Simone Vieira da Costa

Participação de proteínas tirosina quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) na indução do fator inibidor de leucemia (LIF) em células estromais da medula óssea de crianças com Síndromes Mielodisplásicas (SMD)

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Mitzi Brentani

São Paulo

2008

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família - meus pais, irmãos e minha irmã pelo apoio incondicional de sempre, em especial a minha mãe, meu exemplo de vida, de infinita bondade...

À minha orientadora Prof^a. Dr^a Maria Mitzi Brentani por sua brilhante contribuição intelectual, confiança e carinho demonstrado durante a realização deste trabalho, minha eterna admiração e gratidão.

À Dr^a. Rosimeire Aparecida Roela, agradeço por sua co-orientação constante, carinho e por sempre acreditar, muito obrigada.

Ao Dr. Roberto Guarniero do Departamento de Ortopedia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao Dr. Luiz Fernando Lopes (Departamento de Pediatria do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer AC. Camargo (SP)), pela obtenção do material deste estudo.

Agradeço a Mara de Souza Junqueira pela fundamental ajuda na realização dos ensaios de western blotting bem como nos detalhes finais de deste trabalho e amizade.

Às Dr^a Walcy Rosolia Teodoro e a Dr^a Ana Paula Pereira Velosa, do laboratório de matriz extracelular pela disposição em ajudar no processo de Liofilização e claro pelo carinho constante.

À minha querida amiga Cintia Milani por seu exemplo de responsabilidade e dedicação, na formatação deste trabalho, além das muitas horas de ombro amigo.

Às Dras. Maria Lúcia Hirata Katayama, Fátima Solange Pasini, Simone Maistro, Natália Bromberg e a aluna Suzana Terume Honda pelos agradáveis momentos de descontração e prontidão em ajudar.

À minha sempre presente amiga Dr^a. Flávia R. R. Mangone por toda ajuda, carinho e compreensão em momentos difíceis.

À Dr^a Patrícia Bortmam Rosencham, por todo apoio e amizade..

À Elizangela Nirvando Dias e Rosilene Arruda pelo carinho e ajuda nos assuntos burocráticos.

À Maria Cristina Piñero Grandal pelo cuidado e disposição com que tratou da parte ilustrativa deste trabalho.

Aos Srs Jair Cláudio, Wilame Macedo e Ivonete Lima pela cooperação e agradável convívio diário.

À Sr^a Maria José Gonçalves Benevides pelo carinho, dedicação, auxílio nas questões administrativas e por seu caloroso abraço de bom dia.

À todos os professores, doutores, pós graduandos, aprimorandos e estagiários do laboratório, os quais independentes do foco de estudo,

compõem um só grupo “Oncologia”, agradeço pelo agradável convívio e por contribuírem direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Meu agradecimento especial aos responsáveis dos pacientes descritos neste trabalho, os quais embora em momentos difíceis entenderam a importância deste estudo.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Por fim, agradeço a Deus pelo dom da vida.

Sumário

Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	vi
Lista de Tabelas.....	vii
Resumo.....	ix
Summary.....	xii
1-Introdução.....	pág 1
2-Objetivos.....	pág 16
3-Casuística.....	pág 19
4-Métodos.....	pág 21
5-Resultados.....	pág 34
6-Discussão.....	pág 50
7-Conclusões.....	pág 56
8- Anexo.....	pág 57
9-Referências.....	pág 59

Agradecimientos

Lista de Abreviaturas

µg	microgramas
µl	microlitros
µM	micromolar
APS	Persulfato de amônio
BSA	Albumina de soro bovino
CCC	Sistema Categoria, Citologia, Citogenética
CD95/FAZ	Proteína codificada por 1 gene específico, expresso em células do sistema imune
cDNA	DNA complementar
CMML	Leucemia mielomonocítica crônica
CSF	Fator estimulador de crescimento
CREB	Regulador transcricional
D.O.	Densidade ótica
DEPC	água deionizada tratada com dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxiribonucleotídeos
DTT	Ditiotreitol
ECL	High performance chimiluminescence film
EDTA	Ácido etileno diamino tetracético
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular

