

## Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides *in vitro* no modelo de desnutrição protéica em camundongos

Cidônia de Lourdes Vituri<sup>1\*</sup>, Márcio Alvarez-Silva<sup>2</sup>, Andréa Gonçalves Trentin<sup>2</sup>, Primavera Borelli<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina,

<sup>2</sup>Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina,

<sup>3</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

*Este trabalho tem por objetivo verificar se a matriz extracelular (MEC) obtida da medula óssea de camundongos com desnutrição protéica energética sustenta a sobrevivência, se induz proliferação de células mielóides, bem como avaliar a capacidade desta MEC de interagir com citocinas hematopoiéticas in vitro. Camundongos machos "Swiss" foram submetidos à desnutrição protéica (4% de caseína) até que perdessem 20% do peso inicial e o grupo-controle foi mantido com uma dieta contendo 14% de caseína. A medula óssea foi extraída com tampão PBS suplementado com 1 mg de aprotinina/mL. Os ensaios de proliferação foram realizados com a linhagem mielóide FDC-P1, pelo método colorimétrico de redução do MTT. A MEC obtida tanto do grupo-controle como do desnutrido induziu proliferação celular in vitro. Os ensaios de interação foram realizados com IL-3 e GM-CSF na concentração de 10 pg e 500 pg/mL, que demonstraram efeito sinérgico e efeito regulatório, respectivamente. A MEC obtida de animais do grupo desnutrido quando submetida ao ensaio de ligação ao GM-CSF mostrou maior proliferação celular do que a MEC obtida de animais do grupo-controle ( $p < 0,05$ ). Estes resultados sugerem que, provavelmente, as alterações na composição da MEC da medula óssea promovida pela desnutrição possam levar a modificações na modulação da atividade de GM-CSF.*

### Unitermos

- Desnutrição protéica energética/estudo experimental
- Matriz extracelular
- Hematopoiese
- Medula óssea
- Células mielóides/proliferação

\*Correspondência:

C. L. Vituri

Departamento de Análises Clínicas

Centro de Ciências da Saúde - CCS

Universidade Federal de Santa

Catarina

88010-970 - Florianópolis - SC, Brasil

E-mail: cids@ccs.ufsc.br

## INTRODUÇÃO

A matriz extracelular (MEC) pode ser definida como a organização supramolecular de diversas proteínas estru-

turais e polissacarídeos, compreendendo colágenos, glicoproteínas não-colagênicas, proteoglicanos (PGs), glicosaminoglicanos (GAGs), elastina e ácido hialurônico (Scott, 1992; Schuppan, Rühl, 1994), que preenchem os

espaços extracelulares, dando suporte aos tecidos. A MEC da medula óssea é produzida pelas células do estroma hematopoietico, principalmente os fibroblastos, que depositam e distribuem as moléculas da MEC em um emaranhado organizado em íntima associação com a superfície da célula que a produziu (Alberts *et al.*, 2002; Nardi, Afonso, 1999). Já foi demonstrado que os componentes da MEC podem controlar eventos como adesão celular, migração e proliferação de diferentes células (Klein, 1995).

As glicoproteínas não-colagênicas mais estudadas são a fibronectina, que está relacionada principalmente com os fenômenos de adesão, e a laminina, que também atua na adesão celular (Klein, 1995), mas promove preferencialmente a migração celular (Gu *et al.*, 2003), conseqüentemente interferindo na proliferação, diferenciação e liberação das células para a corrente circulatória.

As moléculas da MEC interagem com fatores de crescimento hematopoieticos. Uma importante função dos proteoglicanos da medula óssea pode ser a de compartimentalizar as citocinas produzidas localmente pelas células do estroma, “apresentando-as” sob forma biologicamente ativa para as células progenitoras hematopoieticas (Keating, Gordon, 1988; Jin-Xiang *et al.*, 2004).

O modelo de desnutrição protéica energética adotado pelo grupo tem mostrado comprometimento importante no sistema hematopoietico. Borelli *et al.* (1995) mostraram modificações linfo-hematopoieticas, tais como hipoplasia da medula óssea, além de retardo na mobilização de células inflamatórias. Xavier (1999) encontrou em camundongos desnutridos espessamento da MEC esplênica, devido ao aumento de colágeno, elastina e fibronectina. Na medula óssea, foram observadas alterações arquiteturais com degeneração gelatinosa (Xavier, 1999) e, ainda alterações nas moléculas da MEC, como laminina e fibronectina, neste mesmo modelo (Vituri *et al.*, 2000).

Este trabalho objetiva verificar se a MEC obtida da medula óssea de camundongos com desnutrição protéica energética sustenta a sobrevivência, se induz a proliferação de células mielóides FDC-P1, bem como avaliar a capacidade desta MEC de interagir com fatores de crescimento hematopoieticos *in vitro*. Para tal utilizamos preparações isoladas de MEC obtida de camundongos nutridos (grupo-controle) e de desnutridos como substrato para indução da proliferação celular.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Rações

Como fonte protéica das rações, optamos pela caseína (IKAB Chemical B.V. Germany), por ser conside-

rada a fonte mais completa pela variedade de aminoácidos presentes e pela facilidade de absorção (AIN93). A ração com 14% de proteína foi considerada como basal e destinada a alimentar os animais do grupo-controle (AIN93) e a ração hipoprotéica, com 4% de proteína (Muñoz, 1981), foi destinada ao grupo-desnutrido. A mistura salínica e a mistura vitamínica utilizadas foram recomendadas pela AIN93 (Reeves *et al.*, 1993).

