UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

MARIANE CRISTINA DO NASCIMENTO

**Estudo de células mesenquimais da medula óssea de pacientes com leucemia mielóide
aguda e de indivíduos saudáveis em um ensaio de cocultivo com blastos leucêmicos**

Ribeirão Preto
2018

MARIANE CRISTINA DO NASCIMENTO

Estudo de células mesenquimais da medula óssea de pacientes com leucemia mielóide aguda e de indivíduos saudáveis em um ensaio de cocultivo com blastos leucêmicos

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego

**Ribeirão Preto
2018**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Do Nascimento, Mariane Cristina

Estudo de células mesenquimais da medula óssea de pacientes com leucemia mielóide aguda e de indivíduos saudáveis em um ensaio de cocultivo com blastos leucêmicos. Ribeirão Preto, 2018.

45 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Clínica médica.
Orientador: Eduardo Magalhães Rego

1. Leucemia mieloide aguda. 2. Células-tronco mesenquimais.
3. Nicho medular.

Nome: Do Nascimento, Mariane Cristina

Título: Estudo de células mesenquimais da medula óssea de pacientes com leucemia mielóide aguda e de indivíduos saudáveis em um ensaio de cocultivo com blastos leucêmicos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

À minha amada mãe, Neusa Masetto do Nascimento, quem sempre me incentivou a ser uma cientista e da qual herdei a paixão pela Biologia.

AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto** e à **Universidade de São Paulo**, que me proporcionaram todo apoio acadêmico e institucional necessários para uma formação de excelência.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP**, pelo suporte financeiro concedido e por apresentar-se como órgão pioneiro e principal para o progresso da ciência brasileira.

Ao **Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego**, pela oportunidade oferecida, pela confiança posta em mim e em meu trabalho, pela competência e pelo o que o senhor representa para a hematologia e ciência brasileira.

Ao **Prof. Dr. João Agostinho Machado Neto**, que me ensinou a dar os primeiros passos em uma nova área, pela generosidade diária de seus ensinamentos e pelo exemplo pessoal que representa como profissional do mundo da ciência.

Ao **M.e. Diego Antônio Pereira Martins**, pela generosidade, dedicação, perseverança e, principalmente, por acreditar em mim e em meu trabalho, contribuindo de maneira fundamental para a conclusão deste.

À **Dra. Virgínia Mara de Deus Wagatsuma**, pelo apoio ao trabalho, amizade, conselhos oferecidos e laços criados.

Às **Dra. Maria Isabel** e **Dra. Lorena Lobo de Figueiredo Pontes** pela disponibilidade e solicitude para a coleta das amostras.

À **Patricia Vianna Bonini Palma** pelos os ensinamentos em citometria de fluxo, que foram de extrema importância para esse trabalho.

Ao **Guilherme Augusto Sousa Alcântara** pelo amor e amizade dedicados a mim, pelo incentivo e força nas horas difíceis, pelo companheirismo no dia-a-dia até nos experimentos dessa dissertação, pela paciência tantas e tantas vezes necessária, pela compreensão sempre acolhedora, tantos sentimentos sem os quais seria impossível chegar até aqui. Obrigada por tentar me ensinar que a calma é sempre a melhor escolha, você está certo. Ah, é claro, não poderia deixar de agradecer por me apresentar o professor Rego, você acertou direitinho na escolha.

Às minhas avós **Maria Eliza** e **Aparecida**, ao meu avô **Sidney** (*in memoriam*) e ao meu pai **Maurício** pela educação, carinho e apoio durante toda essa trajetória que sem o qual seria impossível dar continuidade ao meu sonho.

À todos os colegas do laboratório agradeço-lhes pela postura profissional e pelo apoio ao meu trabalho, mas principalmente pelo sentimento de amizade construído:

Juan Luiz Coelho, Thiago Mantello Bianco, Isabel Weinhäuser, César Alexander Ortiz Rojas, Silvia Elena Sánchez Mendoza e Luciana Yamamoto de Almeida.

Resumo

Do Nascimento, Mariane Cristina. Estudo de células mesenquimais da medula óssea de pacientes com leucemia mielóide aguda e de indivíduos saudáveis em um ensaio de cocultivo com blastos leucêmicos. 2018. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Laboratório de Hematologia Experimental, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As células-tronco mesenquimais (MSCs) da medula óssea compreendem uma população de células multipotentes com propriedades imunorreguladoras e capacidade de secreção de fatores de crescimento, desempenhando um papel fundamental na regulação da hematopoiese. À luz dessas propriedades, alguns estudos fornecem uma análise das relações estabelecidas entre células-tronco hematopoiéticas normais (HSCs) e MSCs quando expostas à cocultura. Jing et al. (Haematologica, 2010) demonstram neste tipo de arranjos de cocultura a geração de três populações distintas de células: células não aderentes (Fração A), células aderidas à superfície de MSCs (Fração B) e células abaixo das MSCs (Fração C). Além disso, dados recentes apontam para a associação da progressão da doença com a evidência de transferência de mitocôndrias funcionais (mt) e espécies reativas de oxigênio (ROS) das MSCs para as células leucêmicas. É teorizado como um mecanismo de MSCs, a fim de reduzir as espécies reativas de oxigênio (ROS). No entanto, os desempenhos diferenciais nesses processos de transferência entre MSCs normais e leucêmicas em sistemas de cocultura em cada uma dessas populações de células distintas não foram estabelecidos. As células leucêmicas (CD45⁺) têm um aumento de quase três vezes na proliferação em todas as três populações após a cocultura com MSCs leucêmicas, mas não após a cocultura com MSCs saudáveis. As células CD45⁺ da fração A têm uma baixa taxa de proliferação em cocultura com MSCs normais comparadas com as células leucêmicas. Em 5d, as MSCs leucêmicas (CD73⁺) aumentam 20 vezes a coloração de mitotracker em comparação com 3d, implicando que os blastos AML estimulam MSCs a produzir mais mt, embora os MSCs normais apresentem os mesmos níveis de mitotracker em 3 / 5d. Além disso, os níveis de mtROS diminuem em 10 vezes em 5d em comparação com 3d em leucemia, mas não em MSCs normais, sugerindo uma recuperação mediada por mt em MSCs leucêmicas após a cocultura. Finalmente, o ROS total diminui 2 vezes nas células CD45⁺ após cocultura com MSCs leucêmicas por 5d, mas não em contrapartida normal. Em essência, esses achados sugerem diferentes mecanismos de doação mitocondrial de MSCs para blastos LMA. Além disso, o estudo fornece um passo importante na

compreensão da natureza complexa do metabolismo do tumor, não apenas na célula maligna, mas também dentro do microambiente que a suporta.

Palavras-chave: 1. Leucemia mieloide aguda. 2. Células-tronco mesenquimais. 3. Nicho medular.

Abstract

Do Nascimento, Mariane Cristina. Comparison of the effects of mesenchymal stem cells from patients with acute myeloid leukemia and from healthy donors on a coculture assay with leukemic blasts. 2018. 45 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Laboratório de Hematologia Experimental, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Bone marrow mesenchymal stromal cells (MSCs) comprise a population of multipotent cells with immunoregulatory properties and the capability of secreting growth factors, playing a key role in the regulation of hematopoiesis. In light of these properties, some studies provide analysis of the relations established between normal hematopoietic stem-cells (HSCs) and MSCs when exposed to coculture. Jing et al. (Haematologica, 2010) demonstrate in these kind of coculture arrangements the generation of three distinct cells populations: non-adherent cells (supernatant), phase-bright cells (adhered to the surface of MSCs) and phase-dim cells (beneath the MSCs). Furthermore, recent data pointed to the association of disease progression in AML with the evidence of functional mitochondria (mt), and reactive oxygen species (ROS) transference from MSCs to the blasts cells. It is theorized as a mechanism of MSCs in order to reduce the reactive oxygen species (ROS). Nevertheless, the differential performances in these transference process among normal and leukemic-MSCs in coculture systems in each of those distinct cells populations were not established. AML cells (CD45+) have an increase of almost 2.5-fold in proliferation in all of 03 populations after coculture with leukemic-MSCs but not after coculture with a normal-MSCs. The CD45+ cells in phase-bright/dim have a low proliferation rate in coculture with normal-MSCs compared with the leukemic cells. In 5d, the leukemic-MSCs (CD73+) increase 20-fold the mitotracker staining compared with 3d, implying that AML blasts stimulate MSCs to produce more mt, albeit the normal-MSCs present the same mitotracker levels in 3/5d. Additionally, the mtROS levels decrease by 10-fold in 5d compared with 3d in leukemic, but not in normal-MSCs, suggesting mt mediated recover in leukemic-MSCs after coculture. Finally, total ROS decrease 2-fold in CD45+ cells after coculture with leukemic-MSCs for 5d, but not in normal counterpart. In essence, these findings suggest different mechanisms of mitochondrial donation from MSCs to AML blats. Moreover, the study provides an important step in the understanding of the complex nature of tumor metabolism, not only in the malignant cell, but also within the microenvironment which supports it.

Key-words: 1. Acute myeloid leukemia. 2. Mesenchymal stem cells. 3. Bone marrow niche.