FAB	Grupo Cooperativo Franco-Americano-Inglês
Grb2	Proteína unida ao receptor do fator de crescimento
GTP	Trifosfato de guanosina
GDPase	Enzima que converte GTP a GDP
H ₂ O MQ	Água ultrapura purificada pelo sistema Millipore
HS-5	Linhagem de células estromais da medula óssea humana
HSC	Células progenitoras hematopoética
IL-1 β	Interleucinas-1 beta
IL-1 α	Interleucinas-1 alfa
IL-6	Interleucinas-6
IMDM	Iscoe's Modified Dubelcco's Médium
JAK	Janus proteína tirosina quinase
JNK	Proteínas quinases c-jun NH ₂ -terminal
kDa	Quilo Dalton
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
M	Molar
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAPKK	Proteína quinase quinase ativada por mitógeno
MAPKKK	Proteína quinase quinase quinase ativada por mitógeno
MDA-MB231	Célula derivada de efusão pleural de paciente com câncer de mama metastático
ml	Mililitro

mM	Milimolar
ng	nanograma
°C	Grau Celsius
PBS	Solução tampão de salina fosfato
PBS-EDTA	Tampão de salina fosfato contendo 2mM de ácido etilenodiamino
PCR Real Time	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
PVDF	<i>Hydrophobic Polyvinylidene Difloride</i>
RAEB	Anemia refratária com excesso de blastos
RAEB-I	Anemia refratária com excesso de blastos I (5-9% de blastos na medula óssea)
RAEB-II	Anemia refratária com excesso de blastos II (10-19% de blastos na medula óssea)
RAEB-T	Anemia refratária com excesso de blastos em transformação
RARS	Anemia refratária com anéis de sideroblastos
Ras/Rho	Família de proteínas G monomérica envolvidas na regulação de várias funções celulares
RCMD	Citopenia refratária com displasia em várias linhagens
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
Rnase A	Ribonuclease A
RNA _{sin}	Inibidor de RNase

RPA	Ensaio de proteção de ribonuclease
RPM	Rotações por minuto
RT	Enzima Transcriptase Reversa
RTK	Receptor tirosina quinase
RSKs	Quinase ribossomal (S6)
SDS	Docecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMD/LMA	Síndrome Mielodisplásica associada à Leucemia Mielóide Aguda
SOCs	Proteínas supressoras de sinalização de citocinas
STATS	Proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição
TEMED	N, N, N, N tetra metiletilenodiamina
TNF	Fator de necrose tumoral
TYK	Membro da família das proteínas tirosina quinase
UV	Luz ultravioleta
V	Voltz
WHO	Organização Mundial da Saúde

Lista de Figuras

Figura 01.....	pág 2
A SMD constitui um complexo agrupamento de doenças de células progenitoras.	
Figura 02.	pág 36
Indução temporal da expressão de LIF mRNA pela adição de soro fetal bovino.	
Figura 03.....	pág 37
Indução temporal da expressão de LIF proteína pela adição de soro fetal bovino.	
Figura 04.....	pág 39
Indução da expressão de LIF proteína pela adição de soro em células saudáveis (CT1 e CT2) na presença de inibidores.	
Figura 05.	pág 41
Indução da expressão de LIF proteína pela adição de soro em células SMD-LMA na presença de inibidores.	
Figura 06.	pág 42
Indução da expressão de LIF proteína pela adição de soro em células SMD1 na presença de inibidores.	

Figura 07pág 44

Atividade de p38 em células de crianças saudáveis (CT1).

Atividade de ERK em células estromais de crianças saudáveis (CT1).

Figura 08pág 45

Atividade de p38 em células de crianças saudáveis (CT2).

Atividade de p38 células de crianças saudáveis (CT2).

Figura 09pág 46

Atividade de p38 em células estromais de crianças com SMD (SMD1).

Atividade de ERK em células estromais de crianças com SMD (SMD1).

Figura 10pág 47

Atividade de p38 em células estromais de crianças com SMD (SMD2).

Atividade de ERK em células estromais de crianças com SMD (SMD2).