### Indução da desnutrição

Utilizamos camundongos Swiss não isogênicos, machos com idade entre dois a dois meses e meio, oriundos do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, cujo projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais, desta Universidade, sob o n.º. 022/CEUA/DAP/PRPG.

Os animais passaram por um período de adaptação ao isolamento e à ração experimental e nesta fase os dois grupos receberam a ração controle durante aproximadamente 15 dias. Após este período de adaptação, os animais foram então separados em dois grupos: nutrido ou controle (C), que recebeu ração com 14% de proteínas; e o desnutrido (D), alimentado com ração com 4% de proteínas. O peso dos animais e o consumo de ração foram monitorados a cada 48 horas, durante todo o experimento. Os dois grupos permaneceram sob as mesmas condições ambientais (temperatura de 20 °C e ciclo de luz de 12 horas claro/escuro), recebendo água e as respectivas rações *ad libitum*. A avaliação do estado nutricional dos animais foi feita através da determinação do peso corporal, do consumo de ração, determinação das concentrações de proteína e de albumina plasmáticas.

A coleta das amostras foi realizada após perda de 20% do peso inicial corporal dos animais do grupo desnutrido (aproximadamente após 15 dias de dieta hipoprotéica).

As amostras de sangue dos camundongos, previamente anestesiados com éter etílico, foram obtidas através de punção cardíaca, utilizando-se heparina (Liquemine®) 50 UI/mL como anticoagulante. A determinação das proteínas plasmáticas foi realizada pelo método do Biureto (Gornall *et al.*, 1949) e a albumina por meio do corante verde de bromo cresol e as leituras realizadas em Cobas Mira (Roche Diagnostic Systems).

### Obtenção da matriz extracelular (MEC)

Utilizamos na extração da MEC 20 µL de tampão PBS a 4 °C (Peters *et al.*, 1995), acrescido de aprotinina 1 mg/mL (Sigma®) por fêmur. As preparações foram

centrifugadas a 2.500g por 15 minutos (4 °C), recolhendo-se o sobrenadante com proteínas solúveis da MEC. Uma vez que a medula óssea presente em camundongos é relativamente pequena, constituímos um “pool” com os sobrenadantes obtidos de grupos de cinco animais. Os sobrenadantes foram acondicionados em tubos plásticos (tipo ependorff) e mantidos em freezer a -20 °C até o momento do uso. É importante salientar que o material foi colhido em ambiente asséptico, no fluxo laminar.

### Cultura de células

A linhagem celular FDC-P1 (ATCC, CRL12103, linhagem mielóide murina- que corresponde a um progenitor mielóide) utilizada neste trabalho foi obtida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas *in vitro*, em número de  $5,0 \times 10^5$  células/mL em garrafas de cultura (Costar, Cambridge, MA), com meio Dulbecco's de alta concentração de glicose, contendo glutamina (DMEM, Sigma, ST Louis, MO), tamponado com 2 g/L de HEPES e suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cutilab, Brasil). Sendo a FDC-P1 dependente de citocinas, a linhagem foi mantida com 10% de meio condicionado da linhagem celular WEHI-3B como fonte de IL-3. As células foram incubadas a 37 °C e em atmosfera úmida, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Durante o cultivo celular para executar o experimento, as células tiveram no máximo três passagens. Previamente foi realizada uma curva para avaliar a dose-resposta das citocinas recombinantes utilizadas, a Interleucina-3 (IL-3) e o fator estimulador de colônias de grânulo-monocítica (GM-CSF). A maior resposta obtida, de 500 pg/mL, e a menor concentração capaz de induzir proliferação foi 10 pg/mL (consideramos subdose) para as duas citocinas.

### Ensaio para avaliar a capacidade da MEC da medula óssea sustentar a proliferação e a sobrevivência celular *in vitro*

Placas de 96 poços (NUNC™) foram pré-incubadas com MEC obtida da medula óssea do grupo-controle e do desnutrido em concentrações que variaram de 0,5 a 5 mg em cada poço e mantidas durante 12 horas a 4 °C. Os poços foram então lavados com PBS (pH 7,4) e adicionaram-se  $2,0 \times 10^4$  células viáveis da linhagem FDC-P1 em cada poço. Todo experimento foi realizado em condições assépticas. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C e em atmosfera úmida, com 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Após esse período, a proliferação celular foi avaliada pelo método de MTT. O ensaio colorimétrico do MTT tem como princípio a redução do sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-

2,5-difenil bromo tetrazólio, Sigma®) pela desidrogenase mitocondrial das células vivas, para um produto de reação MTT-formazana de cor azul escuro. No controle positivo do experimento, utilizamos  $2,0 \times 10^4$  células/poço na presença de 500 pg/mL de IL-3 (RD Systems de camundongo) e, no controle negativo, utilizamos  $2,0 \times 10^4$  células/poço na ausência de citocinas e MEC. A proliferação celular foi expressa em termos de absorbância. Os testes foram realizados em quadruplicata.