Sumário

1. Introdução	10
2. Objetivos.....	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. Material e métodos	19
3.1 Casuística.....	19
3.2 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais	20
3.3 Linhagens celulares	20
3.4 Cocultivo de células mesenquimais e linhagens celulares leucêmicas.....	21
3.5 Coleta de células das frações A, B e C segundo <i>Jing et al.</i> (2010)	21
3.6 Estratégias de análise por citometria de fluxo	22
A investigação do efeito das MSCs na produção de energia e capacidade de regulação do estresse oxidativo nas linhagens leucêmicas; a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), transferência de mitocôndrias e proliferação celular nas MSCs e nas linhagens celulares leucêmicas foi realizada por citometria de fluxo utilizando diferentes estratégias de <i>gate</i> , conforme detalhado abaixo.	22
3.6.1 Marcação das células com os anticorpos direcionados aos antígenos de membrana das MSCs e das células leucêmicas	22
3.6.2 Marcação intracitoplasmática e nuclear das MSCs e das células leucêmicas	23
3.6.3 Análise das marcações nas linhagens de LMA e MSCs	23
3.7 Ensaio de formação de colônias fibroblastóides (CFU-F)	24
3.8 Extração de RNA	24
3.9 Síntese de cDNA	25
3.10 Quantificação da expressão gênica por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)	25
3.11 Análise estatística	27
4. Resultados	33
4.1 Proliferação e imunofenótipo das MSCs de indivíduos saudáveis ou com LMA	33
4.2 Cocultivo das linhagens leucêmicas com as MSCs	35
4.2.1 Avaliação da proliferação, da produção de ROS e do número de mitocôndrias em células da fração A	35
4.2.2 Avaliação da proliferação, da produção de ROS e do número de mitocôndrias em células da fração B.....	35
4.2.3 Avaliação da proliferação, da produção de ROS e do número de mitocôndrias em células da fração C.....	36
4.3 Expressão gênica das interleucinas inflamatórias e de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial	37
5. Discussão	35
6. Conclusões	39
7. Referências	43

Introdução

1. Introdução

A hematopoiese é o processo de desenvolvimento, formação e maturação de elementos figurados do sangue. Todas as células hematopoiéticas maduras derivam de células-tronco pluripotentes (do inglês *Hematopoietic Stem Cells*, HSCs) da medula óssea (MO), as quais se diferenciam em células progenitoras de linhagens específicas, que por sua vez se dividem e se diferenciam para gerar plaquetas, eritrócitos, monócitos/macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), linfócitos B, T e *Natural Killer* (NK) (MOSS, 2013).

O microambiente da MO é relevante para a manutenção das propriedades de autorrenovação e diferenciação das HSCs e dos progenitores diferenciados. Do ponto de vista histológico, é composto pelo estroma, formado por células endoteliais, adipócitos, macrófagos e fibroblastos, e pela matriz extracelular que contém glicosaminoglicanos, glicoproteínas e fibras de colágeno. As células estromais produzem constitutivamente, ou após estímulo, uma variedade de citocinas, tais como as interleucinas (IL) 1 (IL-1), IL-6, IL-11 e *Stem Cell Factor* (SCF), e fatores hematopoiéticos como M-CSF (do inglês, *Macrophage Colony-Stimulating Factor*), GM-CSF (do inglês, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) e G-CSF (do inglês, *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) (MOSS, 2013).

As células-tronco mesenquimais (do inglês *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) (HORWITZ et al., 2005) foram descritas pela primeira vez por Friedenstein, como unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-Fs). Estas células com capacidade clonogênica eram aderentes a superfície, se organizavam em monocamadas e apresentavam formato de espícula (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). Somente 0,01% a 0,0001% das células nucleadas da MO do adulto são MSCs, que se caracterizam por uma população heterogênea de células, sendo uma mistura de progenitores em diferentes estágios de comprometimento com a linhagem mesodérmica. Deste modo somente uma pequena quantidade tem capacidade multipotencial e de autorrenovação, e que, quando semeadas *in vitro*, se comportam como células aderentes ao plástico com morfologia semelhante ao fibroblasto (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970).

A *International Society for Cellular Therapy* definiu as MSCs por meio de três características: a) a aderência ao plástico a partir do *pool* de células mononucleares, b) expressão de antígenos de superfície específicos de MSCs e na ausência de antígenos

relacionados à presença de células contaminantes e c) a capacidade de se diferenciar em células de origem mesodérmica. A primeira característica pode ser avaliada pela quantificação de células mononucleares da MO aderentes à superfície plástica, porém esse método trás uma possível desvantagem de contaminação por células hematopoiéticas, devido à heterogeneidade celular com relação ao potencial de diferenciação. No segundo teste, a avaliação da presença dos marcadores de membrana expressos pelas MSCs como o CD73, CD90 e CD105 e a ausência para os antígenos presentes nas células hematopoiéticas como CD34, CD45, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR em mais de 95% das células, são confirmatórios da pureza das MSCs. Por fim, a avaliação da capacidade de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos que essas células apresentam quando estimuladas adequadamente por citocinas e quimiocinas específicas (HORWITZ et al., 2005; DOMINICI et al., 2006).

As MSCs fazem parte do estroma, e sua importância na hematopoiese normal e na regulação imunológica tem sido destacada por diferentes autores (DI NICOLA et al., 2002; AGGARWAL; PITTENGER, 2005). Embora as células mesenquimais possuam capacidade de afetar células responsáveis pela imunidade inata e adaptativa, sua capacidade imunossupressora não é constitutiva; e sim, induzida pela secreção de citocinas inflamatórias, como às presentes no microambiente. Aggarwal e Pittenger, (AGGARWAL; PITTENGER, 2005) descreveram a interação entre as MSCs com cada uma das células isoladas do sistema imune e a capacidade que essas células têm de alterar o desfecho da resposta da célula imune inibindo duas das citocinas pró-inflamatórias mais importantes (TNF- α e IFN- γ) e aumentando a expressão de citocinas supressoras, incluindo IL-10. Nesse estudo também foi mostrado que os inibidores da síntese de PGE2 atenuaram os efeitos supressores globais das MSCs, sugerindo que a PGE2 pode ser responsável por muitos dos efeitos imunomoduladores mediados por MSCs. Os autores sugerem que as MSCs, em sua capacidade de inibir o IFN- γ e aumentar a secreção de IL-4, podem orquestrar uma mudança da proeminência de células TH1 pró-inflamatórias para um aumento de células TH2 anti-inflamatórias, benéficas para o controle da doença do doador versus o hospedeiro.

Muitos estudos demonstraram que as MSCs em cultura podem mediar à supressão da proliferação de células T por um fator secretado. Entre as explicações favorecidas está à secreção de citocinas imunossupressoras TGF- β e/ou IL-10 pelas MSCs. No entanto, o bloqueio desses fatores com anticorpos não reverte completamente à imunossupressão mediada por MSCs (DI NICOLA et al., 2002).

Interação entre MSCs e HSCs

O trabalho de Jing e cols. (JING et al., 2010), foi pioneiro ao descrever um comportamento distinto das HSCs quando cocultivadas com células mesenquimais, em que as mesmas se organizavam em três populações distintas: as células que permaneciam no sobrenadante (Fração A), as células que aderiam superficialmente às MSCs (Fração B) e as células que se localizavam abaixo da camada de MSCs (Fração C). Após cinco dias em cocultivo, a Fração A apresentou um aumento significativo na proliferação celular em relação às outras frações. Já a Fração B caracterizou-se pela presença de células com capacidade basal de proliferação e com perda dos marcadores de imaturidade celular, característicos das HSCs, e a Fração C era preponderantemente composta por células com fenótipo mais imaturo e de baixa capacidade proliferativa. Deste modo, os autores sugeriram que as MSCs criam dois nichos principais: o da sua superfície, que promove a proliferação das HSCs, e o nicho abaixo das MSCs que promove a quiescência e manutenção do fenótipo imaturo das HSCs. Assim, o modelo de Jing e cols. (JING et al., 2010) é útil para o estudo dos nichos da MO, em particular os que controlam a atividade das HSCs.

Interação entre MSCs e células da leucemia mielóide aguda

O nicho medular é importante para o processo de leucemogênese, como demonstrado por Colmone e cols. (COLMONE et al., 2008) em que se viu que a proliferação das células leucêmicas promove a criação de um microambiente anormal, competindo assim com as células CD34⁺ saudáveis pelo microambiente, através de uma maior produção de SCF. Deste modo, quando transplantadas em camundongos leucêmicos, as HSCs apresentaram baixa capacidade de enxertia e propagação, com falha na capacidade de transplantes consecutivos.

O trabalho de Ito e cols. (ITO et al., 2015) demonstrou que, quando cocultivadas com MSCs de indivíduos saudáveis, os blastos leucêmicos apresentaram uma maior viabilidade associada a uma menor taxa de apoptose, além de promoverem uma proteção a quimioterapia a essas células. Assim, estes resultados sugerem que alterações em células do estroma da MO podem contribuir para gênese ou progressão da LMA. Deste modo, estudos recentes apontam para o papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) como reguladoras autócrinas da interação entre MSCs e blastos leucêmicos (LUDIN et al., 2014).

A interação célula-célula entre células leucêmicas resulta em ativação de vias de sinalização autócrinas. Ademais, a ativação parácrina promove a quiescência, ativação de vias anti-apoptóticas, aumento da sobrevivência e resistência à quimioterapia das células leucêmicas (GARRIDO et al., 2001; HAZLEHURST et al., 2001; MATSUNAGA et al., 2003; ZENG et al., 2006; MEADS; HAZLEHURST; DALTON, 2008; NERVI et al., 2009; HOUTHUIJZEN et al., 2012; STRAUSSMAN et al., 2012). A associação entre as alterações no microambiente da MO e a progressão de malignidades hematológicas foram demonstradas em trabalhos com modelos animais. O *knockout* da endonuclease RNase III Dicer 1, especificamente em células mesenquimais osteoprogenitoras, resultou em mielodisplasia e LMA em modelos *in vivo*. Uma observação importante é que as células-tronco hematopoiéticas e seus progenitores mantinham a sua integridade genética, ou seja, não apresentavam a deleção (RAAIJMAKERS et al., 2010). Outro trabalho mostrou que a introdução de uma mutação no gene que codifica a β -catenina em osteoblastos murinos induziram LMA, com alterações cromossômicas comumente encontradas na doença, a ativação da β -catenina estava associada à ativação da sinalização via Notch nessas células, subsequentemente gerando alterações malignas nas células-tronco hematopoiéticas. Ademais, a inibição da via Notch esteve associada com uma melhora da doença, sugerindo um importante papel desta via (KODE et al., 2014).

