

AVALIAÇÃO POR IMUNOHISTOQUÍMICA DE PECAM-1 E VE-CADERINA EM CÉLULAS ENDOTELIAIS MEDULARES EM UM MODELO DE CARÊNCIA PROTEICA

Vaniky Duarte Marques, Edgar Matias Bach Hi

Área Temática: Biomedicina

RESUMO

A desnutrição proteica e proteico-energética (DPE) é o tipo mais frequente de desnutrição, estimando-se que mais de 30% da humanidade sofre de algum grau de desnutrição. (GADDUCCI, et al., 2001; AKNER & CEDERHOLM, 2001; NOVA, et al., 2002; KEUSCH, 2003). Sua causa primária é uma redução na ingestão de alimentos ou da utilização inapropriada de energia e proteína (LATHAM, 1990). Fisiologicamente, em seres humanos após o nascimento, a hematopoese ocorre exclusivamente na medula óssea. A produção de células sanguíneas em um padrão constante depende do microambiente medular, estrutura organizada que regula a fisiologia da célula tronco hematopoética (CTH) (LAKSHMIPATHY & VERFAILLIE, 2005). Assim que as CTH caem na corrente circulatória elas se aninham em locais distantes chamados nichos hematopoéticos, onde a disposição anatômica vascular e os elementos celulares de sustentação formam um microambiente ideal para o seu desenvolvimento e assim para a hematopoese (LORENZI, 2006). Na Medula óssea adulta existem dois tipos de nichos que envolvem a localização da CTH: o vascular e o osteoblástico. A maioria das CTHs estão localizadas perto do endotélio com preferência pela região do endóstio em direção a uma área altamente vascularizada ao centro da Medula Óssea, ou seja, o nicho vascular. Ele promove a proliferação, diferenciação e migração das CTH. Aproximadamente 60% das CTH ficam em volta dos vasos sanguíneos da Medula Óssea, sugerindo assim que a vascularização é um quesito essencial para que a CTH desempenhe seu papel. Isso nos leva a sugerir que esse é o principal nicho hematopoético em condições fisiológicas e que a maioria das CTH é perivascular (ANTHONY; LINK, 2013; EHNINGER; TRUMPP, 2011; GAVIRO et al., 2012). Esse nicho é composto por células endoteliais, progenitores mesenquimais perivascular, macrófagos e expressão de CXCL12 em células estromais (incluindo CAR, leptina + e nestina GFP+) (ANTHONY; LINK, 2013; FERRER et al., 2010). As células endoteliais estão associadas fortemente com as células hematopoéticas, já que recobrem os vasos sanguíneos que suplementam as CTH, ou seja, fazem parte do nicho perivascular. Elas formam o endotélio e promovem a autorrenovação, diferenciação e contribuem para a manutenção da CTH através da produção de SCF (Fator de célula tronco). Portanto, quando esse nicho perivascular, nicho osteoblástico e/ou seus componentes estão alterados a hematopoese será alterada, pois o tecido hematopoético, como os tecidos que possuem uma alta taxa de renovação celular, requerem uma ampla fonte de nutrientes, e podem assim serem alterados em estados nutricionais deficientes (Borelli, et al., 2007; Xavier, et al., 2007; ANTHONY; LINK, 2013; GAVIRO et al., 2012). Em estados de desnutrição proteica energética altera-se o fornecimento de nutrientes para o nicho medular e o nicho perivascular. Tendo como resultado uma hematopoese e granulopoese comprometidas (principalmente a eritopoese) ocorrendo uma redução na meia vida dos eritrócitos e consequente anemia (CUNHA et al., 2013; BORELLI et al., 2007). A desnutrição proteica compromete a hematopoese e afeta o microambiente medular, assim avaliar as alterações no nicho perivascular ocasionada por esta enfermidade pode fornecer informações importantes a respeito da manutenção da quiescência, auto-renovação e diferenciação da célula-tronco hematopoética. Visto que o microambiente é uma estrutura altamente organizada, o objetivo será avaliar a influência da desnutrição proteica sobre a expressão de marcadores vasculares no microambiente medular a partir da expressão das proteínas marcadoras de células endoteliais medulares PECAM-1 e VE-CADERINA (através de anti PECAM-1 e anti VE-CADERINA) pela técnica de imunohistoquímica. Para essa avaliação foram utilizados camundongos (*Mus musculus domesticus*) machos, com 45-60 dias de idade, da linhagem C57BL/6 (isogênica) provenientes de colônias mantidas pelo Biotério de Produção e Experimentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Após o desmame, os animais receberam ração Purina® (Nestlé, São Paulo, Brasil) e água ad libitum até atingirem a idade estipulada para início dos experimentos. Foram utilizados dois tipos de ração – normoproteica e hipoproteica - para a alimentação dos animais neste modelo experimental. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Os animais foram então previamente pesados e separados em gaiolheiros metabólicos. Inicialmente os animais passaram por um período de adaptação (10 a 15 dias) e ao final desse período os animais foram divididos em dois grupos: Controle e Desnutrido. No período de indução da desnutrição, os animais do grupo Controle receberam ração normoproteica, contendo 12% de proteína, e os animais do grupo Desnutrido receberam ração hipoproteica, contendo 2% de proteína. As rações utilizadas são isocalóricas (3601,0 kcal/kg), diferindo apenas na concentração proteica que é definida pela quantidade de caseína adicionada. (REEVES et al., 1993). O período para a indução à desnutrição utilizado foi de 35 a 40 dias, sendo que o peso e o consumo de ração de cada animal foram avaliados a cada 48 horas (FOCK et al., 2010). Os animais de ambos os grupos foram sacrificados para a retirada dos esternos, que foram fixados em paraformaldeído 4% por 24hs, sob agitação para posterior descalcificação. Os blocos foram incluídos em parafina e seccionados em 5µm, seguindo-se o processo de imunohistoquímica com os anticorpos primários (anti-PECAM-1 ou anti-VE-CADERINA, ImmunoCruz™ rabbit ABC Staining System: sc-2018). As amostras foram coradas com hematóxilina de Mayers e eosina e montadas em Entellan para posterior avaliação em microscópio de luz. Controles negativos foram incluídos em todos os experimentos e foram obtidos pela omissão do anticorpo na etapa de incubação com anticorpo primário. Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 6.0 for Mac OS X (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Dessa forma foram feitas comparações estatísticas paramétricas realizadas por test-T onde a probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças estatisticamente significativas foi de $p < 0.05$. A análise imunohistoquímica para PECAM-1 e VE-CADERINA representou a média do número de vasos da medula óssea de camundongos do grupo Controle (n=4) e do grupo Desnutrido (n=4) onde n representa o número de animais avaliados. Os resultados demonstram maior marcação no grupo Desnutrido, dessa forma apresentando maior contagem de vasos na medula óssea.