### Ensaio de interação dos fatores de crescimento com a MEC

Placas de 96 poços (NUNC™) foram pré-incubadas com MEC obtida da medula óssea dos animais do grupo-controle e do desnutrido na concentração de 1mg em cada poço e mantidas durante 12 horas a 4 °C. Os poços foram então lavados com PBS (pH 7,4) e, posteriormente, adicionamos  $2,0 \times 10^4$  células da linhagem FDC-P1 viáveis em cada poço. Todo experimento foi realizado em condições assépticas. A seguir, foi acrescentado GM-CSF ou IL-3 nas concentrações de 10 ou 500 pg/poço. As condições de cultivo e a avaliação da proliferação celular seguiram o experimento anterior. No controle positivo do experimento, utilizamos  $2,0 \times 10^4$  células/poço na presença de 500 pg/ml de IL-3 e/ou GM-CSF (RD Systems de camundongo), e, no controle negativo, utilizamos  $2,0 \times 10^4$  células/poço na ausência de citocinas e MEC. A proliferação celular foi expressa em termos de absorbância. Os testes foram realizados em quadruplicata.

### Ensaio para avaliar a capacidade de ligação da MEC a fatores de crescimento

A MEC obtida da medula óssea do grupo-controle e do desnutrido foi pré-incubada na placa de 96 poços, na concentração de 1mg em cada poço durante 12 horas a 4 °C, com objetivo de formar um filme no fundo do poço. Após este período de adesão da MEC sobre a placa, esta foi lavada três vezes com PBS. Em seguida, adicionamos 500 pg/mL de GM-CSF ou IL-3 (RD Systems, de camundongo) sobre a MEC. Incubamos durante 2 horas a 37 °C. As placas foram então lavadas e adicionamos  $2,5 \times 10^4$  células em cada poço. As condições de cultivo e a avaliação da proliferação celular seguiram o experimento anterior. No controle positivo do experimento, utilizamos  $2,0 \times 10^4$  células/poço na presença de 500 pg/mL de IL-3 (RD Systems de camundongo) e, no controle negativo, utilizamos  $2,0 \times 10^4$  células/poço na ausência de citocinas e MEC. A proliferação celular foi expressa em termos de absorbância. Os testes foram realizados em quadruplicata.

## Análise estatística

Para análise estatística, utilizamos o teste não paramétrico Mann-Whitney, através do Programa INSTAT-2. Foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

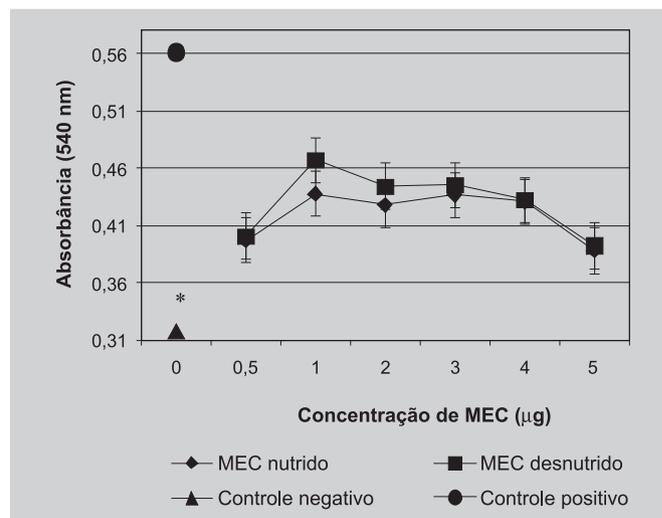
### Peso corpóreo

Os animais submetidos à dieta hipoprotéica apresentaram acentuada redução no consumo de ração (Tabela I). Esta situação é previsível, uma vez que alterações plasmáticas de aminoácidos de cadeia ramificada parecem influenciar o centro da fome, induzindo à anorexia. A redução na ingestão de alimentos pode derivar também de transtornos hipotalâmicos, determinados por lesões locais, e de distúrbios psicogênicos, como o identificado na anorexia nervosa (Waterlow, 1996). Esse comportamento em relação à redução na ingestão da ração hipoprotéica é uma resposta que vem se repetindo, nos inúmeros processos de desnutrição realizados em outros projetos do grupo (Borelli *et al.*, 1995; Xavier, 1999; Borsato, 1999; Vituri *et al.*, 2000). Esse comportamento induziu a uma desnutrição protéica energética no final do experimento. Portanto, os animais desnutridos apresentaram significativa perda de peso corpóreo (cerca de 25%), enquanto que os do grupo-controle praticamente mantiveram seu peso (Tabela I).