Espécies reativas de oxigênio (ROS) e a hematopoiese normal e maligna

As células-tronco quiescentes e as em proliferação e diferenciação apresentam características metabólicas diferentes, o que resulta em produção de diferentes ROS. As espécies reativas de oxigênio são moléculas orgânicas e inorgânicas de oxigênio que possuem um número diferente de elétrons em sua camada de valência, e podem estar na forma de radicais livres ou não (H_2O_2 , $OH^\cdot$, $O_2^\cdot$) (LAMBETH, 2004; WARDMAN, 2007).

Baixos níveis de ROS são encontrados em células-tronco quiescentes e são regulados por fatores intrínsecos, como a taxa de respiração celular ou pela atividade de NADPH oxidase. Há ainda a regulação por fatores extrínsecos como o SCF ou a prostaglandina E2 (PGE2), necessária para a manutenção da autorrenovação destas células. Já os altos níveis de ROS são encontrados em células-tronco induzidas à diferenciação por estresse e inflamação, os quais podem provocar danos ao DNA e promover a apoptose (ITO et al., 2006; JANG; SHARKIS, 2007; HARRIS et al., 2013; LUDIN et al., 2014).

Uma variedade de citocinas secretadas pelas células estromais influenciam os níveis de ROS nas células hematopoiéticas (ITKIN et al., 2012). Estudos demonstraram que as células estromais são capazes de lidar com o aumento dos níveis de ROS por vários mecanismos de maneira semelhante ao que ocorre nas HSCs. Por exemplo, o FGF-2 (do inglês, *Fibroblast Growth Factor 2*) promove baixos níveis de ROS em MSCs, mantendo a célula em estado indiferenciado por inibição da senescência celular e promovendo a proliferação (COUTU; FRANCOIS; GALIPEAU, 2011). Em células-tronco hematopoiéticas de indivíduos saudáveis foi descrita a transferência de ROS a partir de células mesenquimais através de *gap junctions*. Além disto, as células mesenquimais contêm ciclooxygenase 2 (COX2) cuja atividade leva à produção de PGE2, secretada no meio extracelular vizinho às células-tronco hematopoiéticas e que reduzem os níveis intracelulares de ROS nas HSCs (LUDIN et al., 2014). Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que o aumento de ROS nas células-tronco hematopoiéticas está associado à sua mobilização e motilidade, e alguns fatores que sabidamente interferem com o comportamento das células-tronco hematopoiéticas, tais como o fator de crescimento dos hepatócitos (do inglês, *Hepatocyte Growth Factor*, HGF) causam aumento de ROS intracelular (LUDIN et al., 2014). É importante destacar que as espécies reativas de oxigênio não são apenas subprodutos do metabolismo celular, mas também desempenham um papel no estado e na função das células-tronco hematopoiéticas (SATTLER et al., 1999; ITO et al., 2004; MARALDI et al., 2009; RIZO et al., 2009; REDDY et al., 2011).

Os níveis de ROS podem contribuir para o surgimento e/ou progressão das doenças hematológicas malignas quer através de danos oxidativos no DNA, nos lipídeos e nas proteínas, quer através de uma sinalização anormal desencadeada direta ou indiretamente pela atividade das ROS. Hole e cols. (HOLE; DARLEY; TONKS, 2011) descreveram em uma variedade de tumores de diferentes tecidos o aumento do estresse oxidativo crônico, que os autores propuseram decorrer da interferência nos mecanismos de defesa antioxidantes, tais como a atividade das catalases, do sistema da glutatona e peróxido-redutase. Itkin e cols. (ITKIN et al., 2012) mostraram que a inibição do fator de crescimento do fibroblasto 2 (FGF-2) em linhagens de LMA promoveu um aumento nos níveis de ROS e a diferenciação em células maduras. A produção de ROS foi associada à taxa de recaída da doença em pacientes com LMA, sugerindo-a como um importante fator de estratificação prognóstica (ZHOU et al., 2010). Além disto, Hole e cols. (HOLE et al., 2010) reportaram que mutações no gene *RAS* associadas à ativação

constitutiva da proteína aumentam a produção de ROS em células CD34⁺ e que contribuíram para o fenótipo leucêmico. O aumento das fontes de ROS em LMA, que expressam o mutante Ras, é dependente da ativação de NOX2 (HOLE et al., 2010). Já no estudo de Reddy e cols. (REDDY et al., 2011), a produção de ROS foi associada à proliferação e migração de células leucêmicas portadoras de mutações em diferentes tirosina quinases sabidamente oncogênicas. Um estudo de rastreamento retroviral de genes associados à LMA revelou inserções frequentes no gene que codifica a proteína TXNIP [do inglês, *tioredoxin* (TRX) *interacting protein*] em camundongos que desenvolveram LMA (ERKELAND et al., 2009). O mesmo estudo também demonstrou que TXNIP também está comumente superexpressa em pacientes com LMA. Considerando que a TXNIP se liga e inativa a TRX, uma importante proteína na defesa antioxidante, Watanabe e cols. (WATANABE et al., 2010) associaram a expressão de TXNIP com a indução de estresse oxidativo e desenvolvimento de LMA.

Distúrbios no processo metabólico em células leucêmicas portadoras de mutações nos genes da isocitrato desidrogenase 1 (*IDH1*) ou 2 (*IDH2*) podem também causar acúmulo de ROS. Estas mutações são frequentes em LMA e podem ocorrer em outros cânceres (DANG; JIN; SU, 2010). O mutante da *IDH* tem a atividade alterada, favorecendo a conversão do isocitrato para 2-hidroxiglutarato (2-HG), um oncometabólito, ao invés de α -cetoglutarato (α -CG) (WARD et al., 2010).

No conjunto, esses dados indicam que as ROS são moléculas sinalizadoras importantes para as HSCs saudáveis, e quiçá para as células da LMA. Entretanto, até os dias atuais, nenhum trabalho avaliou o impacto das MSCs saudáveis e as provenientes de pacientes com LMA na manutenção das atividades metabólicas das células leucêmicas, utilizando um modelo comparativo. Assim, nossa hipótese é que as MSCs leucêmicas possam favorecer a sobrevivência das células malignas através da diminuição dos danos celulares e/ou indução de quiescência e/ou diminuição da apoptose induzidos por ROS.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Geral

Comparar o efeito na proliferação e produção de ROS intracelular em linhagens celulares de LMA cultivadas na presença de células mesenquimais de indivíduos saudáveis e de pacientes com LMA.

2.2 Específicos

- ✓ Isolar e cultivar células mesenquimais provenientes de indivíduos saudáveis (grupo controle) e de pacientes com LMA, caracterizando o seu fenótipo;
- ✓ Determinar o efeito na capacidade proliferativa em linhagens celulares de LMA cultivadas na presença de MSCs de indivíduos saudáveis ou com LMA.
- ✓ Determinar o metabolismo mitocôndrial (geração de ROS) em linhagens celulares de LMA cultivadas na presença de MSCs de indivíduos saudáveis ou com LMA.

Material e métodos

3. Material e métodos

3.1 Casuística

Amostras de aspirado de medula óssea de pacientes com leucemia mielóide aguda *de novo* com idade superior a 18 anos atendidos no ambulatório de hematologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP) foram incluídos no estudo (n=7). O diagnóstico foi realizado segundo preconizado pela Organização Mundial de Saúde (ARBER et al., 2016). Foram excluídos pacientes com LMA associada a t(15;17), por constituírem um grupo de pacientes regime terapêutico diferenciado. Alternativamente, nove indivíduos sem histórico de doenças hematológicas foram incluídos como contraparte normal. As principais características clínicas e demográficas dos indivíduos incluídos neste estudo estão sumarizadas na tabela 1. Todos indivíduos incluídos concordaram em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Nº aprovação CEP 7147/2005) seguindo as recomendações da declaração de Helsinki.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos indivíduos saudáveis e dos pacientes com leucemia mielóide aguda incluídos no estudo.

Identificação	Grupo	Idade	Sexo	Estratificação de risco
1	Saudável	28 anos	M	Não se aplica
2	Saudável	30 anos	M	Não se aplica
3	Saudável	29 anos	F	Não se aplica
4	Saudável	54 anos	M	Não se aplica
5	Saudável	26 anos	M	Não se aplica
6	Saudável	31 anos	M	Não se aplica
7	Saudável	26 anos	F	Não se aplica
8	Saudável	49 anos	M	Não se aplica
9	Saudável	32 anos	F	Não se aplica
1	LMA	51 anos	M	Desfavorável
2	LMA	63 anos	F	Desfavorável
3	LMA	36 anos	M	Intermediário
4	LMA	23 anos	F	Desfavorável
5	LMA	44 anos	M	Favorável
6	LMA	61 anos	F	Intermediário
7	LMA	57 anos	M	Desfavorável

M: masculino, F: feminino, LMA: Leucemia mielóide aguda

3.2 Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais

As células mononucleares foram isoladas a partir dos aspirados de medula óssea utilizando centrifugação com gradiente de densidade em *Histopaque* 1077 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Um volume de 5 mL de aspirado de medula óssea diluído em 5 mL de PBS foi adicionado cuidadosamente em 5 mL de *Histopaque* 1077 e submetido à separação por gradiente de centrifugação a 830 x g por 15 minutos à temperatura ambiente com aceleração e freio controlados. Após esta centrifugação, a fração correspondente às células mononucleares, que estavam contidas entre uma camada correspondente ao plasma e uma camada contendo o *Histopaque* 1077, foi coletada e lavada uma vez em 7 mL de PBS, mantendo a proporção 1:1, centrifugadas a 690 x g por 7 minutos à temperatura ambiente, em aceleração e freio igual a 7. Ao término do processo, as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer e colocadas em cultura.