Figura 11pág 48

Atividade de p38 em células estromais de crianças com SMD/LMA.

Atividade de ERK em células estromais de crianças com SMD-LMA.

Lista de Tabelas

Tabela 01.....pág 5

Classificação da Organização Mundial da Saúde
(WHO).

Tabela 02.pág 12

Membros da família das MAPKs.

Tabela 03.pág 19

Característica das crianças com SMD e
SMD-LMA.

Resumo

Costa, Simone Vieira da. *Participação da proteína tirosina quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) na indução do fator inibidor de leucemia (LIF) em células estromais da medula óssea de crianças com Síndromes Mielodisplásicas (MDS)*. [Tese]. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Em nosso trabalho anterior mostramos que dentre as citocinas analisadas, os níveis do mRNA de LIF nas células estromais pediátricas, de SMD e de SMD-LMA foram maiores quando comparados às células estromais de crianças saudáveis. No presente estudo, observamos um aumento tempo dependente nos níveis da proteína LIF após adição de SFB em todas as células analisadas (células estromais de crianças saudáveis, de SMD e de SMD-LMA).

O envolvimento de p38, ERK e JNK na expressão LIF nestas células foi determinado pelo uso de inibidores dos membros das proteínas quinase ativadas por mitógenos: ERK (PD98059), p38 (SB302580) e JNK (SP600125) os quais inibiram a produção de LIF nas células estromais de crianças saudáveis, após estas serem estimuladas por SFB. No entanto, os níveis da expressão de LIF-induzido por soro nas células estromais de SMD e de SMD-LMA tratadas com SB302580 (p38) foram significativamente diminuídos, em comparação com a inibição observada no tratamento com PD98059 e SP600125 ($p < 0.0001$, teste ANOVA).

Em adição analisamos as formas fosforiladas de p38 e ERK, após 48hs na ausência ou na presença de soro por diferentes tempos. Níveis de

atividade de ERK e do p38 foram inicialmente elevados na ausência de soro. A atividade de p38 foi sustentada após tratamento com SFB, entretanto, ERK apresentou uma variação de atividade durante o tratamento. Sugerimos que a sinalização das MAPKs (p38, ERK e JNK), em resposta a fatores de crescimento presentes no soro, parece desempenhar um papel importante na expressão da LIF em células estromais de crianças saudáveis, mas a sinalização do p38 parece ser funcionalmente mais importante nas mielodisplasias ou naquelas associadas à LMA.

Descritores: 1. Síndrome Mielodisplásica infantil; 2 fator inibidor de leucemia (LIF); 3. células estromais da medula óssea; 4. MAPK; 5. p38.

Summary

Costa, Simone Vieira da. *Participation of protein tyrosine kinase activated by mitógenos (MAPKs) in the induction of the inhibitory factor for leukemia (LIF) stromal cells in the bone marrow of children with Myelodysplastic Syndromes (MDS)*. [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Our previous report showed that among the cytokines analysed, LIF mRNA levels in stromal cells from pediatric MDS and MDS-AML were higher as compared to those found in healthy stromal cells. In the present study, we have observed an increased protein LIF levels in a time dependent manner after FCS stimulation in all stromal cells analysed (MDS, MDS-AML and healthy children) and the involvement of p38, ERK and JNK pathways in the LIF expression in these cells was determined.

In stromal cells from two healthy children, LIF production was equally inhibited in a dose dependent manner after FCS stimulation by mitogen-activated protein kinase (MAPKs) members inhibitors: ERK (PD98059), p38 (SB302580) and JNK (SP600125). However, in MDS and MDS-AML stromal cells, the levels of LIF-induced by serum, were significantly decreased by SB302580, as compared with the inhibition observed by treatment with PD98059 and SP600125 ($p < 0,001$, ANOVA test).

In addition we have analysed the presence of p38 and ERK phosphorylated forms in stromal cells, after 48hs of serum starvation or in the presence of FCS for different times. Activated ERK and p38MAPK levels were initially elevated in the absence of serum. p38MAPK activation was sustained

after treatment with FCS, whereas ERK presented a variation of the activated forms during treatment.

