura, com elevação no 28<sup>o</sup> dia. No entanto, os valores em sobrenadante de cultura de células de animais desnutridos foram significativamente menores (**Fig. 35**).

As concentrações reduzidas de G-CSF e de GM-CSF podem justificar o menor número de células dessas linhagens nos ensaios de medula óssea de longa duração assim como no resultado do mielograma.

A produção de M-CSF foi semelhante aos 7 e 14 dias de cultura e aumentou a partir do 21<sup>o</sup> dia de cultura, mantendo os valores no 28<sup>o</sup> dia. Não houve diferença de produção entre os grupos controle e desnutrido em nenhum dos tempos avaliados (**Fig. 35**).

O M-CSF atua no comprometimento das células-tronco em monócitos e granulócitos, mas também é uma molécula muito importante no controle da maturação e comprometimento dos precursores de osteoclastos, atuando também na regulação de RANK (mediador na formação de osteoclastos). RANK ativa e fosforila TRAF6, que promove a ativação de NF $\kappa$ B, JNK, c-Fos, levando à ativação dos progenitores, maturação e ativação dos osteoclastos (BOYCE, 2013; EDWARDS e MUNDY, 2011).

Nesse estudo não observamos alterações nas concentrações de M-CSF no lavado medular dos animais. Assim, outros fatores podem estar associados à ativação dos osteoclastos.

A produção do fator de crescimento TGF- $\beta$  apresentou dados semelhantes aos 7 e 14 dias de cultura. Aos 21 dias encontramos um aumento desse fator de crescimento no sobrenadante de cultura de células de animais controle, que se manteve aos 28 dias. Já

em desnutridos não teve aumento no 21<sup>o</sup> e 28<sup>o</sup> dias, mantendo valores semelhantes aos dos tempos anteriores (**Fig. 35**).

O TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) é uma proteína que controla a diferenciação celular, a proliferação e outras funções celulares. A diminuição desse fator em animais desnutridos após 21 dias de cultura prejudica a diferenciação celular, comprometendo o estabelecimento do microambiente indutor de hemopoese.

Observamos que as dosagens de citocinas IL-3, IL-9 e IL-11 no sobrenadante de cultura celular mostraram dados semelhantes em todos os tempos avaliados e que não havia diferença significativa entre os grupos.

A IL-9 é produzida por linfócitos CD4<sup>+</sup> estimulados por mitógenos ou antígenos (RENAULD *et al.*, 1993). Estimula blastos formadores de colônias de eosinófilos a responderem a IL-3 (YANG, 1992).

A IL-11 é produzida por células mesenquimais e por fibroblastos do estroma da medula óssea (QUENIAUX *et al.*, 1993). Apresenta ação sinérgica com a IL-6, G-CSF, IL-3 em relação às colônias de megacariócitos, sendo um importante regulador da megacariopoese (KOBAYASHI *et al.*, 1993).

A IL-7 teve valores semelhantes no 7<sup>o</sup>, 14<sup>o</sup> e 21<sup>o</sup> dia, sendo que no 28<sup>o</sup> dia ocorreu um aumento dessa citocina no sobrenadante de cultura celular, mas sem diferenças significativas entre os grupos controle e desnutrido. A IL-7 é secretada por células estromais da medula óssea e células tímicas. Receptores de IL-7 são expressos em células pré-B e em suas progenitoras. Esta citocina estimula a proliferação das células precursoras de linfócitos B, sem afetar sua diferenciação. Estimula ainda a maturação de megacariócitos (PAVLETIC *et al.*, 1993).

Dosamos, ainda, as citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF $\alpha$ . A IL-6 teve valores semelhantes no 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias, com um aumento no 21<sup>o</sup> dia de cultura, mas sem diferenças significativas entre os grupos. No 28<sup>o</sup> dia tivemos um aumento apenas no grupo controle, sendo que o grupo desnutrido apresentou dados semelhantes do 21<sup>o</sup> dia (**Fig. 36**).

Das dezenas de citocinas liberadas durante uma resposta imune, a interleucina-1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e a interleucina-6 (IL-6) são os principais mediadores do metabolismo intermediário. Essas três citocinas atuam de forma concertada para diminuir a ingestão de alimentos, aumentar o gasto energético em repouso, a gliconeogênese, a oxidação da glicose, a síntese hepática de ácidos graxos e proteínas de fase aguda, diminuição da absorção de ácidos graxos por adipócitos e alterações na distribuição de zinco, ferro e cobre. A maioria dessas atividades resulta de interações diretas entre a citocina e as células respondentes. IL-1, TNF $\alpha$  e IL-6 também

afetam alterações no metabolismo, alterando os níveis de insulina circulante, glucagon e corticosterona (KLASING, 1988).

Ao avaliarmos a produção de TNF $\alpha$ , verificamos a produção semelhante dessa citocina em 7, 14 e 21 dias em ambos os grupos. No 28º dia ocorreu um aumento desta citocina em ambos os grupos (**Fig. 36**).

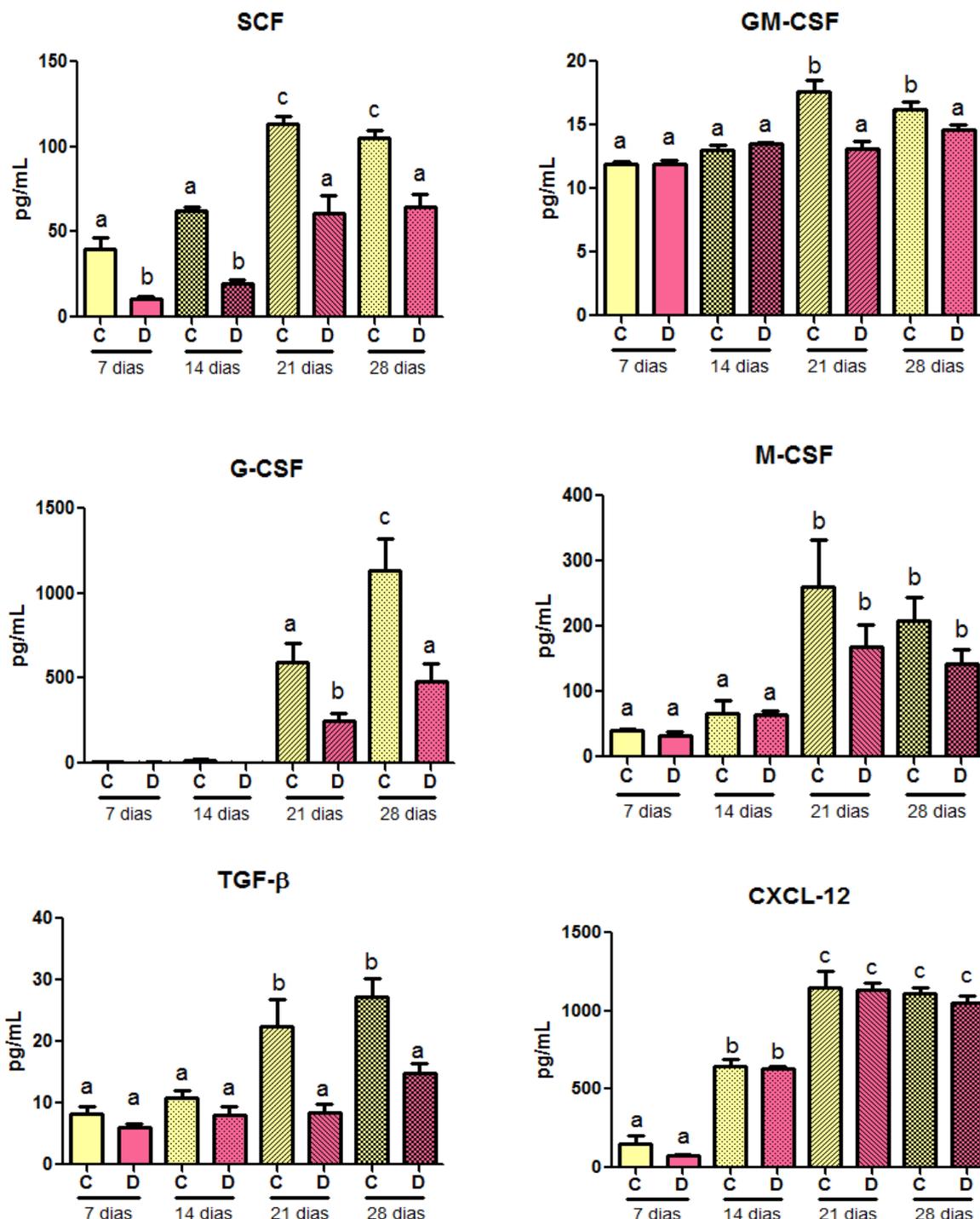
O TNF $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória que pode atuar na ativação de neutrófilos, síntese de proteínas de fase aguda, estimulando a secreção de quimiocinas, além de estimular a atividade microbicida, a produção de IL-1 $\alpha$  e a apoptose (OLEFSKY & GLASS, 2010). A produção de TNF $\alpha$  foi avaliada em diversos trabalhos de nosso grupo e foi constatado que se encontra diminuída em casos de desnutrição proteica (FOCK *et al.*, 2007; CORTEZ *et al.*, 2013). O TNF $\alpha$  age no adipócito regulando o acúmulo de gordura, além de atuar em processos dependentes de insulina, como a homeostase glicêmica e o metabolismo de lipídios (CAWTHORN & SETHI, 2008).

O TNF $\alpha$  atua através da ativação de receptores de TNF $\alpha$  e, principalmente, do receptor I (TNFR1), que é responsável pela maioria dos efeitos do TNF $\alpha$ . Esta ativação desencadeia uma série de eventos intracelulares que resultam na ativação do fator de transcrição NF-kB (OLIVEIRA *et al.*, 2014). No entanto, estudos com humanos hospitalizados e alimentados com dieta de baixa proteína não sofreram efeitos na via de sinalização do fator de transcrição pró-inflamatório NFkB no sistema nervoso (SMITH, 2003).