As células mononucleares isoladas dos aspirados de medula óssea foram ajustadas para a concentração de 1×10^5 células/mL de meio α -MEM suplementado com 20% de soro bovino fetal, aqui chamado de α -MEM completo (α -MEM e SBF; Gibco, Grand Island, NY, EUA). As suspensões celulares (10 mL) foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm² e mantidas em incubadora a 37°C, com ambiente umidificado e 5% de CO₂, com trocas de todo o volume de meio a cada 3 a 4 dias. Ao atingirem confluência de 80-90% da área da garrafa, as células foram transferidas para garrafas de 225 cm², sendo diluídas em 20 mL do mesmo meio. O descolamento das células da garrafa foi antecedido de uma lavagem com PBS e adição de 1 mmol/L de EDTA (ethylenediamine tetracetic acid; Gibco) contendo tripsina 0,05% (Gibco) sobre a monocamada até que se observe o completo desprendimento das células. Posteriormente, a tripsina foi inativada com meio α -MEM completo. As células foram coletadas em tubos de 50 mL e centrifugadas por 5 minutos a 290 x g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado, o *pellet* ressuspendido em meio fresco e as células foram transferidas para garrafas de 225 cm².

3.3 Linhagens celulares

As linhagens celulares humanas representativas dos diversos subtipos de LMA: OCI/AML3 (DSMZ® ACC-582), KASUMI-1 (DSMZ® ACC-220) e THP-1 (ATCC® TIB-202TM) foram cultivadas em meio α -MEM completo e mantidas a 37°C, 5% CO₂.

A cada 3 a 4 dias, a concentração de células foi ajustada para $3,0 \times 10^5$ células/mL em meio fresco e seu volume aumentado para a expansão do número de células.

3.4 Cocultivo de células mesenquimais e linhagens celulares leucêmicas

As células mesenquimais foram semeadas, de terceira para quarta passagem, 5×10^5 células em placas de petri de 65mm^2 com 5 mL de meio α -MEM completo. Após as células-tronco mesenquimais atingirem a confluência de 50-60%, as linhagens celulares foram sincronizadas nas fases G0/G1 do ciclo celular com a adição de 2 mM de timidina (Calbiochem, Darmstadt, Germany) por 16 horas. No dia seguinte as linhagens foram adicionadas ao sobrenadante na proporção 1:1, sendo mantidas em cocultivo por 3 e 5 dias.

3.5 Coleta de células das frações A, B e C segundo *Jing et al.* (2010)

A separação dos dois tipos celulares foi realizada em três etapas de acordo com protocolo adaptado de Jing e colaboradores (JING et al., 2010) resultando em três diferentes populações (denominadas arbitrariamente de A, B e C), representadas na figura 1. Primeiramente, as células do sobrenadante foram removidas por simples aspiração do meio de cultura (Fração “A” – células em suspensão). Posteriormente, a camada adjacente foi lavada duas vezes com PBS, para remoção das células em suspensão que estavam em contato superficial com a monocamada de células mesenquimais (Fração “B” – composta em maioria por células provenientes das células em suspensão e uma mínima porção de células mesenquimais). Por fim, as placas foram visualizadas em microscópio óptico, sendo possível a visualização de uma pequena quantidade de células previamente em suspensão que estão fortemente aderidas abaixo das células mesenquimais. Essa última camada foi coletada com a adição de 1mmol/L de EDTA + tripsina 0,05% até que fosse observado o completo desprendimento das células (Fração “C” – composta por uma mínima porção de células previamente em suspensão e em sua grande maioria por células mesenquimais).

Figura 1. Interação célula-tronco hematopoiética (HSCs) e célula-tronco mesenquimal (MSCs). Note a formação de 3 frações: “A”: HSCs no sobrenadante, “B”: HSCs acima da MSCs e “C”: HSCs abaixo da MSCs. Modelo proposto por Jing e colaboradores (2010).

3.6 Estratégias de análise por citometria de fluxo

A investigação do efeito das MSCs na produção de energia e capacidade de regulação do estresse oxidativo nas linhagens leucêmicas; a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), transferência de mitocôndrias e proliferação celular nas MSCs e nas linhagens celulares leucêmicas foi realizada por citometria de fluxo utilizando diferentes estratégias de *gate*, conforme detalhado abaixo.

3.6.1 Marcação das células com os anticorpos direcionados aos antígenos de membrana das MSCs e das células leucêmicas

As células foram lavadas com 2 mL PBS e ressuspensas em 100 µL de PBS. Em seguida, foram marcadas com 2 µL de cada anticorpo CD45 PerCP (Clone: 2D1), (BD Biosciences, California, EUA) e CD73 PE/Cy7 (Clone: AD2) (Biolegend, San Diego, LA, EUA) (marcação de membrana) e incubadas por 15 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após centrifugação para lavagem das células e remoção do excesso de anticorpos as amostras foram permeabilizadas utilizando o tampão *BD Perm III* (BD Biosciences) por 15 minutos ao abrigo da luz. Finalmente as células foram lavadas novamente com 2 mL de PBS e ressuspensas em 100 µL de PBS para marcação dos componentes intracelulares.

3.6.2 Marcação intracitoplasmática e nuclear das MSCs e das células

leucêmicas

As marcações intracelulares para avaliação da capacidade energética e proliferativa das MSCs/linhagens foram realizadas com Ki-67 BV421 (Clone: Ki-67) (Biolegend, EUA), MitoSOX® *Red* (50nM – ThermoFisher, EUA) que consiste em um composto que na presença de superóxido mitocondrial é convertido em uma molécula que emite fluorescência no mesmo espectro que a ficoeritrina (PE), Mitotracker® *Red* (5nM – ThermoFisher, EUA) utilizado para a marcação de mitocôndrias e que emite fluorescência no mesmo espectro que a aloficocianina (APC) e por fim o reagente H₂DCFDA (5µM – ThermoFisher, EUA) utilizado para a avaliação da quantidade de ROS total, sendo convertido em um composto que emite fluorescência no mesmo espectro que o isotiocianato de ficoeritrina (FITC). Todos os compostos foram adicionados juntamente com 1mL de meio α -MEM completo e incubados por 30 minutos em incubadora de CO₂ (5%) a 37°C, com ambiente umidificado. Após esse período essas foram lavadas com PBS, ressuspensas em 300 µL de PBS e adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II utilizando o software BDFACSDiva para as análises (Becton– Dickinson). A porcentagem de células positivas para Ki-67 foi calculada em relação à marcação do dia inicial. Os valores de ROS total, de superóxido mitocondrial e de número de mitocôndrias foram calculados como valor normatizado pela intensidade média de fluorescência detectada nas células mesenquimais na ausência das células leucêmicas.

3.6.3 Análise das marcações nas linhagens de LMA e MSCs

Para a análise das diferentes populações provenientes do cocultivo foi utilizada a seguinte estratégia de *gates*: primeiramente as células foram ajustadas quanto ao seu tamanho (FSC, do inglês *forward scatter*) e complexidade interna (SSC, do inglês *side scatter*) com exclusão de células que foram adquiridas de maneira agrupada (*doublers*). Posteriormente, as células foram categorizadas quanto à expressão do antígeno de superfície presente nas linhagens de LMA (CD45), bem como o presente nas MSCs (CD73). Dentro de cada subpopulação foi analisado os marcadores intracelulares de proliferação celular (Ki-67), estresse oxidativo (ROS total) e metabolismo mitocondrial (superóxido mitocondrial e quantidade de mitocôndrias). Uma figura representativa contendo as estratégias de análise está presente na figura 2.

Figura 2. Estratégia de análise para as avaliações utilizando a citometria de fluxo. *Gate* inicial contendo a maioria das células adquiridas, com exclusão de *debris* celulares (A) Seleção das células adquiridas isoladamente, utilizando a estratégia de agrupamento da área versus comprimento das células (B) Seleção das duas populações presentes no co-cultivo: Linhagens de LMA (CD45⁺) e MSCs (CD73⁺) (C) Análise dos diferentes marcadores intracelulares: proliferação celular – Ki67 (D), espécies reativas de oxigênio (E), superóxido mitocondrial (F) e quantidade de mitocôndrias (G).

3.7 Ensaio de formação de colônias fibroblastóides (CFU-F)

As células mesenquimais foram cultivadas em placas de 6 poços, sendo semeadas 500 células em metade da placa e 250 na outra metade. Ao final de 15 dias de cultivo o meio foi descartado, as placas foram lavadas com 4 mL de PBS e incubadas a temperatura ambiente em solução de violeta cristal (1% em solução de etanol a 10%) por 5 minutos. Após isso, as placas foram lavadas por imersão delicada em água e deixadas para secar. Para contagem das colônias foi considerado um número mínimo de 50 células agrupadas ao longo do poço.

3.8 Extração de RNA

O RNA total das MSCs foi extraído utilizando o reagente Trizol® (Invitrogen, EUA). O *pellet* de MSCs foi transferido para tubos tipo eppendorf de 1,5 ml estéreis e livre de RNase, ao qual foram acrescentados 250 µL de PBS a 750 µL Trizol e homogeneizados.

A recuperação do RNA total deu-se após a adição de 200 µL de clorofórmio, seguida de agitação vigorosa e centrifugação a 14,000 x g à 4°C por 15 minutos. Recuperou a fase aquosa e esta foi transferida para novos tubos de 1,5 mL e submetidas à precipitação do RNA total com a adição de 1mL de álcool isopropílico [PA]. Após centrifugação a 14,000 x g à 4°C por 10 minutos e descarte do sobrenadante, o *pellet* de RNA total foi lavado com 500 µL etanol 70% e centrifugado a 7,500 x g à 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* posto para secar a temperatura ambiente. Finalmente, este foi dissolvido em água destilada e deionizada, tratada com o inibidor de RNase – o dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (SIGMA, EUA) e conservado em freezer a -80°C, até o momento do uso. A quantificação do RNA foi realizada através da leitura de densidade óptica de uma alíquota de 1µL da amostra utilizando espectrofotômetro *Denovix* (Uniscience, EUA).