### Avaliação *in vitro* da capacidade da MEC de sustentar a sobrevivência e de induzir a proliferação de células FDC-P1

Verificamos que as proteínas da MEC provenientes tanto do grupo-controle como do grupo de desnutridos, na ausência de citocinas, promoveram proliferação e/ou sobrevivência de células FDC-P1. Não houve diferenças significativas entre os grupos. Este padrão se reproduziu em todas as concentrações analisadas. No entanto, verificamos que as proteínas da MEC em concentrações menores foram mais eficientes em promover proliferação. Interessante observar que a presença de proteínas

da MEC, independentemente do grupo de animal, modificou sensivelmente a sobrevida celular, visto que as células cultivadas diretamente sobre a placa (controle negativo) não sobreviveram. Obtivemos uma amostra biologicamente ativa, capaz de favorecer a sobrevida de células mielóides *in vitro* (Figura 1).



**FIGURA 1** – Resultados em valor médio  $\pm$  DP do ensaio de MTT com a célula FDC-P1, realizado sobre a MEC da medula óssea fixada ao substrato plástico (poliestireno). MEC nutrido:  $2,0 \times 10^4$  células/poço plaqueadas sobre a MEC de camundongos do grupo-controle. MEC desnutrido:  $2,0 \times 10^4$  células/poço plaqueadas sobre a MEC de camundongos desnutridos. Controle positivo:  $2,0 \times 10^4$  células/poço e 500 pg/mL de IL-3. Controle negativo:  $2,0 \times 10^4$  células/poço na ausência de MEC e citocina. As amostras foram processadas em quadruplicata, tendo sido realizados quatro experimentos independentes.

\* Diferença significativa ( $p < 0,0001$ , teste de Mann-Whitney) entre a absorbância obtida do controle negativo e dos testes MEC nutrido e MEC desnutrido.

### Avaliação da interação da MEC com fatores de crescimento

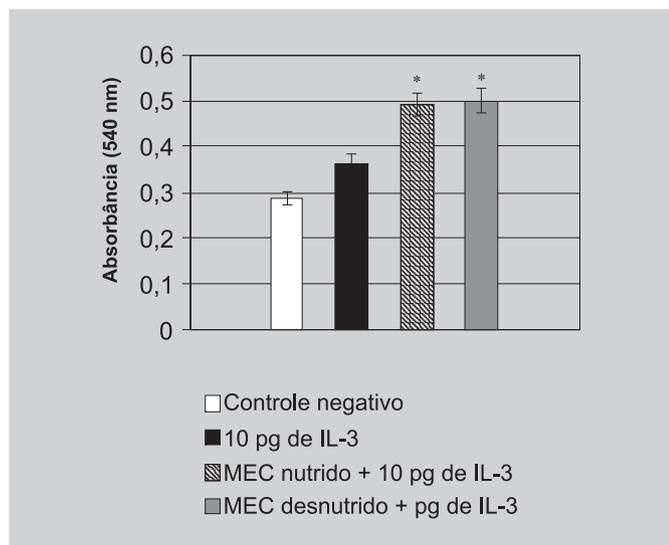
As amostras incubadas com 10  $\mu$ g/mL de IL-3 na ausência de MEC apresentaram proliferação celular signi-

**Tabela I**- Efeito da desnutrição protéica sobre o consumo alimentar, peso corpóreo, proteína e albumina plasmática em camundongos Swiss

Grupo	No. de Animais	Consumo de ração g/dia/animal *	Variação do peso corpóreo inicial % *	Proteína g/dL *	Albumina g/dL *
Controle	64	3,95 $\pm$ 0,40	02,95 $\pm$ 0,40	5,95 $\pm$ 0,40	3,10 $\pm$ 0,42
Desnutrido	69	2,55 $\pm$ 0,80	25,95 $\pm$ 1,97	4,42 $\pm$ 1,17	2,14 $\pm$ 0,82

\* Diferenças significativas ( $p < 0,05$ , teste de Mann-Whitney) entre os grupos.

ficativamente inferior às que foram incubadas com a citocina associada à MEC,  $p < 0,05$ , tanto dos animais nutridos como dos desnutridos. No entanto, não houve diferença entre os grupos (Figura 2). Este ensaio demonstra, assim, um provável efeito sinérgico da MEC com a citocina em relação à proliferação celular.



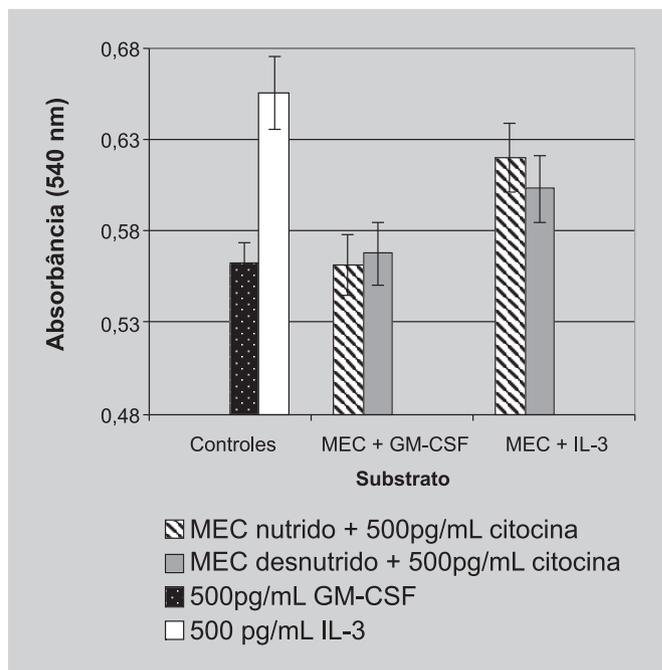
**FIGURA 2** - Resultados médios  $\pm$  DP do ensaio de proliferação da célula FDC-P1 ( $2,0 \times 10^4$  células/poço), pelo teste do MTT, realizado com MEC da medula óssea, associado a 10 pg/mL de IL-3. Experimento realizado com 1 mg MEC proveniente do grupo-controle (MEC nutrido) e de desnutridos (MEC desnutrido). No controle negativo, as células foram incubadas na ausência de MEC e citocinas. As amostras foram processadas em quadruplicata.