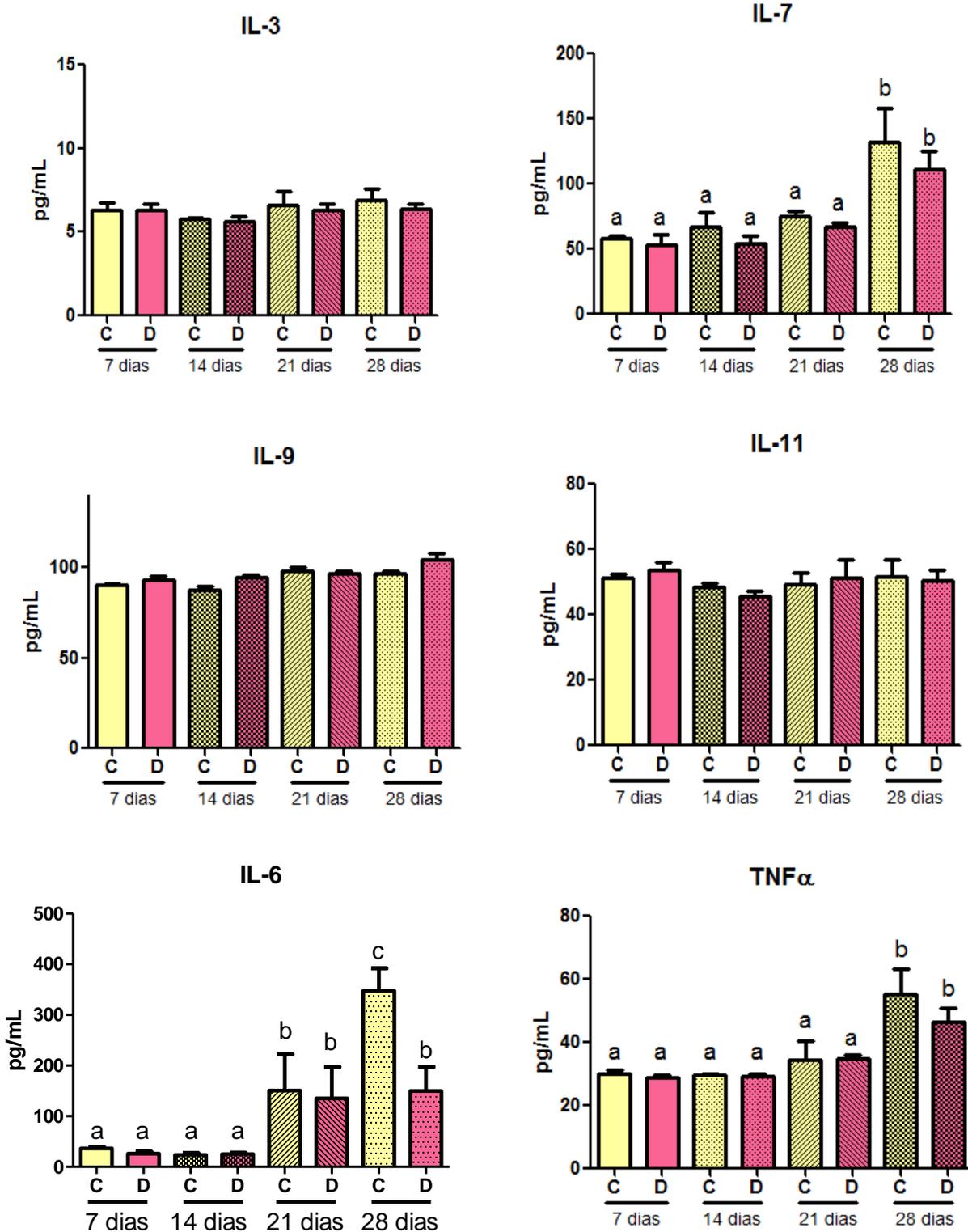
A produção de IL-6 aumentou no 21º dia, mas sem diferenças entre os grupos. No 28º dia ela continuou a aumentar no grupo controle e permaneceu estável no grupo desnutrido. A IL-6 é uma citocina que estimula a proliferação das células-tronco hemopoéticas e, também, é atuante tanto na imunidade natural como adquirida. Sua produção é estimulada pela presença de microorganismos e também pelas citocinas IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$ . A IL-6 estimula a produção de leucócitos, como neutrófilos e linfócitos B, que se diferenciam para produção de anticorpos (FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; TILG & MOSCHEN, 2006).

A IL-6 está altamente ligada ao processo inflamatório, aumentando a expressão de moléculas de adesão endotelial, mediando a migração de neutrófilos (BOU GHOSN *et al.*, 2010). Ela também estimula a produção de proteínas de fase de fase aguda, bem como a produção de leucócitos, como neutrófilos e linfócitos B, que se diferenciam para produção de anticorpos. No tecido adiposo está presente em grande quantidade e podem atuar, além da inflamação, como agentes de lipólise (RAMALHO & GUIMARAES, 2008).

Em casos de DP, ocorre a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias (TILG & MOSCHEN, 2006), tais como IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  e aumento de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, observados tanto em camundongos Swiss webster como C57bl/6J (CRISMA, 2010). No entanto, a capacidade de ativação das MAPKs em resposta ao estímulo por IL-6 é preservada em casos de DP, sugerindo a preservação adaptativa da capacidade de resposta da fase aguda durante a desnutrição (LING *et al.*, 2004).



**Figura 35.** Resultados, em valores médios $\pm$ SD, da dosagem de fatores de crescimento no sobrenadante de cultura de medula óssea dos grupos C – Controle (n=6) e D - Desnutrido (n=6). n representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Kruskal-Wallis e Post test de Dunns. Letras diferentes representam diferenças significativas.



**Figura 36.** Resultados, em valores médios $\pm$ SD, da dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de medula óssea dos grupos C – Controle (n=6) e D - Desnutrido (n=6). **n** representa número de animais avaliados. Teste estatístico de Kruskal-Wallis e *Post test* de Dunns. Letras diferentes representam que há diferenças significativas entre os grupos.

A permanência das células-tronco no nicho endosteal também é influenciada pela ação de *CXCL12*, angiopoetina (*ANGPT1*), jagged (*JAG2*) e N- caderina (*CDH2*). Tsujita (2016) verificou que esses fatores estão diminuídos na DP, fato que prejudica a permanência das células-tronco em quiescência no nicho endosteal (TSUJITA, 2016).

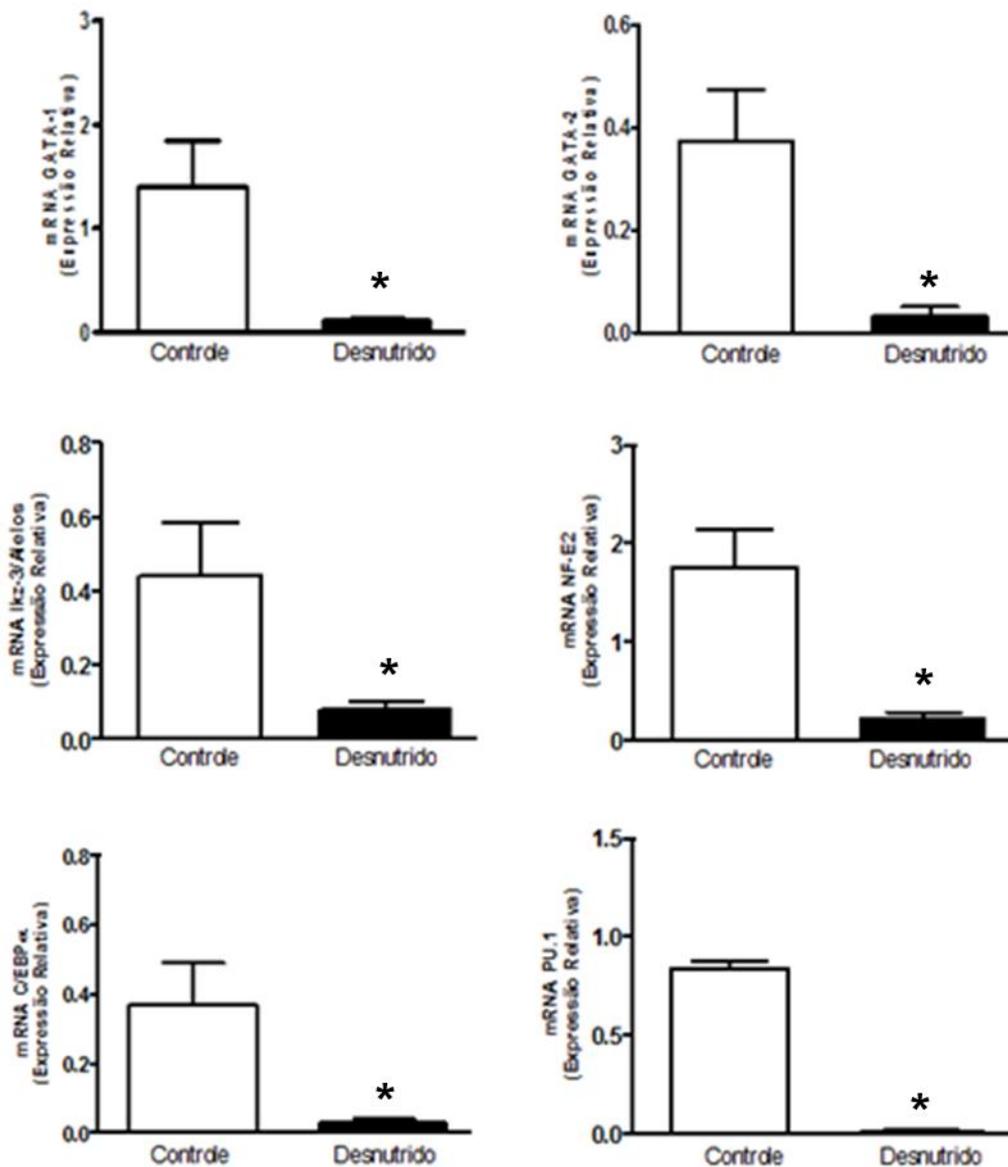
O microambiente alterado potencialmente modifica a hemopoese, tanto *in vivo* como *in vitro*. Apenas alguns estudos correlacionam DP com alterações da matriz extracelular. Lyra *et al.*, (1993) observaram um aumento da densidade de MEC no timo, e este é considerado responsável pela depleção de timócitos. Em um estudo anterior, foi relatado um aumento na fibronectina e laminina extraível da medula óssea em ratos com DP (VITURI *et al.*, 2000). Existem evidências de que estas moléculas influenciam as interações célula-célula e célula-matriz e sugere que eles têm um papel importante no controle da hemopoese (KOLSET & GALLAGHER, 1990).

Crianças com DP apresentam alterações quantitativas da MEC no timo, como o aumento da fibronectina e da laminina. Essas alterações nas proteínas da matriz extracelular podem estar associadas à depleção de timócitos (SAVINO *et al.*, 2007). Manojkumar e Kurup observaram aumento de quantidades de glicosaminoglicanos, como ácido hialurônico, heparina, sulfato de condroitina e sulfato de dermatano, no cérebro de ratos com DP (MANOJKUMAR & KURUP, 1998).

Os adultos que sofrem de desnutrição, como aqueles com anorexia nervosa, apresentam hipoplasia da medula óssea caracterizada por uma diminuição das células hemopoéticas. Além disso, as estruturas gelatinosas compostas por ácido hialurônico são encontradas na medula óssea desses pacientes. Essas alterações são características de uma desordem conhecida como degeneração gelatinosa da medula óssea (BÖHM, 2000; OSGOOD *et al.*, 2014).

#### 4.11 Avaliação de fatores de transcrição em células-tronco hemopoéticas

A avaliação da expressão relativa do mRNA GATA1, GATA2, Ikz-3, NF-E2, C/EBP $\alpha$  e PU.1 em células-tronco hemopoéticas (LSK) foi realizada por PCR em tempo real, encontrando-se que todos os fatores analisados estavam diminuídos em animais desnutridos (**Fig. 37**).



**Figura 37.** Resultados, em valores médios $\pm$ SD, da expressão relativa do mRNA de animais grupos Controle (n=6) e Desnutrido (n=6). \*Valores significativos para  $p < 0,05$ . Teste estatístico de Mann-Whitney.

A proliferação e diferenciação de células hemopoéticas e progenitoras está sob controle rigoroso de uma rede reguladora orquestrada por fatores de transcrição específicos da linhagem. Os principais são GATA1/2/3, PU.1, C/EBPa, IKZF3 e NF-E2 (ZHANG *et al.*, 2012).

GATA1/2/3 são reguladores essenciais no desenvolvimento de linhagens eritróides e megacariocíticas na patogênese molecular de diferentes doenças hemopoéticas. GATA1 e GATA2 desempenham papéis essenciais na regulação de genes durante a diferenciação hemopoética. (LENTJES *et al.*, 2016). GATA3 regula, ainda, a auto-renovação e a diferenciação dos CTH de longa duração da medula óssea (FRELIN *et al.*, 2013). Mostrou-se que o GATA3 regula o surgimento do CTH durante a embriogênese (FITCH *et al.*, 2012).

Animais desnutridos mostraram redução dos níveis de expressão relativa do mRNA de GATA1 e GATA2, prejudicando a diferenciação hemopoética. O GATA1 é essencial para a sobrevivência e diferenciação terminal de precursores eritróides, megacariocíticos, eosinofílicos e mastócitos, enquanto o GATA2 regula principalmente a proliferação e manutenção de progenitores imaturos em células hemopoéticas (MORIGUCHI *et al.*, 2010).