3.9 Síntese de cDNA

As amostras de 1 µg de RNA total foram transcritas reversamente em cDNA com uso do kit *High Capacity cDNA reverse transcription* (Applied Biosystems, EUA). 1µg de RNA total foi utilizado nas reações em volume final de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10x *RT Buffer*, 1 µl de 25x *dNTP mixture*, 2,5 µl 10x *Random Primers*, 1,25 µl de *MultiScribe RT* (50U/µl), 0,63 µl de *RNasin® Plus RNase Inhibitor* (Promega, EUA) e H₂O deionizada tratada com DEPC 0,1% (SIGMA, EUA) suficiente para completar o volume final. As reações ocorreram durante 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e 5 segundos a 85°C.

3.10 Quantificação da expressão gênica por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A análise da expressão dos principais genes envolvidos na modulação da resposta inflamatória (*TNFA*), proliferação celular (*SLIT2*) e metabolismo mitocondrial (*PRGC1A*) expressos em célula mesenquimais foram verificadas através de qPCR em tempo real. A amplificação em tempo real foi realizada no *ABI 7500 Sequence Detector System* (Applied Biosystems, EUA) utilizando-se as metodologias de sonda *TaqMan* (Com o reagente *TaqMan® Universal PCR Master Mix* - Applied Biosystems, EUA) e Sybr Green (Com o reagente *Power® SYBR Green PCR Master Mix* - Applied Biosystems, EUA). Ambas metodologias foram utilizadas para detecção dos níveis de transcritos dos genes alvo e dos genes controles endógenos. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi utilizado para cada experimento e cada reação foi realizada em

triplicata técnica. As amostras foram processadas em duplicatas em placas de 96 poços. A amplificação foi realizada em um volume final de 20 µl, utilizando 5 µl do cDNA diluído 5 vezes, 10 µl do reagente 2X *TaqMan® Universal Master Mix* (Applied BioSystems, EUA) e 1 µl de cada *primer*/sonda isoforma-específica para os genes analisados. As sondas *TaqMan®* utilizadas na determinação do padrão de expressão gênica do *SLIT2*: *SLIT2*: Hs01061407_m1. Os *primers* utilizados para avaliação dos níveis de transcritos do *TNFA* e do *PRGCI*A foram adquiridos da empresa IDT Síntese biotecnológica (IDT, EUA) e utilizados na concentração baseada na padronização prévia da concentração ideal e estão na tabela 2. A expressão do gene constitutivo da beta actina (*ACTB*) foi utilizada para normalização da expressão dos genes alvo, de modo a compensar diferenças na quantidade de cDNA utilizadas em cada reação, devidas a erros de pipetagem. Os genes foram amplificados em conjunto, onde na mesma placa estavam os genes alvo e os controles endógenos.

Para determinar os níveis relativos de expressão dos genes alvo, utilizou-se o método *Comparative Cycle Threshold* (Ct). Resumidamente, uma vez concluída a reação, um limite de fluorescência na fase exponencial de amplificação é estipulado, de forma a determinar o ciclo (Ct) no qual a fluorescência decorrente da amplificação de cada amostra foi superior à fluorescência inespecífica emitida. Amostras que apresentaram expressão dos genes constitutivos detectáveis após o Ct de número 25 foram excluídas da análise. Para normalizar os valores de Ct para as diferentes amostras, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, ou mesmo diferenças na eficiência da transcrição de cada amostra, o determinado Ct de cada amostra é subtraído pelo Ct do seu respectivo gene constitutivo, gerando assim o ΔCt ($\Delta Ct = Ct_{amostra} - Ct_{endógeno}$). Para um mesmo gene, os valores de ΔCt podem ser diretamente comparados de maneira a obtermos uma quantificação relativa da expressão deste gene em diferentes amostras. Entretanto, foi utilizado um *pool* de amostras de RNA de MSCs saudáveis como referência da reação. A diferença entre o ΔCt de uma amostra teste e o ΔCt da amostra de uma referência ($\Delta\Delta Ct$) reflete a diferença existente entre as amostras analisadas. Esta diferença, em termos de nível de expressão gênica relativa pode ser obtida de forma aproximada aplicando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Tabela 2. Primers utilizados para SYBR Green

Gene		Sequência
<i>PRGC1A</i>	<i>Forward</i>	5' GTA AAT CTG CGG GAT GAT GGA 3'
<i>PRGC1A</i>	<i>Reverse</i>	5' AAT TGC TTG CGT CCA CAA AAG 3'
<i>TNFA</i>	<i>Forward</i>	5' CCG AGG CAG TCA GAT CAT CTT 3'
<i>TNFA</i>	<i>Reverse</i>	5' AGC TGC CCC TCA GCT TGA 3'

3.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do software SPSS Statistics 19.0. As variáveis foram descritas usando a média como medida de tendência central e o desvio padrão como medida de dispersão. Para a comparação entre as variáveis contínuas utilizamos o teste de Kruskal-Wallis e o teste Two-Way ANOVA. As variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos utilizando-se o teste Q-quadrado ou o teste exato de Fisher. Valores de $p < 0,05$ serão considerados significativos.

Resultados

4. Resultados

As células mesenquimais de pacientes com leucemia mielóide aguda ou de indivíduos saudáveis foram cultivadas separadamente com as linhagens leucêmicas, OCI-AML3, KASUMI-1 E THP-1. Não foram detectadas diferenças significativas entre as linhagens celulares para qualquer uma das variáveis estudadas. Assim optamos por descrever os resultados combinando os ensaios com as três linhagens. Destaca-se que as quatro variáveis foram descritas como porcentagem relativa ao dia inicial de cocultivo (marcação para o Ki-67) ou como valor normalizado pela intensidade média de fluorescência detectada nas células mesenquimais na ausência das células leucêmicas (ROS total, superóxido mitocondrial e o número de mitocôndrias).

4.1 Proliferação e imunofenótipo das MSCs de indivíduos saudáveis ou com LMA

As células mesenquimais de indivíduos saudáveis proliferaram mais que as isoladas de pacientes com LMA quando cultivadas *in vitro*. Foi confirmada esta diferença através do teste de formação de colônias fibroblastóides (CFU-F), no qual as MSCs saudáveis apresentaram um maior número de colônias que as MSCs leucêmicas quando cultivadas pelo mesmo intervalo de tempo (p -valor $<0,05$; Figura 3A). Para confirmar que as células utilizadas eram realmente MSCs, estas foram submetidas a análise por citometria de fluxo, na qual foram detectadas marcações positivas para CD73, CD90 e CD105 (Figura 3C) e ausência de marcação para CD45, CD34 e HLA-DR (Figura 3B).

Figura 3. Caracterização das MSCs. Ensaio de formação de colônia fibroblastóide (CFU-F) demonstrando maior capacidade de expansão das MSCs saudáveis em comparação com as MSCs isoladas de pacientes com LMA (A) $*p<0,05$; Ausência de marcação para as células hematopoiéticas presentes na MO (CD45, CD34 e HLA-DR) (B) Presença dos marcadores de superfície encontrados nas MSCs – CD73 e CD105 (C).

4.2 Cocultivo das linhagens leucêmicas com as MSCs

4.2.1 Avaliação da proliferação, da produção de ROS e do número de mitocôndrias em células da fração A

A fração A, que corresponde às células não aderentes às MSCs, apresentou uma maior proliferação quando cultivada com as MSCs leucêmicas comparada com as células cultivadas com as MSCs saudáveis ($P=0,006$; figura 4A). O valor mediano do número de células Ki67⁺ foi aproximadamente 3 vezes maior nas amostras cultivadas na presença de MSCs leucêmicas em comparação as amostras cultivadas com MSCs de indivíduos saudáveis. Nenhuma diferença significativa foi encontrada quanto à produção de ROS total, superóxido mitocondrial e quantidade de mitocôndrias ($P>0,05$; figura 4B-D).

Figura 4: Avaliação da proliferação celular, quantificação do ROS total, quantificação do superóxido mitocondrial e quantificação das mitocôndrias da fração A. Avaliação da proliferação celular através da marcação com Ki-67 (A) $^{**}P<0,01$. Avaliação do ROS total utilizando o reagente H2DCFDA (B). Avaliação do superóxido mitocondrial através do MitoSOX® Red (C). Avaliação da quantidade de mitocôndrias através do Mitotracker® Red (D). n.s.; não significativo.

4.2.2 Avaliação da proliferação, da produção de ROS e do número de mitocôndrias em células da fração B

Constituída por células em suspensão que ficam sobre as MSCs, a fração B apresentou maior proliferação quando cultivadas na presença de MSCs leucêmicas (Figura 5A). As células em contato com as MSCs leucêmicas apresentaram um aumento médio no valor de intensidade média de fluorescência de 110% (intervalo de confiança à 95%, IC 95%: 80-134%) enquanto que as células cocultivadas com as MSCs saudáveis exibiram um aumento médio no valor de intensidade média de fluorescência de 81% (IC 95%: 56-89%; $P=0,04$). Ademais em relação à avaliação do estresse oxidativo, o cocultivo com as MSCs leucêmicas levou a uma redução em 30% dos níveis de

superóxido mitocondrial em relação ao cocultivo com MSCs saudáveis ($P=0,005$; Figura 5C). Associado a isto, observou-se uma redução de 40% da massa mitocôndrial nas células $CD73^+$ leucêmicas ($P=0,014$; figura 5D). Nenhuma diferença foi observada quanto os níveis de ROS total (figura 5B).

Figura 5: Avaliação dos componentes intracelulares na fração B. Avaliação da proliferação celular através da marcação com Ki-67 (A) * $P<0,05$. Avaliação do ROS total utilizando o reagente H2DCFDA (B) n.s.; não significativo. Avaliação do superóxido mitocondrial através do MitoSOX® Red (C) ** $P<0,01$. Avaliação da quantidade de mitocôndrias através do Mitotracker® Red (D) * $P<0,05$.