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ , teste de Mann-Whitney) para comparações com células cultivadas na presença de 10 pg de IL-3, na ausência de MEC.

A proliferação da célula FDC-P1 sobre 1 mg de MEC associada a 500 pg/mL de GM-CSF e 500 pg de IL-3/mL (Figura 3) não apresentou diferenças significantes. Nestes experimentos, incubamos alternativamente FDC-P1 com 500 pg/mL de GM-CSF ou IL-3, na ausência de MEC. Interessantemente, as citocinas incubadas com a MEC não aumentaram a resposta, inclusive diminuíram discretamente a proliferação (Figura 3), demonstrando, assim, um provável efeito regulatório da MEC.

### Avaliação da capacidade de ligação da MEC a fatores de crescimento

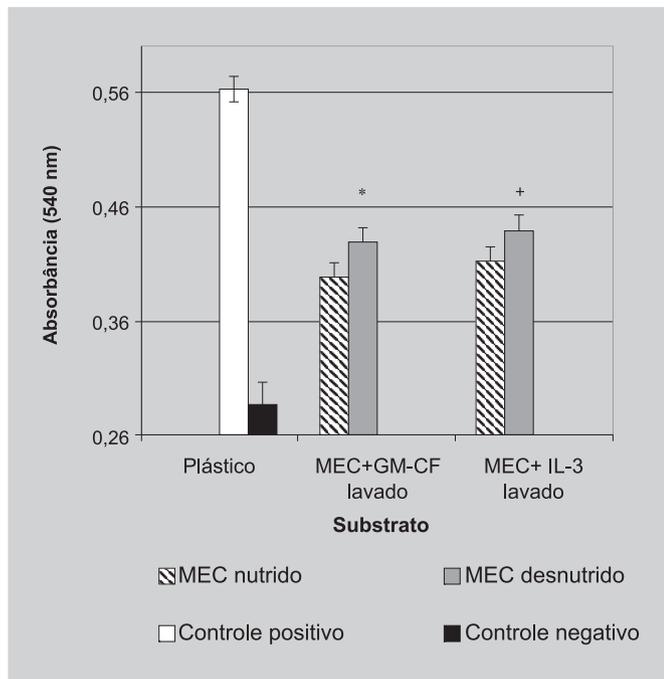
Para avaliar a ligação das citocinas com a MEC, pré-incubamos a MEC da medula óssea tanto de animais nutridos como de desnutridos com 500 pg/mL de IL-3 ou GM-



**FIGURA 3** - Resultados médios  $\pm$  DP do ensaio de proliferação da célula FDC-P1 ( $2,0 \times 10^4$  células/poço), pelo teste do MTT, realizado com 1 mg MEC da medula óssea, associado a 500 pg/mL de citocinas (dose máxima). Experimento realizado com MEC fixa no substrato plástico, proveniente do grupo-controle (MEC nutrido) e do desnutrido (MEC desnutrido), na presença de IL-3 ou GM-CSF. No controle positivo, as células foram incubadas apenas na presença de IL-3 ou GM-CSF. As amostras foram processadas em quadruplicata, em dois experimentos independentes. As diferenças não foram significativas pelo teste de Mann-Whitney.

CSF e, após a incubação de 2 horas a 37 °C, a preparação foi lavada para retirar as citocinas não ligadas à MEC. Os resultados (Figura 4) mostram que a sobrevivência e/ou proliferação da célula FDC-P1 foi significativamente superior nas amostras incubadas com MEC do animal desnutrido pré-incubadas com GM-CSF, quando comparadas com a MEC obtida do animal nutrido. Em relação ao IL-3, a proliferação não diferiu entre os grupos (Figura 4).

A MEC funciona não somente como suporte estrutural para as células e tecidos, mas também parece exercer importante papel na modulação celular, na presença de fatores de crescimento, hormônios e vitaminas (Klein, 1995). Considerando evidências experimentais anteriores sobre a influência da MEC do estroma medular nos fenômenos de proliferação da célula sanguínea (Campbell *et al.*, 1985), direcionamos esta pesquisa ao modelo de desnutrição protéica, porque os estudos prévios realizados pelo grupo demonstraram alterações na mobilização de



**FIGURA 4** - Resultados médios do ensaio de proliferação da célula FDC-P1 ( $2,0 \times 10^4$  células/poço), pelo teste do MTT. Ensaio de ligação da citocina na MEC, que foi realizado sobre um substrato constituído de 1 mg de MEC obtida de medula óssea do grupo-controle (MEC nutrido) e do desnutrido (MEC desnutrido), pré-incubadas com 500 pg/mL de GM-CSF ou IL-3. Após incubação, a MEC foi lavada com PBS e utilizada como substrato para proliferação celular. No controle positivo, as células foram incubadas apenas na presença de IL-3 e, no controle negativo, as células foram incubadas na ausência de MEC e citocinas. As amostras foram processadas em quadruplicata, em dois experimentos independentes.