PU.1 é um fator de transcrição necessário para o desenvolvimento de células mielóides e linfóides. Como o PU.1 é necessário para várias linhagens diferentes, não ficou claro o papel que a PU.1 tem para decidir se uma célula progenitora hemopoética se diferencia em macrófagos, granulócitos ou células B. A redução da expressão relativa do mRNA de PU.1 em CTH de animais desnutridos pode afetar a diferenciação mielóide, no entanto, observamos que ao ocorrer o estímulo de IL-3 a diferenciação granulo-monocítica não é afetada (DAHL & SIMON, 2003).

Estudos recentes demonstraram que diferentes concentrações celulares de PU.1 podem direcionar destinos celulares distintos, com as maiores concentrações de PU.1 necessárias para o desenvolvimento de macrófagos e menores concentrações para a diferenciação granulocítica. Por fim, a regulação positiva de PU.1 está implicada na maturação de células mielóides uma vez que se comprometeram com as linhagens de macrófagos e granulócitos (DAHL & SIMON, 2003).

C/EBPa (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*) é essencial para o comprometimento da linhagem mielóide e, portanto, requer tanto para a formação normal de granulócitos maduros quanto para o desenvolvimento de leucemia mielóide aguda. Além disso, a proteína codificada pode se ligar ao promotor e modular a expressão do

gene que codifica a leptina, uma proteína que desempenha um papel importante na homeostase do peso corporal (OHLSSON *et al.*, 2016).

IKZF3 (*Ikaros family zinc finger 3*) é um dos fatores de transcrição específico de hemopoéticas envolvido na regulação do desenvolvimento de linfócitos. Este produto genético é um fator de transcrição que é importante na regulação da proliferação e diferenciação de linfócitos B. O regulamento da expressão gênica em linfócitos B é complexo, pelo menos seis transcritos alternativos que codificam diferentes isoformas foram descritos (FAN & LU, 2016).

Estudos sugerem que os principais sites de expressão de NF-E2 são células hemopoéticas. NF-E2 é parte de uma rede regulatória complexa, incluindo fatores de transcrição tais como GATA1 e RUNX1, controlando a função celular megacariocítica e/ou eritróide. A ausência de NF-E2 leva a uma produção de plaquetas gravemente prejudicada (GASIOREK & BLANK, 2015).

A redução em todos os fatores de transcrição estudados (GATA1/2, PU.1, C/EBPa, IKZF3 e NF-E2) em CTHs de animais desnutridos, associada às alterações já discutidas em nosso trabalho, demonstra comprometimento da proliferação e diferenciação das células hemopoéticas em casos de DP.

## 5. CONCLUSÃO

A privação proteica *in vitro* prejudica a hemopoese medular, afetando diretamente a formação do estroma medular, com aumento de adipócitos, redução de fatores de crescimento, alteração na sinalização de cálcio, MAPK e nos fatores de transcrição. Nesse contexto, observam-se falhas na interação entre as células que compõe o estroma, com predomínio de adipócitos. Em conjunto, esses dados podem ser responsáveis pelas alterações encontradas no estroma de animais desnutridos e com isso, a hemopoese.

O metabolismo do cálcio está alterado na célula-tronco hemopoética, prejudicando a ativação de vias importantes de proliferação e diferenciação celular, como a via das MAPK, levando a uma menor produção de fatores de transcrição essenciais para a renovação celular. Diante destes eventos, concluímos que as alterações na proliferação, diferenciação e maturação, ora observadas, são decorrentes da alteração estrutural do microambiente indutor da hemopoese, comprometendo os processos de sinalização celular e a fisiologia das células tronco/progenitoras.

## 6. REFERÊNCIAS

1. ABBOUD CN, LICHTMAN MA. Structure of the marrow and the hemopoietic microenvironment. In: Collier BS, Kipps TJ, Seligsohn U, Beutler E, Lichtman MA, eds: Williams Hematology. 6th ed. New York, NY: McGraw Hill. 29–43, 2000.
2. ADAMS GB, CHABNER KT, ALLEY IR, OLSON DP, SZCZEPIORKOWSKI ZM, POZNANSKY MC, KOS CH, POLLAK MR, BROWN EM, SCADDEN DT. Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature*. 439(7076):599-603, 2006.
3. ALVES AP, DAMASO AR, DAL PAI ARV. The effects of prenatal and postnatal malnutrition on the morphology, differentiation, and metabolism of skeletal striated muscle tissue in rats, *Jornal de Pediatria*, 84(3), 2008.
4. ANSTEAD GM, CHANDRASEKAR B, ZHANG Q, MELBY PC. Multinutrient undernutrition dysregulates the resident macrophage proinflammatory cytokine network, nuclear factor-kappa B activation, and nitric oxide production. *J Leukoc Biol.*, 74(6):982-91, 2003.
5. AROSA FA, CARDOSO EM, PACHECO FC. Fundamentos de Imunologia, 2ª edição. Editora Lidel, 2007.
6. BADALOO AV, FORRESTER T, REID M, JAHLOOR F. Lipid kinetic differences between children with kwashiorkor and those with marasmus. *Am J Clin Nutr.*, 83(6):1283-8, 2006.
7. BARBOSA CM, BINCOLETTO C, PAREDES-GAMERO. "PLCgamma2 and PKC are important to myeloid lineage commitment triggered by M-SCF and G-CSF." *J Cell Biochem* 115(1): 42-51, 2014.
8. BARBOSA CM, LEON CM, PAREDES-GAMERO. "Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines." *Cell Death Dis* 2: e165, 2011.
9. BARJA-FIDALGO C, SOUZA EP, SILVA SV, RODRIGUES AL, ANJOS-VALOTTA EA, SANNOMYIA P, DEFREITAS MS, MOURA AS. Impairment of inflammatory response in adult rats submitted to maternal undernutrition during early lactation: role of insulin and glucocorticoid. *Inflamm Res.*, 52(11):470-6, 2003.
10. BATISTA FILHO M, RISSIN A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 2003.
11. BATISTA FILHO M, RISSIN A. Desnutrição energético-proteica. In: TADEI, J. A. A. *Nutrição em Saúde Pública*, Rio de Janeiro, Rubio, 2011.

12. BERRIDGE MJ, BOOTMAN MD, RODERICK HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 4(7):517-29, 2003.
13. BLATT SL, FOCK RA, BEUTLER B, PEREIRA J, TSUJITA M, VIDAL DE BARROS FE, BORELLI P. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. *Nutrition (Burbank, Calif.)*, 26:1021-8, 2010.
14. BÖHM J. Gelatinous transformation of the bone marrow: the spectrum of underlying diseases. *Am J Surg Pathol.*, 24:56–65, 2000.
15. BOOTMAN MD. Calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 4(7):a011171, 2012.
16. BORELLI P, BARROS FEV, NAKAJIMA K, BLATT SL, BEUTLER B, PEREIRA J, TSUJITA M, FAVERO GM, FOCK RA. Protein-energy malnutrition halts hemopoietic progenitor cells in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 42(6):523-530, 2009.
17. BORELLI P, BLATT S, PEREIRA J. Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *The British journal of nutrition*, 97(2):307–314, 2007.
18. BORELLI P, BLATT SL, ROGERO MM, FOCK RA. Haematological alterations in protein malnutrition. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, Brasil*, 26(1): 49-56, 2004.
19. BORELLI P, NARDINELLI L. Protein calorie-malnutrition a decreased in the macrophage's respiratory burst capacity. *Rev Bras. Cienc. Farm; São Paulo*, 37:51-60, 2001.
20. BORELLI P, KHANG HC, BOROJEVIC R, DAGLI MLZ. Protein malnutrition: some aspects of in vitro adhesion of mouse peritoneal macrophages. *Ann. Nutr. Metab., Basel*, 42:367-73, 1998.
21. BORELLI P, MARIANO M, BOROJEVIC R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutrition Research, N.Y.* 15(10):1477-85, 1995.
22. BORELLI P. Inflamação em camundongos submetidos à desnutrição proteica: análise da mobilidade celular e da hematopoese. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo. 1992.
23. BORSATTO EM. Desnutrição proteica: avaliação in vitro da capacidade proliferativa de progenitores grânulo-monocíticos da medula óssea de camundongos. Dissertação de Mestrado em Análises Clínicas. Fac. de Ciências Farmacêuticas, USP. 1999.

24. BOULAIS PE, FRENETTE PS. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, 125(17):2621-2629, 2015.
25. BOWERS SLK, BANERJEE I, BAUDINO TA. The extracellular matrix: at the center of it all. *J Mol Cell Cardiol.*, 48:474–482, 2010.
26. BOYCE BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res*, 92(10):860–867, 2013.
27. BRECHER G. New methylene blue as a reticulocyte stain. *Am J Clin Pathol.*, 19(9):895, 1949.
28. BRUNDTLAND GH. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. *Nutr. Ver.*, 58:51-54, 2000.
29. BUENO JR, GOUVÊA CMCP. Cortisol e Exercício: Efeitos, Secreção e Metabolismo. *Rev Bras Prescr Fisiol Exerc.*, São Paulo, 5(29):435-445, 2011.
30. CABALLERO B, SOLOMONS NW, TORUN B, PINEDA O. Calcium metabolism in children recovering from severe protein-energy malnutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, (5):740-5. 1986.
31. CAWTHORN WP, SETHI JK. TNF- $\alpha$  and adipocyte biology. *FEBS letters*, 582(1): 117-131, 2008.
32. CHANDRA RK. Heath Clarke Lecture. Immune responses in undernutrition and overnutrition. Basic considerations and applied significance. *Nutrition*, 5:297-302, 1999.
33. CHANDRA RK. Protein-energy malnutrition and immunological responses. *J nutr.*, Bethesda, 122: 597–600, 1992.
34. CHRISTENSEN JL, WEISSMAN IL. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: A simple method to isolate long-term stem cells. *PNAS*. 98(25):14541-6, 2001.
35. CORDEIRO-SPINETTI E, TAICHMAN RS, BALDUINO A. The bone marrow endosteal niche: how far from the surface? *Journal of cellular biochemistry*, 116(1):6-11, 2015.
36. CORTÉS-BARBERENA E, CEBALLOS-OLVERA I, GONZÁLEZ-MÁRQUEZ H, ORTIZ-MUÑIZ R. Moderate and severe malnutrition alters proliferation of spleen cells in rats. *Cell Prolif.*, 46: 164–171, 2013.
37. CORTEZ M, CARMO LS, ROGERO MM, BORELLI P, FOCK RA. A high-fat diet increases IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  production by increasing NF- $\kappa$ B and attenuating PPAR- $\gamma$  expression in bone marrow mesenchymal stem cells. *Inflammation*. 36(2):379-86, 2013.

