

## CATEGORIA DOUTORADO – CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

## DESNUTRICÃO PROTEICA ATIVA A SINALIZAÇÃO AUTOFÁGICA REGULADA POR AKT/ MTOR NAS CÉLULAS DE MEDULA ÓSSEA

BELTRAN, J.S. O.<sup>1</sup>; SILVA, G.B.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, D.C.<sup>1</sup>; OLIVEIRA, T.C.<sup>2</sup>; SANTOS, E.W.<sup>1</sup>; ARANA-CHAVES V.E.<sup>2</sup>; FOCK, R.A.<sup>1</sup>; BORELLI, P<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade de São Paulo, Brasil

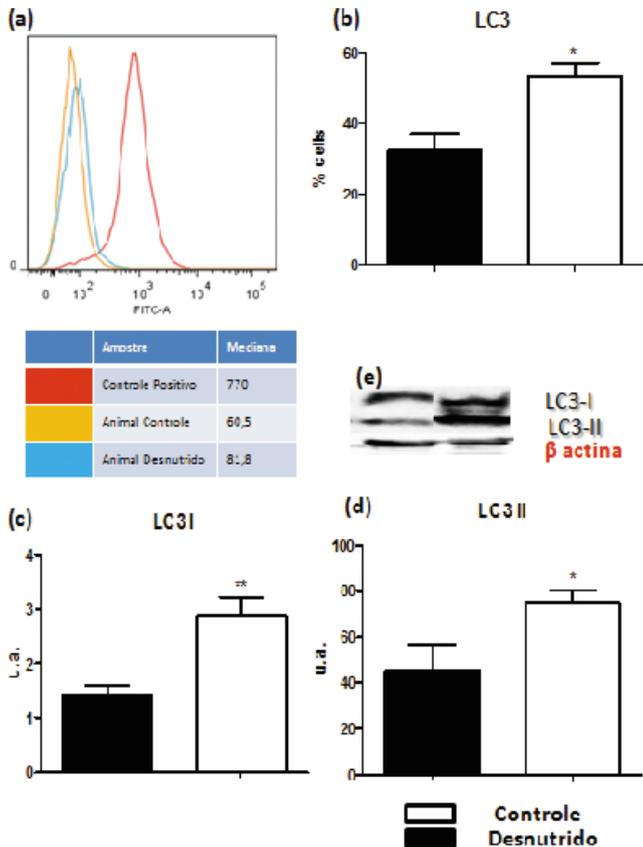
<sup>2</sup> Faculdade de Odontologia, Departamento de Biomateriais e Biologia Oral, Universidade de São Paulo, Brasil

**Introdução e Objetivos:** A desnutrição é um problema de saúde pública que contribui significativamente para o aumento da morbidade e mortalidade [1] e apesar da melhoria dos recursos alimentares, o número de pessoas desnutridas ainda é alarmante. A desnutrição acomete alterações morfológicas e funcionais em diversos órgãos: baço [2] pulmões [3], fígado [4], alterações no sistema imunológico [2] e na matriz extracelular (MEC), com diminuição da proliferação celular afetando a granulopoese [5], a qual contribuiu para a leucopenia encontrada [5], linfocitopenia e neutropenia [6]. Há permanência da célula-tronco hemopoética na fase Go/G1 do ciclo celular em camundongos desnutridos [7]. O conjunto dessas alterações pode contribuir para a hipoplasia observada na medula óssea em camundongos desnutridos [5]. A hipoplasia medular pode ser ocasionada pela autofagia, sendo que desequilíbrios nutricionais e metabólicos podem também induzir ativação autofágica [8]. A autofagia é um processo catabólico que participa da manutenção da homeostase celular [9], MEC [10] e na regulação das células – tronco hemopoéticas (CTH) [11]. Considerando que a desnutrição proteica leva a comprometimento da hemopoese e hipoplasia medular, o presente trabalho foi delineado para, avaliar a interação da autofagia em células totais da medula e na CTH em modelo experimental de desnutrição proteica. **Material e Métodos:** Camundongos C57BL/6J receberam dieta normoprotéica – Grupo Controle (C) (12% de proteína) ou hipoprotéica – Grupo Desnutrido (D) (2% de proteína) durante 5 semanas. Após o grupo D perder entre 20-25% da massa corpórea, células totais da medula óssea (MO) foram marcadas com LC3 e avaliadas por citometria de fluxo. As proteínas: Bcl-2 Beclin-1, LC3, Akt /mTOR na porção total e fosforilada e os complexos de mTOR: (Raptor, Rictor e Gβ1) foram quantificados pelo ensaio de Western Blotting (WB) e o mRNA avaliados por RT-PCR. Autofagossomos foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. Foi avaliado o aminograma de ambos os grupos. Avaliamos também por microscopia eletrônica de transmissão, vacúolos autofágicos em cortes de (80nm) destes animais. **Resultados:** *Aminograma:* Foram avaliados 20 tipos diferentes de aminoácidos, (tabela 1), presentes no plasma. Os aminoácidos: Alanina e Serina apresentaram concentração elevada no grupo desnutrido quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, Isoleucina, Lisina, Metionina, Valina e Taurina apresentaram redução significativa no plasma no grupo desnutrido em relação ao controle.