\* Diferença significativa ( $p < 0,05$ , teste de Mann-Whitney) entre o grupo-controle e desnutrido.

+  $p = 0,0650$ , teste de Mann-Whitney, comparações entre o grupo-controle e desnutrido.

fagócitos diante de implantes de lamínulas, associado à intensa leucopenia após desnutrição experimental (Borelli *et al.*, 1995).

A proliferação da célula mielóide, FDCP-1, cultivada sobre a MEC obtida da medula óssea do animal desnutrido não sofreu modificação em comparação ao controle. No entanto, a presença da MEC favoreceu a proliferação, conforme experimento apresentado na Figura 1.

Campbell *et al.* (1985) demonstraram que células de estroma medular incubadas em placas previamente recobertas com uma preparação obtida da MEC da medula óssea foram capazes de se organizar rapidamente na cultu-

ra, bem como no estroma organizado, observaram um estímulo na proliferação de células hematopoiéticas, cerca de oito vezes superior aos controles colocados diretamente sobre a superfície plástica da cultura. Em nosso estudo, avaliamos o produto deste estroma que foi biologicamente ativo, demonstrando que o cultivo suplementado com as moléculas solúveis obtidas do tecido foi essencial para a sobrevivência da célula *in vitro*.

Atualmente, existem estudos que demonstram que a injeção simultânea de célula hematopoiética e célula estromal da medula óssea em transplantes aceleram a hematopoiese *in vivo* (Zhang *et al.*, 2004). Estas observações são fundamentais para a compreensão da importância de um estroma intacto para a fixação da célula na medula óssea.

Ainda, considerando o experimento apresentado na Figura 1, o estímulo da célula pela MEC não foi diretamente proporcional à sua concentração, tanto na MEC do animal-controle como na do desnutrido. A medula óssea contém várias substâncias que favorecem a proliferação celular, representada pelos fatores de crescimento e moléculas da MEC, como também por inibidores da hematopoiese como interferona gama e prostaglandina E, entre outros, proporcionando um equilíbrio dinâmico na taxa de proliferação, diferenciação e plasticidade (Lichtman *et al.*, 2006). O método de extração que foi utilizado neste trabalho, conforme descrito por Peters *et al.* (1995), tendo como solução extratora o tampão fosfato, permitiu a obtenção de outras substâncias, além das moléculas solúveis da MEC, tais como citocinas, e, provavelmente inibidores da hematopoiese, o que pode ter ocasionado a resposta mais eficaz nas concentrações mais baixas.

Avaliamos, também, a capacidade da MEC de interagir com os fatores de crescimento por meio da célula FDC-P1. Selecionamos dois fatores fundamentais para linhagem mielóide: IL-3, que atua em precursores mais primitivos, e o GM-CSF, que age em estágios mais avançados na escala de diferenciação, *in vivo*, no microambiente medular (Arai *et al.*, 1990). Primeiramente, testamos a capacidade da MEC de atuar de maneira sinérgica com as citocinas. Neste experimento também não observamos diferenças entre as amostras obtidas dos grupos-controle e dos desnutridos. No entanto, este experimento nos permitiu observar que, quando avaliamos o efeito da MEC em associação com 10 pg/mL de IL-3, a proliferação da célula FDC-P1 foi significativamente superior à obtida na presença apenas de 10 pg/mL de IL-3. Por outro lado, quando incubamos altas concentrações de IL-3 (500 pg/mL), a presença da MEC não aumentou a proliferação; ao contrário, foi inferior, provavelmente regulando expansão celular. Estes resultados coadunam com os dados da literatura

sobre a capacidade da MEC tanto em potencializar a proliferação celular como em regular a hematopoiese (Streuli, 1999; Gu *et al.*, 2003).

A célula hematopoiética adere à MEC por meio das integrinas (Schwarzbauer, Sechler, 1999). As integrinas, além de atuarem na adesão e ligação ao citoesqueleto e à MEC, são capazes de transdução de sinais como a fosforilação de tirosina de proteínas citoplasmáticas, e podem ainda modular os efeitos dos fatores de crescimento (Schuppan, Rühl, 1994). Possivelmente a MEC se liga à IL-3 e ao GM-CSF, regulando assim sua atividade biológica.

Pouco se sabe sobre o que acontece com a MEC da medula óssea na desnutrição; contudo, existem alguns estudos realizados em fígado, baço e timo. A restrição alimentar perinatal em ratos reduziu o volume do fígado, mas houve manutenção da proporcional das proteínas da MEC (Reif *et al.*, 1992). Em seres humanos, foi demonstrada alteração no timo em situação de desnutrição protéica energética, sendo evidenciado matriz extracelular densa e, conseqüentemente, uma depleção dos tímócitos por indução da morte celular programada, provavelmente ocasionada pela elevação da MEC (Lyra *et al.*, 1993).