38. CRANE GM, JEFFERY E, MORRISON SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nature Reviews Immunology*, 17:573–590, 2017.
39. CRISMA AR. Avaliação da hemopoese e da resposta imune inata mediada por macrófagos em camundongos submetidos à recuperação nutricional após desnutrição proteica. 2010. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
40. CROZIER S J, D’ALECY LG, ERNST SA, GINSBURG LE, WILLIAMS J. A. Molecular mechanisms of pancreatic dysfunction induced by protein malnutrition. *Gastroenterology*, 137(3):1093–1101, 2009.
41. CULLEN PJ, LOCKYER PJ. Integration of calcium and Ras signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 3(5):339-48, 2002.
42. CUNHA MCR, LIMA FDS, VINOLO MAR, HASTREITER A, CURI R, BORELLI P, FOCK R. Protein malnutrition induces bone marrow mesenchymal stem cells commitment to adipogenic differentiation leading to hematopoietic failure. *PLoS ONE* 8(3): e58872, 2013.
43. CUPPARI L. Nutrição nas doenças crônicas não transmissíveis. São Paulo: Manole. 2009.
44. CZERNIECKI BJ, CARTER C, RIVOLTINI L, KOSKI GK, KIM HI, WENG DE, ROROS JG, HIJAZI YM, XU S, ROSENBERG SA, COHEN PA. Calcium ionophore-treated peripheral blood monocytes and dendritic cells rapidly display characteristics of activated dendritic cells. *J Immunol.*, 159(8):3823-37, 1997.
45. DAHL R, SIMON MC. The importance of PU.1 concentration in hematopoietic lineage commitment and maturation. *Blood Cells Mol Dis.*, 31(2):229-33, 2003.
46. DEXTER TM, TESTA NG. In vitro methods in haemopoiesis and lymphopoiesis. *J Immunol Methods*, 38(3-4):177-90, 1980.
47. DEXTER TM, ALLEN TD, LAJTHA LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. *Journal of cellular physiology*, 91(3):335–344, 1977.
48. DONNELLY DS, ZELTERMAN D, SHARKIS S, KRAUSE DS. Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations. *Exp Hematol.*, 27(5):788-96, 1999.
49. DOUMAS BT, WATSON WA, BIGGS HG. Albumin standards and the measurement of serum albumin with bromocresol green. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 31(1):87–96, 1971.
50. DUPONT G, COMBETTES L, BIRD GS, PUTNEY JW. Calcium oscillations. *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, 3(3):a004226. 2011.

51. EDWARDS JR, MUNDY GR. Advances in osteoclast biology: old findings and new insights from mouse models. *Nature Reviews. Rheumatology*, 7(4):235–243, 2011.
52. FAN Y, LU D. The Ikaros family of zinc-finger proteins. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 6(6):513-521, 2016.
53. FAO (Food and Agriculture Organization). 2017. FAOSTAT Database. <http://www.fao.org/publications/> Accessed 21 Apr 2018.
54. FAO (Food and Agriculture Organization). 2015. The State of Food Insecurity in the World 2014. <http://www.fao.org/publications/sofi/2014/en/>. Accessed 21 Apr 2018.
55. FITCH SR, KIMBER GM, WILSON NK, PARKER A, MIRSHEKAR-SYAHKAL B, GÖTTGENS B, MEDVINSKY A, DZIERZAK E, OTTERSBAACH K. Signaling from the sympathetic nervous system regulates hematopoietic stem cell emergence during embryogenesis. *Cell Stem Cell*, 11, 554-566, 2012.
56. FOCK RA, BLATT SL, BEUTLER B, PEREIRA J, TSUJITA M, BARROS FEV, BORELLI P. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. *Nutrition*, 26(10):1021-8, 2010.
57. FOCK RA, VINOLO MAR, SÁ ROCHA VM, SÁ ROCHA LC, 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*, 40:105-14, 2007.
58. FOCK RA. Avaliação de aspectos da resposta inflamatória desencadeada pelo lipopolissacarídeo (LPS) em desnutrição proteica experimental. Quantificação do receptor de LPS (CD14/TLR4) e do fator de transcrição NF-kB, São Paulo, 2005.
59. FOCK RA, SILVA OPPS, BORELLI P. Desnutrição proteica modifica a síntese de óxido nítrico em macrófagos, *Rev. Bras. Ciên. Farm.*, 39(3):115, 2003.
60. FONSECA-ALANIZ MH, TAKADA J, ALONSO-VALE MIC, LIMA FB. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 50(2):216-29, 2006.
61. FRAYN KN. Hormonal control of metabolism in trauma and sepsis. *Clin Endocrinol.*, 24:577-599, 1986.
62. FRELIN C, HERRINGTON R, JANMOHAMED S, BARBARA M, TRAN G, PAIGE CJ, BENVENISTE P, ZUÑIGA-PFLÜCKER JC, SOUABNI A, BUSSLINGER M, ISCOVE NN. GATA-3 regulates the self-renewal of long-term hematopoietic stem cells. *Nature Immunology* 14, 1037-1044, 2013.
63. GARRETT RW, EMERSON SG. Bone and blood vessels: the hard and the soft of hematopoietic stem cell niches. *Cell Stem Cell.*, 4(6):503-6, 2009.

64. GASIOREK JJ, BLANK V. Regulation and function of the NFE2 transcription factor in hematopoietic and non-hematopoietic cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 72(12):2323–35, 2015.
65. GLEASON WA, LANKFORD GL, HERBERT DC. Experimental protein malnutrition decreases calcium-binding protein in rat intestinal mucosa. *J Nutr.*, 112(8):1609-13, 1982.
66. GORNALL AG, BARDAWILL CJ, DAVID MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of biological chemistry*, 177(2):751–766, 1949.
67. GRYNKIEWICZ G, POENIE M, TSIEN RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biolog Chemist*, 260,3440-3450, 1985.
68. HAMMARQVIST F, ANDERSSON K, LUO JL, WERNERMAN J. Free amino acid and glutathione concentrations in muscle during short-term starvation and refeeding. *Clin Nutr.*, 24:236-43, 2005.
69. HIGAMI Y, BARGER JL, PAGE GP. Energy restriction lowers the expression of genes linked to inflammation, the cytoskeleton, the extracellular matrix, and angiogenesis in mouse adipose tissue. *J Nutr.*, 136:343–352, 2006.
70. HUANG ZL, FRAKER PJ. Chronic consumption of a moderately low protein diet does not alter hematopoietic processes in young adult mice. *J Nutr.*, 133(5):1403-8, 2003.
71. IBRAHIM MK, ZAMBRUNI M, MELBY CL, MELBY PC. Impact of childhood malnutrition on host defense and infection. *Clin Microbiol Rev.*, 30(4):919-71, 2017.
72. IFPRI (International Food Policy Research Institute), *Global Nutrition Report 2016: from promise to impact: ending malnutrition by 2030* (Washington, DC: 2016), <https://doi.org/10.2499/9780896295841>.
73. IHLE JN. Interleukin-3 and hematopoiesis. *Chem Immunol.*, 51:65-106, 1992.
74. JACK GD, ZHANG L, FRIEDMAN AD. M-CSF elevates c-Fos and phospho-C/EBPalpha (S21) via ERK whereas G-CSF stimulates SHP2 phosphorylation in marrow progenitors to contribute to myeloid lineage specification. *Blood*. 114(10):2172-80, 2009.
75. JÄRVELÄINEN H, SAINIO A, KOULU M, WIGHT TN, PENTTINEN R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. *Pharmacol Rev.*, 61(2):198-223, 2009.

76. JONES RJ, WAGNER JE, CELANO P, ZICHA MS, SHARKIS SJ. Separation of pluripotent haematopoietic stem cells from spleen colony-forming cells. *Nature*, 347(6289):188-9, 1990.
77. KAHL CR, MEANS AR. Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocr Rev.*, 24(6):719-36, 2003.
78. KANJI S, POMPILI VJ, DAS H. Plasticity and maintenance of hematopoietic stem cells during development. *Recent Patents on Biotechnology*, 5(1):40-53, 2011.
79. KEUSCH GT. The history of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J Nutr*, 133(1):336S–340S, 2003.
80. KIEL JM, MORRISON SJ. Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity*, 25(6):862-4. 2006.
81. KIM H, ZHAO H, KITaura H, BHATTACHARYYA S, BREWER JA, MUGLIA LJ, ROSS FP, TEITELBAUM SL. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. *J Clin Invest.*, 116(8):2152-60, 2006.
82. KLASING KC. Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *J Nutr.*, 118(12):1436-1446, 1988.
83. KLEIN G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*, 51(9-10):914–926, 1995.
84. KNUDSEN KA, MYERS L, MCELWEE SA. A role for the Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis. *Experimental Cell Research*. 188(2):175–84, 1990.
85. KOBAYASHI S, TERAMURA M, SUGAWARA I, OSHIMI K, MIZOGUCHI H. Interleukin-11 acts as an auto-crine growth factor for human megakaryoblastic cell lines. *Blood*, 81:889-893, 1993.
86. KOLSET SO, GALLAGHER JT. Proteoglycans in haemopoietic cells. *Biochim Biophys Acta*, 1032(2-3):191-211, 1990.
87. KRUTZIK PO, CLUTTER MR, NOLAN GP. Coordinate analysis of murine immune cell surface markers and intracellular phosphoproteins by flow cytometry. *J Immunol.*, 175(4):2357-65, 2005.
88. LARANJEIRA P, PEDROSA M, PEDREIRO S, GOMES J, MARTINHO A, ANTUNES B, RIBEIRO T, SANTOS F, TRINDADE H, PAIVA A. Effect of human bone marrow mesenchymal stromal cells on cytokine production by peripheral blood naive, memory, and effector T cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1):3, 2015.
89. LARSSON J, KARLSSON S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*, 24(37):5676–92, 2005.

90. LEE CW, LIN CC, LIN WN. TNF-alpha induces MMP-9 expression via activation of Src/EGFR, PDGFR/PI3K/Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human tracheal smooth muscle cells. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 292(3):L799–812, 2007.
91. LENTJES MH, NIESSEN HE, AKIYAMA Y, DE BRUÏNE AP, MELOTTE V, VAN ENGELAND M. The emerging role of GATA transcription factors in development and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 18:e3, 2016.
92. LEON CM, BARBOSA CM, JUSTO GZ, BORELLI P, RESENDE JD JR, DE OLIVEIRA JS, FERREIRA AT, PAREDES-GAMERO EJ. "Requirement for PLCgamma2 in IL-3 and GM-CSF-stimulated MEK/ERK phosphorylation in murine and human hematopoietic stem/progenitor cells." *J Cell Physiol* 226(7): 1780-1792, 2011.
93. LEONARD MW, LIM KC, ENGEL JD. Expression of the chicken GATA factor family during early erythroid development and differentiation. *Development*, 119:519-531, 1993.
94. LING PR, SMITH RJ, KIE S, BOYCE P, BISTRAN BR. Effects of protein malnutrition on IL-6-mediated signaling in the liver and the systemic acute-phase response in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 287(4):R801-8, 2004.
95. LING PR, BISTRAN BR. Comparison of the effects of food versus protein restriction on selected nutritional and inflammatory markers in rats. *Metab Clin Experim.*, 58:835-42. 2009.
96. LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta CT</sup> Method. *Methods*, 25(4):402-8. 2001.
97. LYRA JS, MADI K, MAEDA CT. Thymic extracellular matrix in human malnutrition. *J Pathol.*, 171:231–236. 1993.
98. MANOJKUMAR V, KURUP PA. Changes in the glycosaminoglycans and glycoproteins in the rat brain during protein calorie malnutrition. *J Clin Biochem Nutr.*, 25:149–157, 1998.
99. MARCOS A, NOVA E, MONTEIRO CA. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur J Clin Nutr*, 57(1):66–9, 2003.
100. MAYANI H, GUILBERT LJ, JANOWSKA-WIECZOREK A. Biology of the hemopoietic microenvironment. *Eur J Haemat*, 49(5):225–233, 1992.
101. MONK JM, MAKINEN K, SHRUM B, WOODWARD B. Blood corticosterone concentration reaches critical illness levels early during acute malnutrition in the weanling mouse. *Exp Biol Med.*, 231:264-8, 2006.