Tabela 1 – Avaliação dos aminoácidos essenciais e não essenciais no plasma de camundongos do grupo controle e desnutrido.

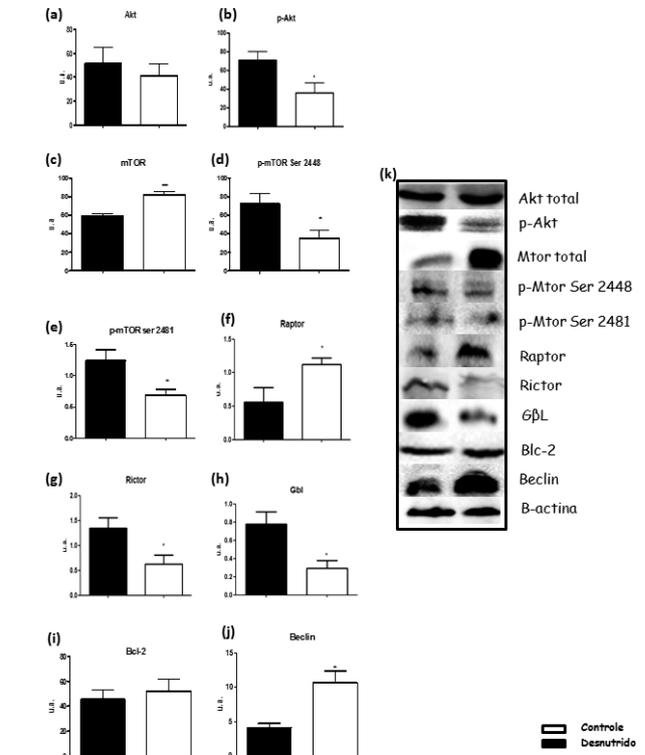
Aminoácidos (mg/Kg)	Controle (n=5)	Desnutrido(n=5)
Glutamina	57.17 ± 3.20	59.64 ± 0.96
Alanina	31.01 ± 1.25	40.86 ± 0.76 **
Arginina	13.24 ± 1.13	15.86 ± 1.54
Asparagina	3.68 ± 0.30	3.50 ± 0.19
Ac. Aspártico	1.91 ± 0.53	1.26 ± 0.26
Glicina	12.03 ± 0.71	12.67 ± 0.24
Isoleucina	8.73 ± 0.59	6.63 ± 0.28 *
Leucina	14.10 ± 1.30	10.83 ± 0.57
Ac. Glutâmico	7.99 ± 1.21	7.51 ± 1.05
Lisina	35.05 ± 1.41	26.05 ± 1.48 **
Cistina	16.68 ± 0.61	15.67 ± 0.18
Metionina	6.50 ± 0.46	4.52 ± 0.30 *
Fenilalanina	9.04 ± 0.54	7.49 ± 0.43
Tirosina	12.62 ± 1.15	8.65 ± 1.16
Treonina	15.21 ± 0.98	13.27 ± 2.10
Prolina	10.68 ± 0.46	11.89 ± 0.46
Valina	17.86 ± 1.05	11.03 ± 0.17 **
Histidina	9.87 ± 0.56	10.65 ± 0.17
Serina	11.11 ± 0.74	16.29 ± 0.56 **
Taurina	70.50 ± 9.66	38.26 ± 5.86 *