REFERÊNCIAS

- AKNER, G. & CEDERHOLM, T. Treatment of protein-energy malnutrition in chronic nonmalignant disorders. *Am. J. Clin. Nutr.*, 74: 6-24, 2001.
- ANTHONY, B.A., LINK, D.C. Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells. *Trends in Immunology*. p 1-6. 2013.
- BORELLI, P., BLATT, S., PEREIRA, J., MAURINO, B.B., TSUJITA, M., SOUZA, A.C., XAVIER, J.G., FOCK, R.A. et al. Reduction of erythroid progenitors in protein-energy malnutrition. *British Journal Of Nutrition*. p. 1-8. 2007.
- CUNHA, M.C.R., LIMA, F.S., VINOLO, M.A.R., HASTREITER, A., CURRI, R., BORELLI, P., FOCK, R.A. Protein Malnutrition Induces Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Commitment to Adipogenic Differentiation Leading to Hematopoietic Failure. *Plos One*. São Francisco, p. 1-12. mar. 2013
- EHNINGER, A., TRUMPP, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. *The Journal of Experimental Medicine*. p 421- 428, 2011.
- FERRER, S.M., MICHURINA, T.V., FERRARO, F., MAZLOOM, A.R., MACARTHUR, B.D., LIRA, S.A., SCADDEN, D.T., MA'AYAN, A., ENIKOLOPOV, G.N., FRENETTE, P.S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. V.466, p 1-8, 2010.
- FOCK, R. A., BLATT, S. L., BEUTLER, B., PEREIRA, J., TSUJITA, M., DE BARROS, F.E., BORELLI, P. Study of lymphocyte subpopulations in bone marrow in a model of protein-energy malnutrition. *Nutrition*, v. 26, n. 10, p. 1021-8, Out 2010.
- FOCK, R. A., ROGERO, M. M., VINOLO, M. A., CURRI, R., BORGES, M. C., BORELLI, P. Effects of protein-energy malnutrition on NF-kappaB signalling in murine peritoneal macrophages. *Inflammation*, v. 33, n. 2, p. 101-9, Abr 2010.
- GADDUCCI, A., COSIO, S., FANUCCHI, A. & GENAZZANI, A.R. Malnutrition and cachexia in ovarian cancer patients: pathophysiology and management. *Anticancer Res.*, 21: 2941-7, 2001.
- GAVIRO, M.V.G., BADGE, R.L., AVILÉS, F.F., PEZZI, E.L. The Vascular Stem Cell Niche. *J. of Cardiovasc. Trans. Res.* V.5, p 618-630, 2012.
- KEUSCH, G.T. History of nutrition: malnutrition, infection and immunity. *J. Nutr.*, 133: 336S-340S, 2003.
- LAKSHMIPATHY, U., VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. *Blood Rev.* 19: 29-38, 2005.
- Latham M.C. Protein-energy malnutrition - its epidemiology and control. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 10, 168-180, 1990.
- LORENZI, T.F. Hemopoese: Origem das células do sangue. *Citologia das células do sangue e dos órgãos hemofomadores*. In: LORENZI, Therezinha F.. *Manual de Hematologia: Propedêutica e clínica*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 1. p. 6-8.
- NOVA, E., SAMARTÍN, S., GÓMEZ, S., MORANDÉ, G. & MARCOS, A. The adaptive response of the immune system to the particular malnutrition of eating disorders. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 56: S34-S37, 2002.
- REEVES, P. G., NIELSEN, F. H., FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.*, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.