102. MONTEIRO CA, BENICIO MHD, KONNO SC. Causas do declínio da desnutrição infantil no Brasil, 1996-2007. *Revista de Saúde Pública*, 43(1), 2009.
103. MONTEIRO CA. A dimensão da pobreza, da desnutrição e da fome no Brasil. *Estud. avançados*, São Paulo, 17(48):7-20, 2003.
104. MOORE MA, DEXTER TM. Stem cell regulation in continuous hematopoietic cell culture. *Transplant Proc.*, 10(1):83-90. 1978.
105. MOHANDAS N, PRENANT M. Three-dimensional model of bone marrow. *Blood*, 50:633-643, 1978.
106. MORIGUCHI T, SUZUKI M, ENGEL JD, YAMAMOTO M. GATA1 and GATA2 Function in Hematopoietic Differentiation. In: Kondo M. (eds) *Hematopoietic Stem Cell Biology. Stem Cell Biology and Regenerative Medicine*. Humana Press, 2010.
107. MORRISON SJ, SCADDEN DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 505, 327–334, 2014.
108. NAKAJIMA K, CRISMA AR, SILVA GB, ROGERO MM, FOCK RA, BORELLI P. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 30:82-89, 2014.
109. NAVEIRAS O, NARDI V, WENZEL PL, HAUSCHKA PV, FAHEY F. Bone marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*, 460: 259–263, 2009.
110. NEIVA K, SUN YX, TAICHMAN RS. The role of osteoblasts in regulating hematopoietic stem cell activity and tumor metastasis. *Braz J Med Biol Res.*, 38(10):1449-54, 2005.
111. OGAWA M, PORTER PN, NAKAHATA T. Renewal and commitment to differentiation of hematopoietic stem cells: An interpretive review. *Blood*, 61:323, 1983.
112. OHLSSON E, SCHUSTER MB, HASEMANN M, PORSE BT. The multifaceted functions of C/EBP $\alpha$  in normal and malignant haematopoiesis. *Leukemia*, 30(4):767-75, 2016.
113. OLEFSKY JM, GLASS CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.*, 72:219-46, 2010.
114. OLIVEIRA DC, HASTREITER A, MELLO AS, BELTRAN JS, SANTOS EW, BORELLI P, FOCK R. The effects of protein malnutrition on the TNF-R1 and NF- $\kappa$ B expression via the TNF- $\alpha$  signaling pathway. *Cytokine*, 69(2):218-225, 2014.

115. OLIVEIRA DC, HASTREITER A, BORELLI P, FOCK, R. The influence of protein malnutrition on the production of GM-CSF and M-CSF by macrophages. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 52(3):375-382, 2016.
116. OSGOOD E, MUDDASSIR S, JAJU M. Starvation marrow—gelatinous transformation of bone marrow. *J Community Hosp Intern Med Perspect.*, 4. 2014.
117. ÖZKALE M, SIPAHI T. Hematologic and bone marrow changes in children with protein-energy malnutrition. *Pediatr Hematol Oncol.*, 31(4):349-58, 2014.
118. PAIXAO E SILVA O, FOCK RA, ROGERO MM, BORELLI P. Peróxido de hidrogênio e enzimas antioxidantes em desnutrição protéico-energética. *Nutrire: Rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.*, 36(3):1-14, 2011.
119. PAPADIMITRIOU JM, VAN BRUGGEN I. The effects of malnutrition on peritoneal macrophages, *Exp Mol Pathol*, 49(2): 161-70, 1988.
120. PAREDES-GAMERO EJ, BARBOSA CMV, FERREIRA AT. Calcium signaling as a regulator of hematopoiesis. *Frontiers in Bioscience*, E4, 1375-1384, 2012.
121. PAREDES-GAMERO EJ, LEON CM, BOROJEVIC R, OSHIRO ME, FERREIRA AT. Changes in intracellular Ca<sup>2+</sup> levels induced by cytokines and P2 agonists differentially modulate proliferation or commitment with macrophage differentiation in murine hematopoietic cells. *J Biol Chem.*, 283(46):31909-19, 2008.
122. PAVLETIC Z, BENYUNES MC, THOMPSON JA, LIND-GREN CG, MASSUMOTO C, ALDERSON MR. Induction by interleucin 7 of lymphocyte-activated killer activity in lymphocytes from autologous and syngenic marrow transplant recipients before and after systemic interleukin 2 therapy. *Exp Hematol.*, 21:1371-1378, 1993.
123. PEARCE J, RIDLER CM, SIMPSON C, BONNET D. Multiparameter analysis of murine bone marrow side population cells. *Blood*, 103:2541-6, 2004.
124. PROPHET EB, MILLS B, ARRINGTON JB, SOBIN LH. *AFIP Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, DC. 278p. 1992.
125. QUENIAUX VF, MAYER P, LIEHL E, TURNER K, GOLD-MAN SJ, FAGG B. Review of a novel hematopoietic cytokine, interleukin 11. *Int Rev Exp Pathol.*, 34:205-214, 1993.
126. QUESENBERRY, P.J. Hemopoietic stem cells, progenitor cells, and cytokines. In: BEUTLER, E.; LICHTMSN, M.A.; COLLER, B.S.; KIPPS, T.J. *Williams hematology*, 5(22):211-228, 1995.
127. QUINN R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*, 21:775-7, 2005.

128. RAMALHO R, GUIMARAES C. Papel do tecido adiposo e dos macrófagos no estado de inflamação crônica associada a obesidade. *Acta Med. Port.*, 21:489-96, 2008.
129. REDMOND HP, GALLAGHER HJ, SHOU J, DALY JM. Antigen presentation in protein-energy malnutrition, *Cell Immunol.* 163(1):80-7, 1995.
130. REDMOND HP, LEON P, LIEBERMAN MD, HOFMANN K, SHOU J, REYNOLDS JV, GOLDFINE J, JOHNSTON RBJR, DALY JM. Impaired macrophage function in severe protein-energy malnutrition. *Arch Surg.*, 126(2):192-6, 1991.
131. REEVES PG, NIELSEN FH, FAHEY GC, Jr. AIN-93 porfie 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.*, 123(11):1939–51, 1993.
132. REEVES PG. Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr.*, 127(5):838S–41S, 1997.
133. REHAN VK, SAKURAI R, LI Y, KARADAG A, CORRAL J, BELLUSCI S, XUE YY, BELPERIO J, TORDAY JS. Effects of maternal food restriction on offspring lung extracellular matrix deposition and long term pulmonary function in an experimental rat model. *Pediatr Pulmonol.*, 47(2):162-71, 2012.
134. RENAULD JC, HOUSSIAU F, LOUAHED J, VINK A, VAN SNICK J, UYTENHOVE C. Interleukin-9. *Adv Immunol.*, 54:79-97, 1993.
135. ROBBINS, COTRAN. Bases patológicas das doenças. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
136. RODRIGUES-BARBOSA MC, CARNEIRO CM, DE OLIVEIRA LB. Protein malnutrition modifies medullary neuronal recruitment in response to intermittent stimulation of the baroreflex. *Brain research*, 1483: 2012.
137. ROSENDAAL M, KRENÁCS TT. Regulatory pathways in blood-forming tissue with particular reference to gap junctional communication. *Pathol Oncol Res.*, 6(4):243-9, 2000.
138. ROSENFELD G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e setudos de diversos fatores. *Mem. Inst. Butantan*, 20:315-28, 1947.
139. ROSSI F, MCNAGNY M. Lineage commitment of transformed haematopoietic progenitors is determined by the level of PKC activity. *EMBO J.*, 15(8): 1894-1901, 1996.

140. ROTHAEUSLER K, BAUMGARTH N. Evaluation of intranuclear BrdU detection procedures for use in multicolor flow cytometry. *Cytometr A: J Int Soc Anal Cytol.*, 69:249– 259, 2006.
141. ROZARIO T, DESIMONE DW. The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol (Basel)*, 341:126–140, 2010.
142. SANTOS EW, OLIVEIRA DC, SILVA GB, TSUJITA M, FOCK RA, BORELLI P. Hematological alterations in protein malnutrition. *Nutr Rev.*, 75(11):909-19, 2017.
143. SANTOS EW, OLIVEIRA DC, HASTREITER A, BELTRAN, JSO, ROGERO MM, FOCK RA, BORELLI P. High-fat diet or low-protein diet changes peritoneal macrophages function in mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição*, 41:1-9, 2016.
144. SANTOS EW. Avaliação da função de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e dieta hiperlipídica. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
145. SAVINO W, DARDENNE M, VELLOSO LA. The thymus is a common target in malnutrition and infection. *Brit J Nutr.*, 98(suppl 1):S11–S16, 2007.
146. SCHOFIELD R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*, 4(1-2):7–25, 1978.
147. SERRANO CJ, GRAHAM L. "A new tyrosine phosphorylation site in PLC gamma 1: the role of tyrosine 775 in immune receptor signaling." *J Immunol.*, 174(10): 6233-7, 2005.
148. SIGNER RA, MAGEE JA, SALIC A, MORRISON SJ. Haematopoietic stem cells require a highly regulated protein synthesis rate. *Nature*, 509(7498):49-54, 2014.
149. SILVA GB. Remodelamento da matriz extracelular da medula óssea em desnutrição proteica: possível relação da via de AKT e expressão de fibronectina e metaloproteinases de matriz. Qualificação (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
150. SMITH CMD. Hematopoietic stem cells and hematopoiesis. *Cancer Control*, 10(1):9-16, 2003.
151. SOUZA IP, KANG HC, NARDINELLI L, BORELLI P. Desnutrição proteica: efeito sobre o espraiamento, fagocitose e atividade fungicida de macrófagos peritoniais. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, 37(2):143-51, 2001.

152. SPANGRUDE GJ, HEIMFELD S, WEISSMAN IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 241(4861):58-62. Erratum in: *Science* 1989 Jun 2;244(4908):1030, 1988.
153. SPOONER E, DEXTER TM. Culturing primitive hemopoietic cells. Long-term mouse marrow cultures and the establishment of factor-dependent (FDCP-Mix) hemopoietic cell lines. *Methods Mol Biol.*, 75:209-19, 1997.
154. STAPLETON PP, FUJITA J, MURPHY EM, NAAMA HA, DALY JM. The influence of restricted calorie intake on peritoneal macrophage function. *Nutrition*, 17(1):41-5, 2001.
155. SUGIYAMA A, FUJITA Y, KOBAYASHI TI. Effect of protein malnutrition on the skin epidermis of hairless mice. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 73(6):831-5, 2011.
156. TAICHMAN RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 105(7):2631-9, 2005.
157. TAVASSOLI M, MINGUELL JJ. Homing of hemopoietic progenitor cells to the marrow. *Proc Soc Exp Biol Med.*, 196(4):367-73, 1991.
158. TESHIMA S, ROKUTAN K, TAKAHASHI M, NIKAWA T, KIDO Y, KISHI K. Alteration of the respiratory burst and phagocytosis of macrophages under protein malnutrition. *J Nutr Sci Vitaminol.*, 41(1):127-37, 1995.
159. TILG, H. & MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature*, 6(10):772-83, 2006.
160. TSUJITA M. Participação do nicho endosteal na regulação a hemopoese de camundongos submetidos a desnutrição proteica. Tese de doutorado. 2016. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9136/tde-04052016-110647/pt-br.php>.
161. VITURI CL, ALVAREZ-SILVA M, TRENTIN AG, BORELLI P. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides in vitro no modelo de desnutrição protéica em camundongos [in Portuguese]. *Rev Bras Cienc Farm.*, 44:493–501, 2008.
162. VITURI CL. Efeito da desnutrição proteica sobre a matriz extracelular da medula óssea de camundongos. Tese de Doutorado em Análises Clínicas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Univ. de São Paulo. 2001.
163. VITURI CL, ALVAREZ-SILVA M, TRENTIN AG, BORELLI P. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. *Braz J Med Biol Res.*, 33(8):889–95, 2000.