Os resultados estão expressos por média ± desvio padrão, os dados apresentados são referentes à avaliação dos aminoácidos essenciais e não essenciais de camundongos do grupo controle e desnutrido. O número em parênteses refere-se ao número total de animais usados no experimento. \* ( $p \leq 0,05$ ) e \*\* ( $p \leq 0,01$ ) indica a diferença significativa entre os grupos controle e o grupo desnutrido. *Desnutrição induz autofagia via LC3:* As células da medula óssea de ambos os grupos foram marcadas com LC3 e foram avaliadas por citometria de fluxo e seu resultado foi validado pelo método de Western blotting (figuras 1A e 1B, respectivamente figuras 1C, 1D e 1E). Na figura 1A pode ser visto o controle positivo do experimento, sendo que na figura 1B demonstra que a quantidade de LC3 apresentou-se significativamente elevada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle, assim como nas figuras 1C, 1D e 1E demonstraram que LC3 I parte citosólica e LC3 II parte lipídica onde esta é recrutada para o autofagossomo, encontram-se aumentadas no grupo desnutrido em relação ao grupo controle.

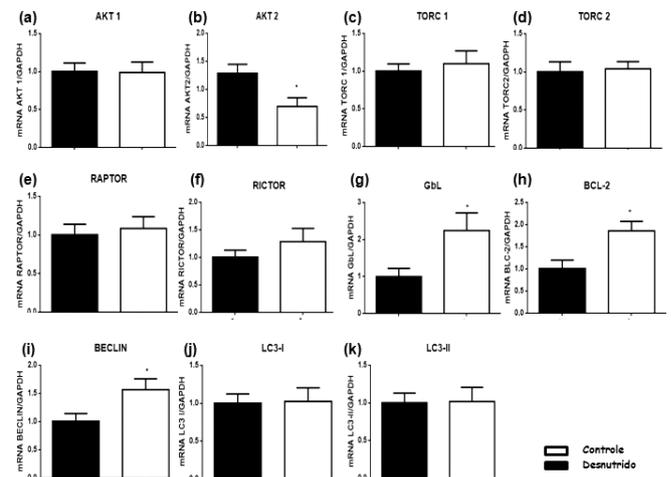


**Figura 1** – Efeito da desnutrição proteica na autofagia por LC3. Células totais da medula óssea de camundongos controles e desnutridos por avaliados por citometria de fluxo e Western Blotting. **Figura 1A** refere-se ao controle utilizado para compensação da amostra. Células totais da medula óssea foram marcadas com anti-LC3, sendo que o gráfico **1B** (C: 32.37 ± 4.714 n=6; D: 48.90 ± 5.020 n=6) demonstra seus respectivos resultados. **1C** (C: 1.43 ± 0.159 n=6; D: 2.89 ± 0.325 n=6) e **1D** (C: 45.60 ± 10.67 n=6; D: 74.92 ± 5.741 n=6) demonstram os resultados em relação a quantificação da proteína LC3 por *Western blotting*. A imagem representativa da quantificação, conforme **figura 1E** demonstra que há uma maior expressão da proteína LC3 I e II nos animais desnutridos em relação ao controle. O número em parênteses refere-se ao número total de animais usados no experimento. \* (p ≤ 0,05) e \*\* (p ≤ 0,01) indica a diferença significativa entre o grupo controle e o grupo desnutrido. No experimento foi utilizado (n=6) para o grupo controle e (n=6) para o grupo desnutrido.