Ao avaliarmos a capacidade da MEC de se ligar aos fatores de crescimento, observamos que, quando cultivamos as células após o ensaio de ligação com GM-CSF, a MEC obtida do animal desnutrido demonstrou maior capacidade de induzir proliferação do que a obtida do animal do grupo-controle, sugerindo modificações na modulação de citocinas no processo de desnutrição protéico energética. Estas alterações observadas *in vitro* provavelmente estão refletindo as diferenças encontradas na concentração de fibronectina, laminina e trombospondina em trabalhos anteriores (Vituri *et al.*, 2000, 2005) e possivelmente há um remodelamento *in vivo* nesta matriz, que dificilmente seja exatamente pontuado nos ensaios *in vitro*, devido à complexidade de moléculas envolvidas.

Estudos *in vivo* demonstram que o estroma medular, que oferece o suporte físico e substâncias biologicamente ativas como a MEC, citocinas e quimocinas, quando alterado, resulta em desordens hematopoiéticas importantes (Jin-Xiaofeng *et al.*, 2004). Streauli (1999) segere que a MEC possa atuar como reservatório para fatores de crescimento, que poderiam ser liberados por remodelagem enzimática dos componentes da MEC. A desnutrição protéica, que desenvolve uma aplasia com alterações na angiogênese (Xavier, 1999; Vituri *et al.*, 2005), provavelmente leva a um processo de cicatrização com remodelamento da MEC, induzindo alterações funcionais, que neste modelo foi possível demonstrar apenas quando avaliamos a sua capacidade de fixação a citocinas.

Diante destes dados, podemos sugerir que as alterações encontradas neste modelo experimental *in vitro* podem ser relevantes para o microambiente e, conseqüentemente, para o comportamento das células *in vivo*.

## CONCLUSÕES

A matriz extracelular da medula óssea de camundongos Swiss apresentou capacidade de induzir proliferação e/ou de sustentar sobrevivência celular de linhagem mielóide murina e a desnutrição protéica energética não modificou esse efeito biológico. As células FDC-P1 cultivadas com MEC e citocinas em doses mínimas, 10 µg/mL, e em doses máximas 500 µg/mL, da atividade da citocina IL-3, demonstraram efeito sinérgico e efeito regulatório, respectivamente. A MEC obtida do grupo desnutrido, quando submetida ao ensaio de ligação a fatores de crescimento e, avaliado o efeito biológico desta interação, mostrou maior proliferação celular do que a MEC obtida do grupo-controle para GM-CSF, sugerindo modificações na modulação da atividade do GM-CSF.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Vera Lúcia Cardoso Garcia Tramonte, do Departamento de Nutrição da UFSC, por permitir a utilização das gaiolas metabólicas e acesso ao Laboratório de Nutrição Experimental desta Instituição. Este trabalho foi apoiado financeiramente pelo FUNPESQUISA/UFSC, CAPES, CNPq e FAPESC.

## ABSTRACT

### **Capacity of the extracellular matrix of the bone marrow to induce proliferation of myeloid cells *in vitro* in model of protein malnutrition in mice**

*The aim of this study was to verify the capacity of the extracellular matrix (ECM) obtained from bone marrow of malnourished mice to sustain survival and to induce the proliferation of myeloid cells. We also verified the capacity of the tests to interact with in vitro hematopoietic cytokines. Male "Swiss" mice were submitted to protein malnutrition with a diet content of 4% casein until they lost 20% of the original weight, while the group-control was kept with a diet content of 14% of casein. The bone marrow was extracted with 1.0 mg of aprotinin/mL in PBS. The proliferation tests were carried out with myeloid cell line FDCEP-1, by the colorimetric method of reduction of the MTT. The obtained ECM from nourished and undernourished mice induced cellular proliferation in*

vitro. Tests performed with Il-3 and GM-CSF cytokines in a concentration of 10 and 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  displayed synergic and regulatory effects respectively. The ECM obtained from the malnourished group submitted to the binding to GM-CSF demonstrated higher cellular proliferation than the ECM obtained from the control group ( $p < 0.05$ ). The results suggest that the alterations in the composition of ECM of bone marrow caused by malnutrition might lead to modification of the GM-CSF activity modulation.