164. WALKER SA, KUPZIG S, BOUYOUCEF D, DAVIES LC, TSUBOI T, BIVONA TG, COZIER GE, LOCKYER PJ, BUCKLER A, RUTTER GA, ALLEN MJ, PHILIPS MR, CULLEN PJ. Identification of a Ras GTPase-activating protein regulated by receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> oscillations. *EMBO J.*, 23(8):1749-60, 2004.
165. WANG D, FENG J, WEN R, MARINE JC, SANGSTER MY, PARGANAS E, HOFFMEYER A, JACKSON CW, CLEVELAND JL, MURRAY PJ, IHLE JN. Phospholipase Cgamma2 is essential in the functions of B cell and several Fc receptors. *Immunity*, 13(1): 25-35, 2000.
166. WATERLOW JC, ALLEYNE GAO. Protein malnutrition in children: advances in knowledge in the last ten years. *Adv Protein Chem.*, 25:117, 1971.
167. WHO (World Health Organization). 2015. <http://www.who.int/nutgrowthdb/estimates2014>. Accessed 21 Apr 2018.
168. WICKRAMASINGHE SN, AKINYANJU OO, GRANGE A, Ultrastructure and cell cycle distribution of bone marrow cells in protein-energy malnutrition. *Clinical & Laboratory Haematology*, 10:135–47, 1988.
169. WILSON A, TRUMPP A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews. Immunology*, 6(2):93–106, 2006.
170. WOODWARD LJ, MOGRIDGE N, WELLS SW, INDER TE. Can neurobehavioral examination predict the presence of cerebral injury in the very low birth weight infants. *J Dev Behav Pediatr.*, 25(5):326-34, 2004.
171. WU D, REN Z, PAE M, HAN SN, MEYDANI SN. Diet-induced obesity has a differential effect on adipose tissue and macrophage inflammatory responses of young and old mice. *Biofactors*, 39(3):326-33, 2013.
172. WU JY, SCADDEN DT, KRONENBERG HM. Role of the Osteoblast Lineage in the Bone Marrow Hematopoietic Niches. *Journal of Bone and Mineral Research.*, 24(5):759-764, 2009.
173. XAVIER JG, FAVERO ME, VINOLO MAR, et al. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histol Histopathol.*, 22:651–660, 2007.
174. XAVIER JG, FAVERO ME, VINOLO MAR, BORELLI P. Protein-energy malnutrition alters histological and ultrastructural characteristics of the bone marrow and decreases haematopoiesis in adult mice. *Histology and histopathology*, 22, (6):651–660, 2007.
175. YANG YC. Human interleukin-9: a new cytokine in hematopoiesis. *Leuk Lymphoma*, 8:441-447, 1992.

176. YIN T, LI L. The stem cell niches in bone. *J Clin Investig.*, 116(5):1195–201, 2006.
177. ZHANG JA, MORTAZAVI A, WILLIAMS BA, WOLD BJ, ROTHENBERG EV. Dynamic transformations of genome-wide epigenetic marking and transcriptional control establish T cell identity. *Cell*, 149(2):467-482, 2012.
178. ZHANG J, NIU C, YE L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960):836–841, 2003.
179. ZHAO Y, LIN Y, ZHAN Y. Murine hematopoietic stem cell characterization and its regulation in BM transplantation. *Blood*, 96(9):3016-22, 2000.
180. ZHONG JF, ZHAO Y, SUTTON S, SU A, ZHAN Y, ZHU L, YAN C, GALLAHER T, JOHNSTON PB, ANDERSON WF, COOKE MP. Gene expression profile of murine long-term reconstituting vs. short-term reconstituting hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(7):2448–53, 2005.

## 7. ANEXOS

### 7.1 Informações para os membros da banca



**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 arguir 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: [pqfarma@usp.br](mailto:pqfarma@usp.br), (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

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

## 7.2. Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

Ofício CEUA/FCF 712013

### 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 de Pesquisa "**Estudo ex vivo da hemopoese em desnutrição protéica: caracterização do estroma medular e avaliação da participação do cálcio**" (Protocolo CEUA/FCF/419), de responsabilidade do(a) pesquisador(a) **Profa. Dra. Primavera Borelli**, está de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 10 de junho de 2013.

São Paulo, 23 de agosto de 2013.

Assinatura manuscrita em tinta preta, legível como 'Joilson de Oliveira Martins'.

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

## 7.3. Ficha do aluno

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Documento sem validade oficial

### FICHA DO ALUNO

9142 - 3767602/1 - Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBA5899-2/3	Biodisponibilidade de Nutrientes e de Substâncias Bioativas em Alimentos e Dietas	10/03/2014	20/04/2014	90	6	85	A	N	Concluída
BIF5707-3/1	Regulação da Expressão Gênica em Processos Fisiológicos (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	24/04/2014	120	8	100	A	N	Concluída
FBC5792-3/1	Tópicos em Análises Clínicas III	11/03/2014	23/06/2014	15	1	90	A	N	Concluída
FBT5700-3/1	Preparo de Artigos Científicos na Área de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica	03/04/2014	04/06/2014	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5766-4/1	Tópicos em Análises Clínicas IV	05/08/2014	17/11/2014	15	1	100	A	N	Concluída
FBA5751-1/2	Minerais em Nutrição: Distribuição Compartimental e Mecanismos de Regulação de sua Homeostase	07/10/2014	27/10/2014	30	2	100	A	N	Concluída
BIO5749-2/3	Biologia Molecular da Célula-Tronco (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	01/04/2015	09/06/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5734-3/1	Aplicações da Citometria de Fluxo em Modelos Experimentais	03/08/2015	09/08/2015	30	2	100	A	N	Concluída
HNT5708-6/4	Epidemiologia Nutricional (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	09/09/2015	14/10/2015	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5748-4/2	Trabalhos Científicos: da Elaboração à Publicação	05/04/2016	17/05/2016	60	4	75	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	0	20	38
Estágios:			
Total:	0	20	38

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Conceito a partir de 02/01/1997:

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

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

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

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 17/07/2017

Impresso em: 13/12/2017 08:22:57

## 7.4. Currículo lattes

### Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos

- Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6837078110872341>
- Última atualização do currículo em 13/12/2017

---

Doutorando em Fisiopatologia e Toxicologia pela USP, com Mestrado em Análises Clínicas na USP (2013), pós-graduação em Análises Clínicas pela Universidade Santo Amaro (2008), licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Guarulhos (2006) e graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Santo Amaro (2000). Possui experiência de 10 anos como docente, sendo 4 anos no ensino superior na Área de Imunologia, Bioquímica, Citologia, Saúde Coletiva, Epidemiologia e Parasitologia. **(Texto informado pelo autor)**

### Identificação

**Nome** - Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos

**Nome em citações bibliográficas** - SANTOS, E. W. C. O.;SANTOS, E. W.;SANTOS, ED WILSON CAVALCANTE OLIVEIRA;OLIVEIRA SANTOS, ED WILSON CAVALCANTE;SANTOS, ED;SANTOS, ED WILSON;SANTOS, ED W.

### Endereço

#### Endereço Profissional

Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Av. Prof. Lineu Prestes, 580

Cidade Universitaria

05508900 - São Paulo, SP - Brasil

Telefone: (11) 30913639

### Formação acadêmica/titulação

---

#### 2013

Doutorado em andamento em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Avaliação da participação do cálcio e do estabelecimento dos componentes do estroma da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica,

Orientador: Primavera Borelli.

Palavras-chave: hemopoese; cálcio; Desnutrição.

#### 2011 - 2013

Mestrado em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia) (Conceito CAPES 7). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Avaliação comparativa da função de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss submetidos a dieta hipoprotéica ou hiperlipídica, Ano de Obtenção: 2013.

Orientador: Primavera Borelli.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Palavras-chave: desnutrição protéica; Transição nutricional; macrófagos peritoneais; Obesidade.

### **2005 - 2006**

Especialização em Análises Clínicas. (Carga Horária: 460h).

Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil.

Título: Testes diagnósticos de Rhabdovirus.

Orientador: Sandra.

### **2010 - 2011**

Aperfeiçoamento em Hematologia Clínica. (Carga Horária: 300h).

Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

Título: Aperfeiçoamento em Laboratório de Hematologia Clínica. Ano de finalização: 2011.

Orientador: Prof. Dra. Primavera Borelli.

### **2002 - 2006**

Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade de Guarulhos, UNG, Brasil.

Título: Considerações e atualização sobre o design inteligente.

### **1996 - 2000**

Graduação em Medicina Veterinária.

Universidade de Santo Amaro, UNISA, Brasil.

Título: ixodidioses e animais silvestres de cativeiro.

Orientador: antonio fernandes.

## **Formação Complementar**

**2015 – 2015** - 8o Curso de Citometria de Fluxo. (Carga horária: 52h). Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil.

**2015 – 2015** - Biologia Molecular da Célula-Tronco. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, USP, Brasil.

**2014 – 2014** - Regulação da Exp. Gênica em Processos Fisiológicos. (Carga horária: 120h). Universidade de São Paulo.

**2013 – 2013** - Controle Hormonal da Resposta Inflamatória. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo, USP.

**2013 – 2013** - Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese. (Carga horária: 60h). Universidade de São Paulo.

**2012 – 2012** - Fundamentos teóricos em Biologia Molecular. (Carga horária: 20h). Universidade de São Paulo, USP.

**2011 – 2011** - Moléculas e Células da Imunidade Inata. (Carga horária: 30h). Universidade de São Paulo, USP.

**2010 – 2011** - Aperfeiçoamento em Hematologia Clínica. (Carga horária: 300h). Universidade de São Paulo, USP.

## **Atuação Profissional**

### **Universidade de São Paulo, USP, Brasil.**

#### **Vínculo institucional**

**2014 – Atual** - Vínculo: Doutorando -Fisiopatologia USP, Enquadramento Funcional: Doutorando em Fisiopatologia e Toxicologia, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva.

#### **Vínculo institucional**

**2011 – 2013** - Vínculo: Mestrado - Análises Clínicas, Enquadramento Funcional: Aluno de Mestrado - Análises Clínicas.

**Linhas de pesquisa** - Avaliação da participação do cálcio e do estabelecimento dos componentes do estroma da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica

**Vínculo institucional**

**2008 – 2010** - Vínculo: Professor visitante, Enquadramento Funcional: Professor aulista, Carga horária: 38

**Vínculo institucional**

**2017 – Atual** - Vínculo: Professor Visitante, Enquadramento Funcional: Docente, Carga horária: 30

## Linhas de pesquisa

**1.** Avaliação da participação do cálcio e do estabelecimento dos componentes do estroma da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica

## Projetos de pesquisa

**2014 - Atual**

Avaliação da participação do cálcio e do estabelecimento dos componentes do estroma da medula óssea de camundongos submetidos à desnutrição protéica. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos - Coordenador / Graziela Batista da Silva - Integrante / Dalila Cunha de Oliveira - Integrante / Primavera Borelli - Integrante / Ricardo Fock - Integrante / Araceli Hastreiter - Integrante.

**2013 - Atual**

Avaliação da via de sinalização NFkB ativada por TLR4 e TNFRI em camundongos submetidos a dietas hiperlipídicas e readequação alimentar

Descrição: Estudo das alterações de uma dieta hiperlipídica na via de sinalização TLR4 ativada por LPS e TNFRI ativada por TNFa culminando na ativação do fator de transcrição NFkB e de alterações após a readequação alimentar. Situação: Em andamento; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos - Coordenador / Dalila Cunha de Oliveira - Integrante / Araceli Hastreiter - Integrante.

**2011 - 2013**

Avaliação da função de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos à dieta hipoproteica e à dieta hiperlipídica

Descrição: Análise das alterações em resposta imune inata decorrente de dietas desbalanceadas, como deficiência de proteína e excesso de lipídios. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa.

Integrantes: Ed Wilson Cavalcante Oliveira Santos - Coordenador / Dalila Cunha de Oliveira - Integrante Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.

## Idiomas

**Inglês** - Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

**Espanhol** - Compreende Bem, Fala Razoavelmente, Lê Bem, Escreve Razoavelmente.

## Prêmios e títulos

**2015** - 4o Prêmio Pemberton (2o lugar na categoria Pesquisa Clínica), Sociedade Brasil. de Alimentação e Nutrição.

**2013** - Melhor trabalho de pós graduação - Mestrado, XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia - USP.

## Produções

### Produção bibliográfica

#### Artigos completos publicados em periódicos

1. ★ **SANTOS, ED W.**; OLIVEIRA, DALILA C. ; SILVA, GRAZIELA B. ; TSUJITA, MARISTELA ; BELTRAN, JACKELINE O. ; HASTREITER, ARACELI ; FOCK, RICARDO A. ; BORELLI, PRIMAVERA . Hematological alterations in protein malnutrition. NUTRITION REVIEWS **JCR**, v. 1, p. 1-11, 2017.