**Desnutrição altera proteínas envolvidas na sinalização autofágica em células de medula óssea:** Não houve diferença significativa do Akt total (**figura 2A**) nas células totais da medula de animais desnutridos, quando comparadas com as células totais dos animais controles. Já a quantidade de p-Akt (**figura 2B**) foi significativamente menor nas células totais da medula óssea de animais desnutridos quando comparada ao observado nos animais do grupo controle. A quantidade de mTOR total apresentou-se significativamente aumentada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle (**figura 2C**). Já a quantidade de p-mTOR ser 2448 e p-mTOR ser 2481 apresentou redução significativa nas células de animais desnutridos em relação ao animais do grupo controle (**figuras 2D e 2E**). A quantidade de Raptor apresentou-se significativamente aumentada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle (**figura 2F**). Já a quantidade de Rictor e Gβ1 apresentou redução significativa nas células de animais desnutridos em relação aos animais do grupo controle (**figuras 2G e 2H**). A quantidade de Beclin apresentou-se significativamente aumentada nas células oriundas dos animais do grupo desnutrido quando comparados aos animais do grupo controle (**figura 2I**). Já para a proteína Bcl-2 (**figura 2J**), não houve diferença significativa entre os grupos.



**Figura 2** – Efeito da desnutrição proteica na autofagia nas proteínas envolvidas na sinalização autofágica. Células totais da medula óssea de camundongos controles e desnutridos por avaliados por Western Blotting. **Figuras 2A e 2B** demonstram resultados da determinação de Akt Total e fosforilado. Akt-total (**figura 2A**): (C: 51.65 ± 12.92 N=6; D: 41.27 ± 9.837 N=6) p-Akt (**figura 2B**): (C: 63.85 ± 4.637, n=6; D: 45.42 ± 7.519, n=6). **Figura 2C, 2D e 2E** demonstra resultados da determinação de mTOR Total e sua porção fosforilada em serina 2448 e serina 2481. mTOR total (**figura 2C**): (C: 59.23 ± 2.281, n=6; D: 81.98 ± 3.662, n=6), p-mTOR ser 2448 (**figura 2D**): (C: 72.13 ± 11.45 N=6; D: 34.81 ± 9.456 N=6) e p-mTOR ser 2481 (**figura 2E**): (C: 1.23 ± 0.172 N=6; D: 0.68 ± 0.092 N=6). Resultados da determinação de Raptor (**figura 2F**): (C: 0.56 ± 0.218 n=6; D: 1.12 ± 0.100 n=6), Rictor (**figura 2G**): (C: 1.35 ± 0.209 n=6; D: 0.62 ± 0.182 n=6) e Gβ1 (**figura 2H**): (C: 0.78 ± 0.135 n=6; D: 0.29 ± 0.088 n=6). **Figura 2I** determinação da proteína Bcl-2. O grupo controle apresentou o valor de 45.57 ± 7.86 (n=6) e o grupo desnutrido: 52.27 ± 9.11 (n=6) e **figura 2J**, demonstram resultados da determinação de Beclin: (C: 4.07 ± 0.640 n=6; D: 10.63 ± 1.766 n=6). **Figura 2K** demonstra os resultados das proteínas por Imagem Quant, com seu respectivo controle β-actina. O número em parênteses refere-se ao número total de animais usados no experimento. \* (p ≤ 0,05) e \*\* (p ≤ 0,01) indica a diferença significativa entre o grupo controle e o grupo desnutrido. No experimento foi utilizado (n=6) para o grupo controle e (n=6) para o grupo desnutrido.



**Figura 3** – Efeito da desnutrição proteica na autofagia na expressão gênica. Células totais da medula óssea de camundongos controles e desnutridos foram avaliadas por RT-PCR. **Figuras 3A e 3B**, demonstra resultados da determinação de AKT1 e AKT2. AKT 1 (**figura 3A**): (C: 1.000 ± 0.132 N=6; D: 0.9843 ± 0.1411 N=6) AKT2 (**figura 3B**): (C: 1.289 ± 0.1570 N=6; D: 0.6987 ± 0.1524 N=6). **Figuras 3C, 3D e 3E** demonstra resultados do mRNA de mTOR 1 (TORC1) e mTOR 2 (TORC2). TORC1 (**figura 3C**): (C: 1.000 ± 0.0950