4.2.3 Avaliação da proliferação, da produção de ROS e do número de mitocôndrias em células da fração C

Com predomínio de células $CD73^+$ a fração C representa uma pequena quantidade de células $CD45^+$. As células $CD45^+$ em cocultivo com as MSCs leucêmicas apresentaram uma redução no nível de ROS total ao final dos cinco dias de cocultivo, embora o mesmo não tenha sido evidenciado no cocultivo com as MSCs saudáveis ($P=0,005$; figura 6B). As linhagens celulares em cocultivo com as MSCs leucêmicas exibiram uma redução de 30% nos níveis de superóxido mitocondrial quando comparados com o cocultivo com as células dos doadores saudáveis ($P=0,009$; figura 6C). Assim como na fração B, as células $CD73^+$ leucêmicas na fração C tiveram seu número de mitocôndrias reduzido, apresentando redução de 20% em comparação com as células MSCs saudáveis ($P=0,035$; figura 6D). Nenhuma diferença foi observada quanto à proliferação celular (figura 6A).

Figura 6: Avaliação dos componentes intracelulares na fração C. Avaliação da proliferação celular através da marcação com Ki-67 (A) n.s.; não significativo. Avaliação do ROS total utilizando o reagente H2DCFDA (B) **P<0,01. Avaliação do superóxido mitocondrial através do MitoSOX® Red (C) **P<0,01. Avaliação da quantidade de mitocôndrias através do Mitotracker® Red (D) *P<0,05.

4.3 Expressão gênica das interleucinas inflamatórias e de genes relacionados ao metabolismo mitocondrial

Nosso próximo passo foi determinar a expressão de genes relacionados com o processo inflamatório. Para tal, foram avaliadas a expressão dos genes que codificam o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$) e o peptídeo SLIT2 (previamente descrito por nosso grupo como modulador da proliferação celular - manuscrito em preparo) em amostras de MSCs saudáveis e leucêmicas em quarta passagem (P4). Não foi observada diferença de expressão do $TNF\alpha$ quando comparados as MSCs saudáveis *versus* leucêmicas ($P>0,05$; figura 7A). As MSCs leucêmicas apresentaram menor expressão do gene *SLIT2* em relação às MCSs dos indivíduos saudáveis ($p<0,05$; figura 7B).

Por fim foi avaliada a expressão do gene *PRGC1A* que codifica a proteína PGC1 α responsável por regular a biogênese mitocondrial. As células mesenquimais isoladas de pacientes com LMA apresentaram baixos níveis de transcritos quando comparadas ao controle saudável ($P>0,05$; figura 7C).

Figura 7. Expressão de genes relacionados ao metabolismo das MSCs. Expressão dos genes *TNFA* (A), *SLIT2* (B) e *PRG1A* (C) * $p < 0,05$.

Discussão

5. Discussão

Nosso estudo avaliou se o cocultivo das MSCs com blastos leucêmicos altera o fenótipo e o metabolismo dos últimos. Este estudo é o primeiro que comparou a capacidade de MSCs provenientes de indivíduos saudáveis com MSCs isoladas de amostras de pacientes diagnosticados com LMA quanto à capacidade de manutenção do metabolismo energético das células leucêmicas *in vitro*.

Nossos resultados demonstram que após o cocultivo, as células leucêmicas presentes no sobrenadante (Fração A) apresentaram um aumento na proliferação celular significativamente maior no cocultivo com MSCs provenientes de pacientes com LMA em comparação com o cocultivo com as MSCs saudáveis. Somado a este achado, detectamos que as células leucêmicas que mantinham contato superficial com as MSCs leucêmicas (presentes na fração B) apresentaram uma redução nos níveis de superóxido mitocondrial e do número de mitocôndrias, com discreto aumento da proliferação celular, embora o mesmo não fosse evidenciado quando os blastos foram cocultivados com as MSCs saudáveis.

Estudos recentes descreveram a capacidade que as células do nicho hematopoiético possuem de auxiliar na manutenção da viabilidade das células leucêmicas, sobretudo durante os ciclos de quimioterapia (ITO et al., 2015). Atualmente, o principal regime quimioterápico utilizado para o tratamento de LMA inclui altas doses de citarabina associada a uma antraciclina, e dentre os múltiplos efeitos este tratamento leva a uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio nas células leucêmicas, culminando em uma catástrofe metabólica e indução da morte celular (DE THÉ; LE BRAS; LALLEMAND-BREITENBACH, 2012). Deste modo, é possível imaginar que frente a uma condição de elevado estresse celular, o mecanismo de troca de mitocôndrias, descrito por Ludin e cols., (LUDIN et al., 2014) sugere que as células mesenquimais auxiliariam às células malignas a manter seu metabolismo energético e sobrevivência, indiretamente favorecendo a recaída da doença. Nossos dados, corroboram os dados de Ludin e cols. (LUDIN et al., 2014), por mostrar que as MSCs isoladas de pacientes com LMA possuem uma capacidade superior de redução de espécies reativas de oxigênio, e em particular o superóxido mitocondrial nas células leucêmicas, provavelmente mediadas pela maior capacidade de troca de mitocôndrias (LUDIN et al., 2014).

A população de células em contato íntimo com as MSCs (Fração C) foi descrita por se manter com fenótipo mais imaturo (JING et al., 2010), favorecendo o processo de

expansão clonal, sendo isto comprovado utilizando modelos *in vivo* de transplantes seriados (FOLKERTS et al., 2017). Nossos resultados mostraram que após o cocultivo com MSCs leucêmicas, as células de LMA apresentaram uma redução nos níveis totais de espécies reativas de oxigênio e superóxido mitocondrial de modo superior ao que é observado no cocultivo com MSCs saudáveis. Este fenômeno é provavelmente mediado pelo processo de troca de mitocôndrias, visto que as células leucêmicas na presença de mesenquimais leucêmicas tiveram um acréscimo de 30% no montante de mitocôndrias sendo que este processo foi maior nas células leucêmicas cultivadas na presença de MSCs de indivíduos com LMA que nas cultivadas com MSCs saudáveis (LUDIN et al., 2014). Este achado reforça a teoria de que ao longo do desenvolvimento da doença, as células leucêmicas promovem uma modulação do microambiente medular de modo a este passar a apresentar uma capacidade de apoio às células leucêmicas superior que ao encontrado em condições fisiológicas (AGGARWAL; PITTENGER, 2005; RAAIJMAKERS et al., 2010; KODE et al., 2014). Diversos estudos mostram que com o desenvolvimento do processo leucêmico, os blastos leucêmicos secretam diversas citocinas e fatores de crescimento, como a SCF, IL-4, IL-6 e IL-b, promovendo uma mudança na plasticidade celular das células que compõe o nicho medular e auxiliando no estabelecimento da doença (DE BOER et al., 2018). Assim, de maneira análoga, supõe-se que estes blastos modulem as MSCs, conferindo maior capacidade de suporte à doença.

A avaliação da expressão de genes relacionados com a capacidade imunomodulatória das MSCs revelou que estas células isoladas de pacientes com LMA apresentavam menores níveis de expressão dos genes *SLIT2* e *PRGC1A*, embora não tenha sido observada diferença entre os níveis de *TNFA*, responsável por codificar a citocina TNF α . A proteína *SLIT2*, previamente descoberta por seu importante papel no processo de neurogênese, têm sido descrita como um modulador negativo da proliferação celular em diversos tipos de câncer (LI et al., 2017; WANG et al., 2018). Em particular no âmbito da leucemia mielóide aguda, nosso grupo de pesquisa demonstrou que a presença do peptídeo Slit2 correlacionou-se a uma maior taxa de apoptose, associada à parada do ciclo celular na fase S, menor capacidade de proliferação celular e de formação de colônias em células de leucemia promielocítica aguda (Manuscrito em preparo). Deste modo, sugere-se que a redução da expressão do gene *SLIT2* nas MSCs provenientes de pacientes com LMA, esteja associada a uma menor secreção do peptídeo no meio extracelular e isso favoreça a proliferação celular

das células leucêmicas. Contudo, é importante destacar que nosso trabalho avaliou apenas os níveis de transcritos, e que a avaliação do peptídeo secretado é de extrema importância para validação destes achados, visto que diversos mecanismos podem modular o desfecho da expressão gênica (TIWARI et al., 2018).

A proteína PGC1 α , é responsável pela indução do processo de divisão mitocondrial (HASAN-OLIVE et al., 2018). Recentemente, o trabalho de Marlein e cols., (MARLEIN et al., 2018) demonstrou que o cocultivo de células leucêmicas com MSCs resultou em acréscimo da expressão do *PRGC1A*, e isto esteve associado com aumento da massa mitocondrial total nas células mesenquimais. Os autores demonstraram que quando o gene *PRGC1A* foi silenciado nas MSCs, as mesmas tornaram-se incapazes de aumentar sua massa mitocondrial. Nossos achados demonstraram que as células mesenquimais provenientes de pacientes com LMA apresentaram uma expressão reduzida do *PRGC1A*. Não está claro na literatura se as MSCs aumentam sua massa mitocondrial antes da transferência às células leucêmicas, portanto o resultado aqui descrito tem significado incerto. Portanto, será importante determinar no futuro a expressão desse gene em um ensaio de cocultivo. Associado a isto, faz-se necessária à avaliação de outros efetores do processo de biogênese e proliferação mitocondrial.