2. **SANTOS, EW**; OLIVEIRA, DALILA CUNHA DE ; HASTREITER, ARACELI ; SILVA, GRAZIELA BATISTA DA ; BELTRAN, JACKELINE SOARES DE OLIVEIRA ; TSUJITA, MARISTELA ; CRISMA, AMANDA RABELO ; NEVES, SILVÂNIA MEIRY PERIS ; FOCK, RICARDO AMBRÓSIO ; BORELLI, PRIMAVERA . Hematological and biochemical reference values for C57BL/6, Swiss Webster and BALB/c mice. BRAZ J VETERINARY RES. AND ANIMAL SCIENCE, v. 53, p. 138-145, 2016.

3. **SANTOS, ED WILSON**; DE OLIVEIRA, DALILA CUNHA ; HASTREITER, ARACELI ; BELTRAN, JACKELINE SOARES DE OLIVEIRA ; ROGERO, MARCELO MACEDO ; FOCK, RICARDO AMBRÓSIO ; BORELLI, PRIMAVERA . High-fat diet or low-protein diet changes peritoneal macrophages function in mice. Nutrire, v. 41, p. 1-9, 2016.

4. SANTANA, ANDRE BENTO CHAVES ; SOUZA OLIVEIRA, THAIS CRISTINA DE ; BIANCONI, BARBARA LOBO ; BARAUNA, VALERIO GARRONE ; **SANTOS, ED WILSON CAVALCANTE OLIVEIRA** ; ALVES, TATIANA P. ; SILVA, JULIANE CRISTINA S. ; FIORINO, PATRICIA ; BORELLI, PRIMAVERA ; IRIGOYEN, MARIA CLAUDIA COSTA ; KRIEGER, JOSÉ EDUARDO ; LACCHINI, SILVIA . Effect of High-Fat Diet upon Inflammatory Markers and Aortic Stiffening in Mice. BIOMED RES INT **JCR**, v. 2014, p. 1-12, 2014. **Citações:** WEB OF SCIENCE = 2 | SCOPUS 2

5. ★ DE OLIVEIRA, DALILA CUNHA ; HASTREITER, ARACELI APARECIDA ; MELLO, ALEXANDRA SIQUEIRA ; DE OLIVEIRA BELTRAN, JACKELINE SOARES ; **OLIVEIRA SANTOS, ED WILSON CAVALCANTE** ; BORELLI, PRIMAVERA ; FOCK, RICARDO AMBRÓSIO . The effects of protein malnutrition on the TNF-RI and NF-κB expression via the TNF-α signaling pathway. Cytokine **JCR**, v. 69, p. 218-225, 2014. **Citações:** WEB OF SCIENCE = 9 | SCOPUS 12

6. ★ SILVA, GRAZIELA ; TSUJITA, MARISTELA ; **SANTOS, ED** ; BELTRAN, JACKELINE ; BORELLI, PRIMAVERA . Role of AKT/mTOR pathway in fibronectin expression mediated by protein malnutrition. Experimental Hematology, v. 42, p. S60, 2014.

7. HASTREITER, ARACELI ; **SANTOS, ED** ; DOS SANTOS, GUILHERME G. ; MAKIYAMA, EDSON ; BORELLI, PRIMAVERA ; FOCK, RICARDO . Cxcl12 production by bone marrow Nes+ MSCs is downregulated in malnourished mice. Experimental Hematology **JCR**, v. 42, p. S37, 2014.

#### Livros publicados/organizados ou edições

1. **SANTOS, E. W.**. Obesidade e desnutrição - alterações hematológicas. 1. ed. Berlin: Novas Edições Acadêmicas, 2014. v. 1. 117p .

## Textos em jornais de notícias/revistas

1. BELTRAN, J. S. O. ; SILVA, G. B. ; OLIVEIRA, D. C. ; **SANTOS, E. W. C. O.** ; BORELLI, P. . Desnutrição proteica ativa a sinalização da via autofágica regulada por mTOR na medula óssea. In: Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition, São Paulo, p. 60 - 60, 30 ago. 2013.

## Resumos publicados em anais de congressos

1. **SANTOS, E. W.**; OLIVEIRA, D. C. ; HASTREITER, A. ; BELTRAN, J. S. O. ; SILVA, G. B. ; FOCK, R. ; BORELLI, P. . High-Fat Diet Decreases The Activation Of Nuclear Factor-Kb In Mice Peritoneal Macrophages Stimulated With Lipopolysaccharide. In: 6th Annual Symposium of Research in Pharmaceutical Sciences. In: 6th Annual Symposium of Research in Pharmaceutical Sciences, 2014, Sao Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. v. 45. p. 6-6.

2. SILVA, G. B. ; TSUJITA, M. ; **SANTOS, E. W.** ; BELTRAN, J. S. O. ; BORELLI, PRIMAVERA . Role of AKT/mTOR pathway in fibronectin expression mediated by protein malnutrition. In: XIX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences. In: XIX Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2014, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. v. 50. p. 49-49.

3. TEIXEIRA, P. D. S. ; SALES, A. L. C. C. ; LOBO, A. R. ; CARLI, E. ; SA, L. R. M. ; **SANTOS, E. W.** ; PEREIRA, R. M. R. ; BORELLI, P. ; LIMA, F. ; COLLI, C. . Iron Status Of Rats Fed A Magnesium-Restricted High-Fat Diet. In: Xix Semana Farmacêutica De Ciência E Tecnologia/Usp. In: XIX Semana Farmacêutica De Ciência E Tecnologia/Usp, 2014, São Paulo. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. São Paulo: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2014. v. 50. p. 54.

4. **SANTOS, E. W.**; OLIVEIRA, D. C. ; HASTREITER, A. ; SILVA, G. B. ; TSUJITA, MARISTELA ; BELTRAN, J. S. O. ; CRISMA, A. R. ; FOCK, RICARDO ; BORELLI, PRIMAVERA . Valores De Referência De Parâmetros Hematológicos E Bioquímicos De Camundongos Swiss Webster, C57bl/6, Balb/C E Ratos Wistar. In: XXIII Semana Científica Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli (2014), 2014, São Paulo. Anais da XXIII Semana Científica Prof. Dr. Benjamin Eurico Malucelli (2014). São Paulo: Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP, 2014. v. 13. p. 60.

5. **SANTOS, E. W. C. O.**; OLIVEIRA, D. C. ; BELTRAN, J. S. O. ; HASTREITER, A. ; SILVA, G. B. ; TSUJITA, M. ; FOCK, R. ; BORELLI, P. . Efeitos de dietas hipoproteica ou hiperlipídica nos parâmetros hematológicos e imunológicos em modelo murino. In: Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition. In: 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN, 2013, Foz do Iguaçu. 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição-SBAN. São Paulo: Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition, 2013. v. 48. p. 10-10.

6. **SANTOS, E. W. C. O.**; OLIVEIRA, D. C. ; BELTRAN, J. S. O. ; HASTREITER, A. ; SILVA, G. B. ; FOCK, R. ; BORELLI, P. . Effects of low protein or high fat diets in hematological and immunological parameters in murine model. In: XVIII Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences. In: XVIII Pharmaceutical Science and Technology Meeting of the Faculty of Pharmaceutical Sciences, 2013, São Paulo: Braz J Pharmacl Sci., 2013. v. 49. p. 10-10.

7. ★ OLIVEIRA, D. C. ; MELLO, A.S. ; BELTRAN, J. S. O. ; **SANTOS, E. W. C. O.** ; BORELLI, P. ; FOCK, R. . The Influence of Protein Malnutrition on the Expression of TNFRI Receptors and IL-1β; In: 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN). In: 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics (ISNN), 2012, Sao Paulo. Basel: Karger, 2012. v. 5. p. 171-302.

8. OLIVEIRA, D. C. ; **SANTOS, E. W. C. O.** ; BELTRAN, J. S. O. ; MELLO, A.S. ; BORELLI, P. ; FOCK, R. . The protein Malnutrition affects the expression of TNFRI receptors in peritoneal macrophages. In: 41st Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2012, Amsterdam; 40 (Suppl 1): S1-S175., 2012.. In: 41st Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology, 2012, Amsterdam. 41st Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology. Chicago: ISEH Experimental Hematology, 2012. v. 40. p. 12-16.

## Apresentações de Trabalho

1. DIAS, C. ; BELTRAN, J. S. O. ; HASTREITER, A. ; **SANTOS, E. W.** ; PAREDES-GAMERO, E. J. ; FOCK, R. ; BORELLI, P. . PARTICIPAÇÃO DO FRAGMENTO LEP5: (AC-[SER117]-HLEP-116-140-NH2) COMO MODULADOR DA HEMATOPOESE EM DESNUTRIÇÃO PROTEICA. 2017. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
2. **SANTOS, E. W.**; DIAS, C. ; BELTRAN, J. S. O. ; HASTREITER, A. ; OLIVEIRA, D. C. ; SILVA, G. B. ; PAREDES-GAMERO, E. J. ; BORELLI, P. . STUDY OF HEMATOPOIESIS IN PROTEIN RESTRICTION: CHARACTERIZATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS. In: Experimental Biology. 2016. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
3. HASTREITER, A. ; SANTOS, G. G. ; **SANTOS, E. W.** ; MAKIYAMA, EDSON ; BORELLI, P. ; FOCK, RICARDO . BONE MARROW ENDOTHELIAL-LIKE CELLS PRODUCE G-CSF TO MAINTAIN THE HEMATOPOIESIS PROCESS IN PROTEIN-ENERGY MALNUTRITION. In: Eric A. Newsholme Research Symposium. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
4. OLIVEIRA, D. C. ; **SANTOS, E. W.** ; BELTRAN, J. S. O. ; BORELLI, P. ; FOCK, R. . EVALUATION OF GLUTAMINE AS MODULATION OF THE TRANSCRIPTOR FACTOR NF-KB IN MACROPHAGES FROM DIETARY RESTRICTED MICE. In: Eric A. Newsholme Research Symposium. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
5. **SANTOS, E. W.**; DIAS, C. ; OLIVEIRA, D. C. ; SILVA, G. B. ; HASTREITER, A. ; BELTRAN, J. S. O. ; FOCK, RICARDO ; BORELLI, PRIMAVERA . PROTEIN RESTRICTION CHANGES CELLULARITY IN LONG-TERM BONE MARROW CULTURE IN MICE. In: Eric A. Newsholme Research Symposium. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
6. BELTRAN, J. S. O. ; SILVA, G. B. ; OLIVEIRA, D. C. ; HASTREITER, A. ; **SANTOS, E. W.** ; FOCK, R. ; BORELLI, P. . INDUCTION OF AUTOPHAGY BY AKT/mTOR PATHWAY IN THE BONE MARROW DUE TO PROTEIN MALNUTRITION. In: Eric A. Newsholme Research Symposium. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
7. **SANTOS, E. W.**; DIAS, C. ; SILVA, G. B. ; BELTRAN, J. S. O. ; OLIVEIRA, D. C. ; HASTREITER, A. ; FOCK, R. ; BORELLI, P. . PROTEIN RESTRICTION CHANGES STROMAL CELLULARITY IN LONG TERM BONE MARROW CULTURE. In: XXI Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia/USP. 2016. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
8. **SANTOS, E. W.**; NAKAJIMA, K. ; SILVA, G. B. ; OLIVEIRA, D. C. ; FOCK, R. ; BORELLI, P. . SCF, IL-3, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  AND IL-6 PRODUCTION OF THREE DIFFERENT LONG TERM BONE MARROW CULTURES IN PROTEIN MALNUTRITION. In: II Internationa Symposium of Pathophysiology and Toxicology. 2016.
9. OLIVEIRA, D. C. ; **SANTOS, E. W.** ; BELTRAN, JACKELINE ; BORELLI, PRIMAVERA ; FOCK, R. . EVALUATION OF GLUTAMINE AS MODULATION OF THE TRANSCRIPTOR FACTOR NF-KB IN MACROPHAGES FROM MICE SUBJECTED TO DIETARY RESTRICTION. In: 12th World Congress on Inflammation. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
10. HASTREITER, ARACELI ; SANTOS, G. G. ; **SANTOS, E. W.** ; MAKIYAMA, EDSON ; FOCK, RICARDO . BONE MARROW ENDOTHELIAL-LIKE CELLS PRODUCE G-CSF IN ORDER OF MANTAIN HEMATOPOIESIS DURING PROTEIN ENERGY MALNUTRITION STATES. In: 13º Congresso da Sociedade Brasileira de Nutrição e Alimentação. 2015. (Apresentação de Trabalho/Congresso).
11. **SANTOS, E. W.**; DIAS, C. ; OLIVEIRA, D. C. ; HASTREITER, A. ; BELTRAN, J. S. O. ; SILVA, G. B. ; PAREDES-GAMERO, E. J. ; BORELLI, PRIMAVERA . EX VIVO STUDY OF HEMATOPOIESIS IN PROTEIN MALNUTRITION: CHARACTERIZATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS IN MICE. 2015. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
12. **SANTOS, E. W.**; OLIVEIRA, D. C. ; BELTRAN, J. S. O. ; HASTREITER, A. ; FOCK, RICARDO ; BORELLI, PRIMAVERA . AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DIETA HIPOPROTÉICA OU DIETA HIPERLIPÍDICA. In: XXX Reunião Anual da FeSBE. 2015.
13. **SANTOS, E. W.**; OLIVEIRA, D. C. ; SILVA, G. B. ; BELTRAN, J. S. O. ; TSUJITA, M. ; FOCK, R. ; BORELLI, PRIMAVERA . VALORES DE REFERÊNCIA DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, C57BL/6, BALB/C E RATOS WISTAR. In: XXIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli (FMVZ-USP). 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).
14. **SANTOS, E. W.**; OLIVEIRA, D. C. ; HASTREITER, A. ; BELTRAN, J. S. O. ; FOCK, RICARDO AMBRÓSIO ; BORELLI, P. . HIGH-FAT DIET DECREASES THE ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR-KB IN MICE PERITONEAL MACROPHAGES