N=6, n = 6; D: 1.103 ± 0.1655 N=6, n = 6), TORC2 (figura 3D): (C: 1.000 ± 0.1336 N=6; D: 1.041 ± 0.09509 N=6). Resultados do mRNA de Raptor (figura 3E): (C: 1.000 ± 0.1380 N=6; D: 1.082 ± 0.1527 N=6), Rictor (figura 3F): (C: 1.000 ± 0.1302 N=6; D: 1.287 ± 0.2392 N=6) e GβL (figura 3G): (C: 1.000 ± 0.2223 N=6; D: 2.245 ± 0.4752 N=6). Figura 3H determinação do mRNA de Bcl-2. O grupo controle apresentou o valor de 1.000 ± 0.1979 N = 6 e o grupo desnutrido: 1.861 ± 0.2124 N=6 e figura 3I, demonstram resultados do mRNA de Beclin: (C: 1.000 ± 0.1439 N=6; D: 1.561 ± 0.1981 N=5). Figura 3 J e 3K demonstra os resultados do mRNA de LC3 I e LC3 II. LC3 I (figura 3J): (C: 1.000 ± 0.1236 N=6; D: 1.024 ± 0.1807 N=6); LC3II (figura 3K): (C: 1.000 ± 0.1296 N=6; D: 1.018 ± 0.1880 N=6). Para todos os genes foi utilizado GAPDH como controle das amostras. O número em parênteses refere-se ao número total de animais usados no experimento. \* (p ≤ 0,05) e \*\* (p ≤ 0, 01) indica a diferença significativa entre o grupo controle e o grupo desnutrido. No experimento foi utilizado (n=6) para o grupo controle e (n=6) para o grupo desnutrido.

qPCR para AKT 1 E 2, MTOR 1 E 2 e o seus complexos, BLC-2, BECLIN, LC3 I E II em células totais de medula óssea: O mRNA de AKT 1 (figura 3A), Mtor: (figura 3C (TORC1) e figura 3D(TORC2)), RAPTOR, (figura 3E) RICTOR (figura 3F) e LC3 I (figura 3J) e LC3 II (figura 3K) não houve diferenças significativas entre os grupos controle desnutrido e controle. Porém AKT 2 (figura 3B) envolvido na progressão do ciclo celular, demonstrou diminuição da expressão de mRNA nos camundongos desnutridos, já o mRNA do GβL (figura 3G), BCL-2 (figura 3H) e BECLIN (figura 3I) apresentaram um aumento da expressão nos camundongos desnutridos comparados com o controle.

Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão para identificação de vacúolos autofágicos na medula óssea: Cortes de (80 nm) de esternos de camundongos desnutridos foram contrastados com acetato de uranila e então examinados em microscópio eletrônico de transmissão. Na figura 4A observamos características da morfologia ultraestrutural da autofagia, com presença de dupla membrana, caracterizando-se em um autofagossomo. Na figura 4B observamos na seta vermelha típicos vacúolos autofágicos com estágios de degradação e na seta amarela observa-se possivelmente um fagóforo membrana delimitante que está envolvido no alongamento e formação do autofagossomo na região medular.

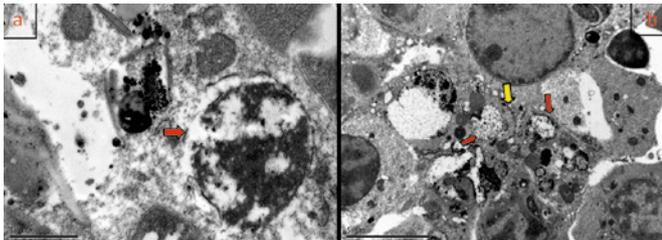


Figura 4 – Microscopia eletrônica de transmissão exibindo uma região da medula óssea esternal. Contraste acetato de uranila. Figuras A e B aumento de 30.000x em microscópio eletrônico de transmissão Jeol, Tokyo, Japan à 80 kV. Setas em vermelho indicam a presença de autofagossomos, com dupla membrana e seta em amarelo, presença de um fagóforo, membrana inicial da autofagia. Corte representativo de 1 animal do grupo desnutrido.