Um crescente número de trabalhos tem buscado entender o papel do microambiente medular, com destaque para as MSCs, adipócitos e macrófagos, na manutenção das células leucêmicas e promoção do processo de recaída das leucemias mielóides agudas (ITO et al., 2015). Recentemente, o trabalho de Zhou e cols. demonstrou que o uso de drogas direcionadas às células do nicho auxiliou na manutenção da remissão em modelos *in vivo* de LMA, por reduzir a resistência dos blastos leucêmicos às principais terapêuticas utilizadas (ZHOU et al., 2017). Assim, nosso trabalho visou elucidar como as células mesenquimais de pacientes com LMA atuam na manutenção da doença e tentando fornecer caminhos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que auxiliem nos principais regimes utilizados nos dias atuais, favorecendo a obtenção de melhores taxa de remissão e manutenção de longo prazo.

Conclusões

6. Conclusões

As células mesenquimais obtidas de pacientes com leucemia mielóide aguda induziram uma maior proliferação de células de linhagens de LMA nas frações A e B em comparação as células mesenquimais de indivíduos saudáveis.

A produção de ROS total foi menor nas células leucêmicas da fração C na presença de MSCs de pacientes com LMA. Além disso, esse achado foi associado ao maior número de mitocôndrias nessa fração. No conjunto, nossos resultados sugerem que células mesenquimais de pacientes com LMA tem comportamento distinto aquele das MSCs de indivíduos saudáveis na sua interação com as células leucêmicas em particular com aquelas que estabelecem contato íntimo.

7. Referências

- AGGARWAL, S.; PITTENGER, M. F. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1815–1822, 15 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15494428>>. Acesso em: 7 out. 2018.
- ARBER, D. A.; ORAZI, A.; HASSERJIAN, R.; THIELE, J.; BOROWITZ, M. J.; LE BEAU, M. M.; BLOOMFIELD, C. D.; CAZZOLA, M.; VARDIMAN, J. W. **The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia**. [s.l: s.n.]v. 127
- COLMONE, A.; AMORIM, M.; PONTIER, A. L.; WANG, S.; JABLONSKI, E.; SIPKINS, D. A. Supporting Online Material Leukemic Cells Create Bone Marrow Niches That Disrupt the Behavior of Normal Hematopoietic Progenitor Cells. 2008. Disponível em: <www.sciencemag.org/cgi/content/full/322/5909/1857/DC1>. Acesso em: 2 out. 2018.
- COUTU, D. L.; FRANCOIS, M.; GALIPEAU, J. Inhibition of cellular senescence by developmentally regulated FGF receptors in mesenchymal stem cells. **Blood**, v. 117, n. 25, p. 6801–6812, 23 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21527526>>. Acesso em: 7 out. 2018.
- DANG, L.; JIN, S.; SU, S. M. IDH mutations in glioma and acute myeloid leukemia. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, n. 9, p. 387–397, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20692206>>. Acesso em: 7 out. 2018.
- DE BOER, B.; PRICK, J.; PRUIS, M. G.; KEANE, P.; IMPERATO, M. R.; JAQUES, J.; BROUWERS-VOS, A. Z.; HOGELING, S. M.; WOOLTHUIS, C. M.; NIJK, M. T.; DIEPSTRA, A.; WANDINGER, S.; VERSELE, M.; ATTAR, R. M.; COCKERILL, P. N.; HULS, G.; VELLENGA, E.; MULDER, A. B.; BONIFER, C.; SCHURINGA, J. J. Prospective Isolation and Characterization of Genetically and Functionally Distinct AML Subclones. **Cancer Cell**, v. 34, n. 4, p. 674–689.e8, 6 out. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30245083>>. Acesso em: 8 out. 2018.
- DE THÉ, H.; LE BRAS, M.; LALLEMAND-BREITENBACH, V. The cell biology of disease: Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies. **The Journal of cell biology**, v. 198, n. 1, p. 11–21, 9 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22778276>>. Acesso em: 8 out. 2018.
- DI NICOLA, M.; CARLO-STELLA, C.; MAGNI, M.; MILANESI, M.; LONGONI, P. D.; MATTEUCCI, P.; GRISANTI, S.; GIANNI, A. M. **Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.bloodjournal.org>. Acesso em: 7 out. 2018.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14653240600855905>>.
- ERKELAND, S. J.; PALANDE, K. K.; VALKHOF, M.; GITS, J.; OORSCHOT, A. D.; TOUW, I. P. The gene encoding thioredoxin-interacting protein (TXNIP) is a frequent virus integration site in virus-induced mouse leukemia and is overexpressed in a subset of AML patients. **Leukemia Research**, v. 33, n. 10, p. 1367–1371, out. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19327827>>. Acesso em: 7 out. 2018.
- FOLKERTS, H.; HILGENDORF, S.; WIERENGA, A. T. J.; JAQUES, J.; MULDER, A. B.; COFFER, P. J.; SCHURINGA, J. J.; VELLENGA, E. Inhibition of autophagy as a treatment strategy for p53 wild-type acute myeloid leukemia. **Cell Death and Disease**, v. 8, n. 7, p. e2927, 13 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28703806>>. Acesso em: 8 out. 2018.
- FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393–403, 1970. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x>>.

GARRIDO, S. M.; APPELBAUM, F. R.; WILLMAN, C. L.; BANKER, D. E. Acute myeloid leukemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). **Experimental hematology**, v. 29, n. 4, p. 448–57, abr. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11301185>>. Acesso em: 2 out. 2018.

HARRIS, J. M.; ESAIN, V.; FRECHETTE, G. M.; HARRIS, L. J.; COX, A. G.; CORTES, M.; GARNAAS, M. K.; CARROLL, K. J.; CUTTING, C. C.; KHAN, T.; ELKS, P. M.; RENSHAW, S. A.; DICKINSON, B. C.; CHANG, C. J.; MURPHY, M. P.; PAW, B. H.; VANDER HEIDEN, M. G.; GOESSLING, W.; NORTH, T. E. Glucose metabolism impacts the spatiotemporal onset and magnitude of HSC induction in vivo. **Blood**, v. 121, n. 13, p. 2483–2493, 28 mar. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341543>>. Acesso em: 7 out. 2018.

HASAN-OLIVE, M. M.; LAURITZEN, K. H.; ALI, M.; RASMUSSEN, L. J.; STORM-MATHISEN, J.; BERGERSEN, L. H. A Ketogenic Diet Improves Mitochondrial Biogenesis and Bioenergetics via the PGC1 α -SIRT3-UCP2 Axis. **Neurochemical Research**, 19 jul. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30027365>>. Acesso em: 9 out. 2018.

HAZLEHURST, L. A.; VALKOV, N.; WISNER, L.; STOREY, J. A.; BOULWARE, D.; SULLIVAN, D. M.; DALTON, W. S. Reduction in drug-induced DNA double-strand breaks associated with beta1 integrin-mediated adhesion correlates with drug resistance in U937 cells. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1897–903, 15 set. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11535527>>. Acesso em: 2 out. 2018.

HOLE, P. S.; DARLEY, R. L.; TONKS, A. Do reactive oxygen species play a role in myeloid leukemias? **Blood**, v. 117, n. 22, p. 5816–26, 2 jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21398578>>. Acesso em: 7 out. 2018.

HOLE, P. S.; PEARN, L.; TONKS, A. J.; JAMES, P. E.; BURNETT, A. K.; DARLEY, R. L.; TONKS, A. Ras-induced reactive oxygen species promote growth factor-independent proliferation in human CD34+ hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v. 115, n. 6, p. 1238–1246, 11 fev. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007804>>. Acesso em: 7 out. 2018.

HORWITZ, E. M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S.; KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7, n. 5, p. 393–395, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14653240500319234>>.

HOUTHUIZEN, J. M.; DAENEN, L. G. M.; ROODHART, J. M. L.; VOEST, E. E. The role of mesenchymal stem cells in anti-cancer drug resistance and tumour progression. **British journal of cancer**, v. 106, n. 12, p. 1901–6, 5 jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22596239>>. Acesso em: 7 out. 2018.

ITKIN, T.; LUDIN, A.; GRADUS, B.; GUR-COHEN, S.; KALINKOVICH, A.; SCHAJNOVITZ, A.; OVADYA, Y.; KOLLET, O.; CANAANI, J.; SHEZEN, E.; COFFIN, D. J.; ENIKOLOPOV, G. N.; BERG, T.; PIACIBELLO, W.; HORNSTEIN, E.; LAPIDOT, T. FGF-2 expands murine hematopoietic stem and progenitor cells via proliferation of stromal cells, c-Kit activation, and CXCL12 down-regulation. **Blood**, v. 120, n. 9, p. 1843–1855, 30 ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22645180>>. Acesso em: 7 out. 2018.

ITO, K.; HIRAO, A.; ARAI, F.; MATSUOKA, S.; TAKUBO, K.; HAMAGUCHI, I.; NOMIYAMA, K.; HOSOKAWA, K.; SAKURADA, K.; NAKAGATA, N.; IKEDA, Y.; MAK, T. W.; SUDA, T. Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 431, n. 7011, p. 997–1002, 21 out. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496926>>. Acesso em: 7 out. 2018.

ITO, K.; HIRAO, A.; ARAI, F.; TAKUBO, K.; MATSUOKA, S.; MIYAMOTO, K.; OHMURA, M.; NAKA, K.; HOSOKAWA, K.; IKEDA, Y.; SUDA, T. Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. **Nature Medicine**, v. 12, n. 4, p. 446–451, 26 abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16565722>>. Acesso em: 5 out. 2018.