STIMULATED WITH LIPOPOLYSACCHARIDE. In: XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia/USP. 2014.

(Apresentação de Trabalho/Simpósio).

**15.**SILVA, G. B. ; TSUJITA, M. ; **SANTOS, E. W.** ; BELTRAN, J. S. O. ; BORELLI, P. . ROLE OF AKT/MTOR PATHWAY IN FIBRONECTIN EXPRESSION MEDIATED BY PROTEIN MALNUTRITION. In: XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia/USP. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

**16.**TEIXEIRA, P. D. S. ; SALES, A. L. C. C. ; LOBO, A. R. ; CARLI, E. ; SA, L. R. M. ; **SANTOS, E. W.** ; PEREIRA, R. M. R. ; BORELLI, P. ; LIMA, F. ; COLLI, C. . IRON STATUS OF RATS FED A MAGNESIUM-RESTRICTED HIGH-FAT DIET. In: XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia/USP. 2014. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

**17.****SANTOS, E. W. C. O.**; OLIVEIRA, D. C. ; BELTRAN, J. S. O. ; SILVA, G. B. ; TSUJITA, M. ; HASTREITER, A. ; FOCK, R. ; BORELLI, P. . EFEITOS DE DIETAS HIPOPROTEICA OU HIPERLIPIDICA NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS EM MODELO MURINO. In: 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. Foz do Iguaçu. Brasil. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**18.**OLIVEIRA, D. C. ; **SANTOS, E. W. C. O.** ; BELTRAN, J. S. O. ; MELLO, A.S. ; BORELLI, P. ; FOCK, R. . EXPRESSÃO DO RECEPTOR DE TNF E SUA ASSOCIAÇÃO COM A PRODUÇÃO DE IL-1 $\beta$  POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS À DESNUTRIÇÃO PROTEICA. In: 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. Foz do Iguaçu. Brasil. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**19.**BELTRAN, J. S. O. ; SILVA, G. B. ; OLIVEIRA, D. C. ; **SANTOS, E. W.** ; BORELLI, P. . DESNUTRIÇÃO PROTEICA ATIVA A SINALIZAÇÃO DA VIA AUTOFÁGICA REGULADA POR mTOR NA MEDULA ÓSSEA. In: 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. Foz do Iguaçu. Brasil. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**20.**HASTREITER, A. ; **SANTOS, E. W. C. O.** ; BORELLI, P. ; FOCK, R. . PARTICIPAÇÃO DO NICHOS PERIVASCULAR MEDULAR NO COMPROMETIMENTO DA HEMATOPOESE EM DESNUTRIÇÃO PROTEICA. In: 12º Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição. Foz do Iguaçu - Paraná. 2013. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**21.****SANTOS, E. W. C. O.**; OLIVEIRA, D. C. ; HASTREITER, A. ; BELTRAN, J. S. O. ; SILVA, G. B. ; FOCK, R. ; BORELLI, P. . EFFECTS OF HIGH FAT AND LOW PROTEIN DIETS IN HEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN A MURINE MODEL. In: Simpósio anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas, XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013, São Paulo. Simpósio anual de Pesquisas em Ciências Farmacêuticas XVIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia, 2013.. 2013. (Apresentação de Trabalho/Seminário).

**22.**TEIXEIRA, P. D. S. ; SALES, A. L. C. C. ; LOBO, A. R. ; DECARLI, E. ; **SANTOS, E. W. C. O.** ; BORELLI, P. ; PEREIRA, R. M. R. ; LIMA, F. ; COLLI, C. . DIETARY MAGNESIUM RESTRICTION IN RATS FED A HIGH-FAT DIET: ERYTHROCYTE FRAGILITY ACCOUNTS FOR LOWER SPLEEN IRON. In: 10. Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos - SLACA. 2013. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

**23.**BELTRAN, J. S. O. ; SILVA, G. B. ; OLIVEIRA, D. C. ; BORELLI, P. ; **SANTOS, E. W. C. O.** . EFFECT OF PROTEIN MALNUTRITION IN THE MECHANISMS OF APOPTOSIS, NECROSIS AND AUTOPHAGY IN MARROW HYPOPLASIA. In: 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held at Riocentro Exhibition and Convention Center, 2012, Rio de Janeiro. 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**24.**OLIVEIRA, D. C. ; MELLO, A.S. ; **SANTOS, E. W. C. O.** ; BORELLI, P. . THE PROTEIN MALNUTRITION AFFECTS THE EXPRESSION OF TNF RECEPTORS ON PERITONEAL MACROPHAGES. In: 41st Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2012, 2012, Amsterdam. 41st Annual Scientific Meeting/Experimental Hematology 2012; 40 (Suppl 1): S1-S175., 2012.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

**25.**OLIVEIRA, D. C. ; BELTRAN, J. S. O. ; **SANTOS, E. W. C. O.** ; BORELLI, P. ; FOCK, R. . INFLUENCE OF PROTEIN MALNUTRITION ON THE IL-1 $\beta$  PRODUCTION BY MACROPHAGES STIMULATED WITH TNF- $\alpha$ . In: 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held at Riocentro Exhibition and Convention Center, 2012, Rio de Janeiro.. 2012. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

## Eventos

### Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. Eric A. Newsholme Research Symposium. STUDY OF HEMATOPOIESIS IN PROTEIN RESTRICTION: CHARACTERIZATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS. 2016. (Congresso).
2. Experimental Biology - San Diego, USA. STUDY OF HEMATOPOIESIS IN PROTEIN RESTRICTION: CHARACTERIZATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS. 2016. (Congresso).
3. FEBRACE Feira Brasileira de Ciências e Engenharia. Avaliadora dos trabalhos relacionados a Ciências Exatas e da Terra, Ciências Biológicas e Ciências da Saúde. 2. Avaliador de trabalhos. 2016. (Feira).
4. II International Symposium on Pathophysiology and Toxicology. SCF, IL-3, GM-CSF, TNF $\alpha$ , IL-1b AND IL-6 PRODUCTION OF THREE DIFFERENT LONG TERM BONE MARROW CULTURES IN PROTEIN MALNUTRITION. In: II International Symposium of Pathophysiology and Toxicology. 2016. (Simpósio).
5. 13º Congresso da Sociedade Brasileira de Nutrição e Alimentação. BONE MARROW ENDOTHELIAL-LIKE CELLS PRODUCE G-CSF IN ORDER OF MANTAIN HEMATOPOIESIS DURING PROTEIN ENERGY MALNUTRITION STATES.. 2015.
6. XXIV Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli (FMVZ-USP). EX VIVO STUDY OF HEMATOPOIESIS IN PROTEIN MALNUTRITION: CHARACTERIZATION OF BONE MARROW STROMAL CELLS IN MICE. 2015. (Simpósio).
7. XXX Reunião Anual da FeSBE. Avaliação da função de macrófagos peritoniais de camundongos submetidos à dieta hipoprotéica ou dieta hiperlipídica. 2015. (Congresso).
8. XIX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da Universidade de São Paulo. HIGH-FAT DIET DECREASES THE ACTIVATION OF NUCLEAR FACTOR-KB IN MICE PERITONEAL MACROPHAGES STIMULATED WITH LIPOPOLYSACCHARIDE. 2014. (Simpósio).
9. XXIII Semana Científica Benjamin Eurico Malucelli (FMVZ-USP). VALORES DE REFERÊNCIA DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DE CAMUNDONGOS SWISS WEBSTER, C57BL/6, BALB/C E RATOS WISTAR. 2014.
10. 12º Congresso da Sociedade Brasileira de Nutrição. Foz do Iguaçu. Brasil. EFEITOS DE DIETAS HIPOPROTÉICA OU HIPERLIPIDICA NOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS EM MODELO MURINO. 2013.
12. VIII Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia USP. EFFECTS OF HIGH FAT AND LOW PROTEI DIETS IN HEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN A MURINE MODEL. 2013. (Simpósio).
13. V Simpósio de Pós Graduação em Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. AVALIAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO NFkB ATIVADA PELO TNF $\alpha$  EM UM MODELO DE CARÊNCIA PROTÉICA. 2013.
14. 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics/Nutrigenomics. The protein malnutrition affects the expression of TNFR1 receptor and IL-1b production in peritoneal macrophages. 2012. (Congresso).
15. ISEH Society for Hematology and Stem Cells 41st Annual Scientific Meeting - Amsterdam - Holanda. The protein malnutrition affects the expression of TNFR1 receptors on peritoneal macrophages. 2012. (Congresso).
16. IV Simpósio de Pós Graduação em Análises Clínicas - USP. 2012. (Simpósio).
17. Redox Regulation and Inflammation - ICB/USP. 2012. (Outra).
18. Seminários da Comissão de Pesquisa USP - Insulina e Inflamação. 2012. (Seminário).
19. Simpósio de Imunologia - FCF/USP. 2012. (Simpósio).
20. VIII Symposium of Lipids and Health - USP - São Paulo. 2012. (Simpósio).
21. Conferências USP "Challenge for Integrating Molecular and System Biology". 2011. (Simpósio).
22. X Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos e Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa - FCF/USP. 2011. (Simpósio).
23. I Seminário de Ética em Experimentação Animal - UNESP. 2009. (Seminário).

### Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

1. SANTOS, E. W. C. O.. V Simposio da Pós Graduação em Análises Clínicas. 2013. (Outro).