**Conclusão:** Foi demonstrado que há aumento nas concentrações plasmáticas de glicocorticoide, redução de insulina e IGF1 e diminuição da expressão das proteínas Erki1/2 em células tronco/progenitoras o que poderia ter acarretado na redução do p-Akt nos animais desnutridos. [7] Este dado juntamente com diminuição do p-Akt ora demonstrada podem ser responsáveis pelas alterações na ativação/fosforilação de mTOR. mTOR é ativado por fatores de crescimento e nutrientes como carboidratos e aminoácidos e funciona como um “sensor” para equilibrar a disponibilidade de nutrientes e crescimento celular, ou seja, se as células estiverem desprovidas de nutrientes, mTOR não consegue inibir a autofagia. Dados deste trabalho demonstram que há aumento significativo de mTOR total e diminuição na fosforilação no qual contribui para este processo e diminuição dos aminoácidos essenciais que participam da via mTOR. Há aumento das proteínas LC3 II e Beclin nos animais desnutridos, sendo que estas proteínas são importantes para iniciação do processo autofágico. Beclin interage com a proteína anti-apoptótica Bcl-2, sendo que o mRNA dos mesmos apresentou aumento significativo, demonstrando que a via autofágica está sendo expressivamente ativada. Portanto, a redução da celularidade da medula óssea em animais desnutridos é ocasionada por

autofagia, entretanto não se sabe o processo autofágico é benéfico ou não para o indivíduo desnutrido, portanto foi desenvolvido um camundongo *knockout* para o gene *Atg7*, (projeto em andamento), com intuito de contestar se o camundongo desnutrido sem autofagia é transitável para medula óssea.

**Agradecimentos:** O presente estudo teve auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq-Projeto Universal).

### Referências Bibliográficas

- FAO – Food and agriculture organization of the United Nations. [www.fao.org](http://www.fao.org), 2013.
- MELLO, A. S.; DE OLIVEIRA, D. C.; BIZZARRO, B.; et al. Protein Malnutrition Alters Spleen Cell Proliferation and IL-2 and IL-10 Production by Affecting the STAT-1 and STAT-3 Balance. *Inflammation*, 2014.
- LIU, X.; LIN, Y.; TIAN, B.; et al. Maternal protein restriction alters VEGF signaling and decreases pulmonary alveolar in fetal rats. *International journal of clinical and experimental pathology*, v. 7, n. 6, p. 3101–3111, 2014.
- GIUSTO, M.; LATTANZI, B.; DI GREGORIO, V.; et al. Changes in nutritional status after liver transplantation. *World journal of gastroenterology: WJG*, v. 20, n. 31, p. 682–690, 2014.
- BORELLI, P.; BARROS, F.; NAKAJIMA, K.; BLATT, S.L.; FAVERO, G.M.; FOCK, R. Protein malnutrition halts hemopoietic progenitor cell in the G0/G1 cell cycle stage, thereby altering cell production rates. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* v.42, p. 523–530, 2009.
- BORELLI, P.; FOCK, R. A.; BLATT, S.; PEREIRA, J.; BEUTLER, B.; TSUJITA, M.; SOUZA, A. C.; XAVIER, J. G. Effect of protein deprivation on erythropoiesis. *British Journal Nutrition*, 2007.
- NAKAJIMA, K.; CRISMA, A. R.; SILVA, G. B.; et al. Malnutrition suppresses cell cycle progression of hematopoietic progenitor cells in mice via cyclin D1 down-regulation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, v. 30, n. 1, p. 82–89, 2014.
- RABINOWITZ, J.D.; WHITE, E. *Autophagy and Metabolism*. *Sciencemag*, v.330, 2010.
- REEVES P. Components of the AIN-93 Diets as Improvements in the AIN-76A Diet. *The Journal of Nutrition*. v.127, p.8385–8415, 1993.
- MORGAN-BATHKE, M.; LIN, H. H.; CHIBLY, A. M.; et al. Deletion of ATG5 Shows a Role of Autophagy in Salivary Homeostatic Control. *Journal of Dental Research*, v. 92, n. 10, p. 911–917, 2013.
- LOOS, B.; ENGELBRECHT, A.-M.; LOCKSHIN, R. A.; KLIONSKY, D. J.; ZAKERI, Z. The variability of autophagy and cell death susceptibility: Unanswered questions. *Autophagy*, v. 9, n. 9, 2013.
- JUN-LIN, G.; SIMON, A. K.; PRESCOTT, M.; et al. Autophagy in stem cells. *Autophagy*, v. 9, n. 6, p. 830–849, 2013.