ITO, S.; BARRETT, A. J.; DUTRA, A.; PAK, E.; MINER, S.; KEYVANFAR, K.; HENSEL, N. F.;

- REZVANI, K.; MURANSKI, P.; LIU, P.; MELENHORST, J. J.; LAROCHELLE, A. Long term maintenance of myeloid leukemic stem cells cultured with unrelated human mesenchymal stromal cells. **Stem Cell Research**, v. 14, n. 1, p. 95–104, 1 jan. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1873506114001433?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 out. 2018.
- JANG, Y.-Y.; SHARKIS, S. J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. **Blood**, v. 110, n. 8, p. 3056–3063, 15 out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17595331>>. Acesso em: 7 out. 2018.
- JING, D.; FONSECA, A. V.; ALAKEL, N.; FIERRO, F. A.; MULLER, K.; BORNHAUSER, M.; EHNINGER, G.; CORBEIL, D.; ORDEMANN, R. Hematopoietic stem cells in co-culture with mesenchymal stromal cells -modeling the niche compartments in vitro. **Haematologica**, v. 95, n. 4, p. 542–550, 2010.
- KODE, A.; MANAVALAN, J. S.; MOSIALOU, I.; BHAGAT, G.; RATHINAM, C. V.; LUO, N.; KHIABANIAN, H.; LEE, A.; MURTY, V. V.; FRIEDMAN, R.; BRUM, A.; PARK, D.; GALILI, N.; MUKHERJEE, S.; TERUYA-FELDSTEIN, J.; RAZA, A.; RABADAN, R.; BERMAN, E.; KOUSTENI, S. Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. **Nature**, v. 506, n. 7487, p. 240–244, 15 fev. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24429522>>. Acesso em: 2 out. 2018.
- LAMBETH, J. D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 3, p. 181–189, 1 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039755>>. Acesso em: 7 out. 2018.
- LI, G.-J.; YANG, Y.; YANG, G.-K.; WAN, J.; CUI, D.-L.; MA, Z.-H.; DU, L.-J.; ZHANG, G.-M. Slit2 suppresses endothelial cell proliferation and migration by inhibiting the VEGF-Notch signaling pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p. 1981–1988, mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28260032>>. Acesso em: 9 out. 2018.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>. Acesso em: 2 out. 2018.
- LUDIN, A.; GUR-COHEN, S.; GOLAN, K.; KAUFMANN, K. B.; ITKIN, T.; MEDAGLIA, C.; LU, X.-J.; LEDERGOR, G.; KOLLET, O.; LAPIDOT, T. Reactive Oxygen Species Regulate Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal, Migration and Development, As Well As Their Bone Marrow Microenvironment. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 11, p. 1605–1619, 2014. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ars.2014.5941>>.
- MARALDI, T.; PRATA, C.; FIORENTINI, D.; ZAMBONIN, L.; LANDI, L.; HAKIM, G. Induction of apoptosis in a human leukemic cell line via reactive oxygen species modulation by antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 2, p. 244–252, 15 jan. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19013234>>. Acesso em: 7 out. 2018.
- MARLEIN, C. R.; ZAITSEVA, L.; PIDDOCK, R. E.; RASO-BARNETT, L.; SCOTT, M. A.; INGHAM, C. J.; COLLINS, A.; BOWLES, K. M.; RUSHWORTH, S. A. PGC-1 α driven mitochondrial biogenesis in stromal cells underpins mitochondrial trafficking to leukemic blasts. **Leukemia**, v. 32, n. 9, p. 2073–2077, 20 set. 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41375-018-0221-y>>. Acesso em: 8 out. 2018.
- MATSUNAGA, T.; TAKEMOTO, N.; SATO, T.; TAKIMOTO, R.; TANAKA, I.; FUJIMI, A.; AKIYAMA, T.; KURODA, H.; KAWANO, Y.; KOBUNE, M.; KATO, J.; HIRAYAMA, Y.; SAKAMAKI, S.; KOHDA, K.; MIYAKE, K.; NIITSU, Y. Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia. **Nature Medicine**, v. 9, n. 9, p. 1158–1165, 3 set. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897778>>. Acesso em: 2 out. 2018.
- MEADS, M. B.; HAZLEHURST, L. A.; DALTON, W. S. The Bone Marrow Microenvironment as a

Tumor Sanctuary and Contributor to Drug Resistance. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 9, p. 2519–2526, 1 maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18451212>>. Acesso em: 2 out. 2018.

MOSS, H. e. **Fundamentos em Hematologia**. 6ª edição ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

NERVI, B.; RAMIREZ, P.; RETTIG, M. P.; UY, G. L.; HOLT, M. S.; RITCHEY, J. K.; PRIOR, J. L.; PIWNICA-WORMS, D.; BRIDGER, G.; LEY, T. J.; DIPERSIO, J. F. Chemosensitization of acute myeloid leukemia (AML) following mobilization by the CXCR4 antagonist AMD3100. **Blood**, v. 113, n. 24, p. 6206–6214, 11 jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19050309>>. Acesso em: 2 out. 2018.

RAAIJMAKERS, M. H. G. P.; MUKHERJEE, S.; GUO, S.; ZHANG, S.; KOBAYASHI, T.; SCHOONMAKER, J. A.; EBERT, B. L.; AL-SHAHROUR, F.; HASSERJIAN, R. P.; SCADDEN, E. O.; AUNG, Z.; MATZA, M.; MERKENSCHLAGER, M.; LIN, C.; ROMMENS, J. M.; SCADDEN, D. T. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. **Nature**, v. 464, n. 7290, p. 852–857, 21 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20305640>>. Acesso em: 2 out. 2018.

REDDY, M. M.; FERNANDES, M. S.; SALGIA, R.; LEVINE, R. L.; GRIFFIN, J. D.; SATTLER, M. NADPH oxidases regulate cell growth and migration in myeloid cells transformed by oncogenic tyrosine kinases. **Leukemia**, v. 25, n. 2, p. 281–289, 12 fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21072051>>. Acesso em: 7 out. 2018.

RIZO, A.; OLTROF, S.; HAN, L.; VELLENGA, E.; HAAN, G. De; SCHURINGA, J. J. Repression of BMI1 in normal and leukemic human CD34(+) cells impairs self-renewal and induces apoptosis. **Blood**, v. 114, n. 8, p. 1498–1506, 2009.

SATTLER, M.; WINKLER, T.; VERMA, S.; BYRNE, C. H.; SHRIKHANDE, G.; SALGIA, R.; GRIFFIN, J. D. Hematopoietic growth factors signal through the formation of reactive oxygen species. **Blood**, v. 93, n. 9, p. 2928–2935, 1999.

STRAUSSMAN, R.; MORIKAWA, T.; SHEE, K.; BARZILY-ROKNI, M.; QIAN, Z. R.; DU, J.; DAVIS, A.; MONGARE, M. M.; GOULD, J.; FREDERICK, D. T.; COOPER, Z. A.; CHAPMAN, P. B.; SOLIT, D. B.; RIBAS, A.; LO, R. S.; FLAHERTY, K. T.; OGINO, S.; WARGO, J. A.; GOLUB, T. R. Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. **Nature**, v. 487, n. 7408, p. 500–504, 4 jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22763439>>. Acesso em: 2 out. 2018.

TIWARI, N.; PATASKAR, A.; PÉRON, S.; THAKURELA, S.; SAHU, S. K.; FIGUERES-OÑATE, M.; MARICHAL, N.; LÓPEZ-MASCARAQUE, L.; TIWARI, V. K.; BERNINGER, B. Stage-Specific Transcription Factors Drive Astroglialogenesis by Remodeling Gene Regulatory Landscapes. **Cell Stem Cell**, v. 23, n. 4, p. 557–571.e8, 4 out. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30290178>>. Acesso em: 9 out. 2018.

WANG, Y.; ZHANG, S.; BAO, H.; MU, S.; ZHANG, B.; MA, H.; MA, S. MicroRNA-365 promotes lung carcinogenesis by downregulating the USP33/SLIT2/ROBO1 signalling pathway. **Cancer Cell International**, v. 18, n. 1, p. 64, 1 dez. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29743814>>. Acesso em: 9 out. 2018.

WARD, P. S.; PATEL, J.; WISE, D. R.; ABDEL-WAHAB, O.; BENNETT, B. D.; COLLIER, H. A.; CROSS, J. R.; FANTIN, V. R.; HEDVAT, C. V.; PERL, A. E.; RABINOWITZ, J. D.; CARROLL, M.; SU, S. M.; SHARP, K. A.; LEVINE, R. L.; THOMPSON, C. B. The Common Feature of Leukemia-Associated IDH1 and IDH2 Mutations Is a Neomorphic Enzyme Activity Converting α -Ketoglutarate to 2-Hydroxyglutarate. **Cancer Cell**, v. 17, n. 3, p. 225–234, 16 mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171147>>. Acesso em: 7 out. 2018.

WARDMAN, P. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 7, p. 995–1022, 1 out. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17761297>>.

Acesso em: 7 out. 2018.

WATANABE, R.; NAKAMURA, H.; MASUTANI, H.; YODOI, J. Anti-oxidative, anti-cancer and anti-inflammatory actions by thioredoxin 1 and thioredoxin-binding protein-2. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 127, n. 3, p. 261–270, set. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20435060>>. Acesso em: 7 out. 2018.

ZENG, Z.; SAMUDIO, I. J.; MUNSELL, M.; AN, J.; HUANG, Z.; ESTEY, E.; ANDREEFF, M.; KONOPLEVA, M. Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 12, p. 3113–3121, 1 dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17172414>>. Acesso em: 2 out. 2018.

ZHOU, B. O.; YU, H.; YUE, R.; ZHAO, Z.; RIOS, J. J.; NAVEIRAS, O.; MORRISON, S. J. Bone marrow adipocytes promote the regeneration of stem cells and haematopoiesis by secreting SCF. **Nature cell biology**, v. 19, n. 8, p. 891–903, 17 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/ncb3570>>. Acesso em: 9 out. 2018.

ZHOU, F.-L.; ZHANG, W.-G.; WEI, Y.-C.; MENG, S.; BAI, G.-G.; WANG, B.-Y.; YANG, H.-Y.; TIAN, W.; MENG, X.; ZHANG, H.; CHEN, S.-P. Involvement of oxidative stress in the relapse of acute myeloid leukemia. **The Journal of biological chemistry**, v. 285, n. 20, p. 15010–5, 14 maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20233720>>. Acesso em: 7 out. 2018.