**UNITERMS:** Malnutrition experimental study. Extracellular matrix. Hematopoiesis. Bone marrow. Myeloid cells/proliferation.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. In: ALBERTS, B.; DENNIS, B.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. *Molecular Biology of the Cell*. 4. ed. New York: Garland, 2002. p. 949-1009.
- ARAI, K.; LEE, F.; MIYAJIMA, A.; MIYATAKE, S.; ARAI, N.; YOKOTAT. Cytokines: Coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev. Biochem.*, v.59, p.783-836, 1990.
- BORELLI, P.; MARIANO, M.; BOROJEVIC. R. Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutr. Res.*, v.15, n.10, p.1477-1485, 1995.
- BORSATTO, E. Desnutrição protéica: avaliação *in vitro* da capacidade de progenitores grânulo-monocíticos da medula óssea de camundongos. São Paulo, 1999. 64 p. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo].
- CAMPBELL, A.; WICHA, M.S.; LONG, M. Extracellular matrix and the maintenance of the differentiated state: Proteoglycans and nonchondrocytes. *Develop. Biol.*, v. 99, p.132-144, 1985.
- DEXTER, T.M.; GARLAND, J.M.; TESTA, N.G. *Colony-stimulating factor*. New York: Marcel Dekker Inc., 1990. p.475.
- DEXTER, T.M., SPOONCER, E. Growth and differentiation in the hemopoietic system. *Annu. Rev. Cell Biol.*, v.3, p.423-441, 1987.
- GORNALL, A.G.; BARDAWILL, C.J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reactions. *J. Biol. Chem.*, v.177, p.751-766, 1949.
- GU, Y; KORTESMAA, J; TRYGGVASON, K; PERSSON, J; EKBLÖM, P; JACOBSEN, S; EKBLÖM, M. Laminin isoform-specific promotion of adhesion and migration of human bone marrow progenitor cell. *Blood.*, v. 101, n. 3, p.877-885, 2003.
- JIN-XIANG, F; XIAOFENG, SHI; JUN-CHUAN, Q; YAN, G; XUE-GUANG, Z. Homing efficiency and hematopoietic reconstitution of bone marrow-derived stroma cells expanded by recombinant human macrophage-colony stimulating factor *in vitro*. *Exp. Hemtol.*, v. 32, p.1204-1211, 2004.
- KEATING, A.; GORDON, M.Y. Hierarchical organization of hematopoietic microenvironments: role of proteoglycans. *Leukemia*, v. 2, p.766-769, 1988.
- KLEIN, G. The extracellular matrix of the hematopoietic microenvironment. *Experientia*, v. 51, p. 914-926, 1995.
- LICHTMAN, M. A.; BEUTLER, E; KIPPS, T. J.; SELIGSON, U; KAUSHANSKY, K; PRCHAL, J. T. *Williams Hematology*. 7.ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006. p.1501-1533.
- METCALF, D. The molecular control of proliferation and differentiation in hemopoietic cells. *J. Immunol.*, v.153, p.4978- 4987, 1993.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferação and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MUÑOZ, E.; MARCOS, A.; UNZAGA, M.T. Effect of protein deficiency on the lysosomal enzyme activities of the spleen and thymus of weanling rats. *J. Nutr.*, v. 111, p. 2133-2141, 1981.
- NARDI, N.B.; ALFONSO, Z.Z.C. The hematopoietic stroma. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 32, n.5, p.601-609, 1999.
- PETERS C.; BUDDE C.L.; BREON T.A.; KUPERA.; KIM J. Ovine Bone marrow extracellular matrix and soluble protein extraction: fetuin amino terminus microheterogeneity. *Am. J. Medical Sciences*, v.309, p.285-294, 1995.

- PETERS, W.P.; HOLLAND, J.F.; SENN, H.; RHOMBERG, W.; BENERJEE, T. – Corticosteroid administration and localized leukocyte mobilization in man. *N. Eng. J. Med.*, v.282, p.342-345, 1972.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc committee on the reformulation of the AIN-76<sup>A</sup> rodent diet. *Am. Inst. Nutr.*, v.123, p.1939-1951, 1993.
- SCHUPPAN, D.; RÜHL, M. Matrix in signal transduction and growth factor modulation. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 27, p.2125-2141, 1994.
- SCHWARZBAUER, J.E.; SECHLER, J.L. Fibronectin fibrillogenesis: paradigm for extracellular matrix assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.11, p.622-627, 1999.
- SCOTT, J.E. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, *in vitro* and in the tissues. *FASEB J.*, v. 6, p.2639-2645. 1992.
- STREULI, C. Extracellular matrix remodeling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.11, p.634-640, 1999.
- VITURI, C. L.; ALVAREZ-SILVA, M.; TRENTIN, A. G.; BORELLI, P. Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.33, n.8, p.889-895, 2000.
- VITURI, C.L; ALVAREZ-SILVA, M; TRENTIN, A.G; TRAMONTE, V.L.C.G; BORELLI, P. Thrombospondin in protein malnutrition induced hypoplasia. *Rev. Nutr.*, v.18, n. 6, p.727-731, 2005.
- WATERLOW, J.C. *Malnutrición proteico-energética*. Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1996. 501p. (Publicación Científica No. 555)
- XAVIER, J.G., Repercussões estruturais da desnutrição proteica e renutrição em tecidos linfo-hematopoiéticos de camundongos. São Paulo, 1999. 254p. [Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo].
- ZHANG Y.; ADACHI Y.; SUZUKI Y.; MINAMINO K.; IWASAKI M.; HISHA H.; SONG C.Y.; KUSAFUKA K.; NAKANO K.; KOIKE Y.; WANG J.; KOH E.; CUI Y.; LI C.; IKEHARA S. Simultaneous injection of bone marrow cells and stromal cells into bone marrow accelerates hematopoiesis *in vivo*. *Stem Cells.*, v.22, n.7, p.1256-1262, 2004.

Recebido para publicação em 26 de julho de 2006

Aceito para publicação em 16 de abril de 2008