We suggest that the signalling of the MAPKs (p38, ERK and JNK) in response to growth factors present in the serum, seems to play an important role in the LIF expression by stromal cells of healthy children, but p38 MAPK signalling appears to be functionally more important in MDS and MDS-AML.

Descriptors: 1. Pediatric Myelodysplastic Syndromes; 2 leukemia factor inhibitor (LIF); 3. bone marrow stromal cells; 4. MAPKs; 5. p38.

Introdução

As Síndromes Mielodisplásicas (SMDs) compreendem um grupo heterogêneo de doenças em células progenitoras hematopoéticas caracterizada por hematopoese ineficiente, anormalidades qualitativa e quantitativa das linhagens celulares eritróides, mielóides e linhagens megacariocíticas (Polychronopoulou e col., 2004).

Embora observada com maior frequência em adultos com 70 anos de idade ou mais, em crianças, a SMD representa cerca de 3% a 9% de todos os males hematológicos. Com um pior prognóstico, as Síndromes Mielodisplásicas freqüentemente evoluem rapidamente à Leucemia Mielóide Aguda (LMA), em especial em crianças com Síndrome de Down (Elghetany, 2007). As SMDs pediátricas diferem das de adultos em muitos aspectos, dentre estes fatores clínicos e presença de anormalidades e alterações cromossomais.

Tanto em LMA como em SMD há uma reduzida produção de células normais, entretanto, na SMD essa redução afeta inicialmente uma única linhagem como observado em anemia refratária com anéis de sideroblastos (RARS). Porém, em anemia refratária com excesso de blastos (RAEB), com o tempo em anemia refratária com excesso de blastos (RAEB), essa redução é observada também em outras linhagens celulares. Na Leucemia Mielóide Aguda associada à Síndrome Mielodisplásica (SMD/LMA) essa redução se dá devido a um bloqueio nas células progenitoras, conforme observado na figura 1 (Corey e col., 2007).

(Corey e col., 2007)

Figura. 1. A SMD constitui um complexo agrupamento de doenças de células progenitoras.

Na literatura, há três sistemas de classificação das SMDs pediátricas: o Grupo Cooperativo Franco-Americano-Inglês (FAB); a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS); o sistema Categoria, Citologia, Citogenética (CCC) (Elghetany, 2007).

Em 1982, a FAB classificou a SMD em cinco subcategorias: Anemia Refratária (RA); RA com Anéis de Sideroblastos (RARS); RA com Excesso de Blastos (RAEB); RAEB em Transformações (RAEBT) e Leucemia Mielomonocítica Crônica (CMML) (Eva Hellström-Lindberg, Luca Malcocati, 2008). A atual classificação do WHO publicada em 2003 descreve como critérios para o diagnóstico das SMDs pediátricas, a presença de citopenias, displasia em mais de uma linhagem, anormalidades citogenéticas e uma contagem de blastos de 5% ou mais (Elghetany, 2007).

Os subgrupos classificados pela FAB de RA e RARS foram redefinidos com o objetivo de englobar casos com fatores displásicos somente na linhagem eritróide, e duas novas categorias: Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas linhagens sem (RCMD) ou com Anéis de Sideroblastos foram adicionadas. A mesma classificação ainda divide a categoria RAEB em dois novos subgrupos RAEB-I e RAEB-II baseando-se em 5-9% e 10-19% de blastos na medula óssea, respectivamente.

Pacientes com <5% de blastos na medula e isolada deleção do braço longo do cromossomo 5 constituem um subgrupo separado.

Posteriormente, um grupo das SMDs não classificada, caracterizada por displasia mielóide em uma única linhagem e com presença de 5 % de blastos na medula óssea foi introduzido.

A RAEBt, segundo critérios da WHO, foi incluída na classificação de Leucemia Mielóide Aguda (LMA) devido à similaridade de funções biológicas e estratégias de tratamento; e CMML foi incluída em uma nova categoria: Síndromes mieloproliferativas/mielodisplásicas (Hellström-Lindberg e Malcocati, 2008) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO)

Doença		Sangue	Medula óssea
Anemia refratária (RA)		Anemia; blastos raros/ausentes	Displasia eritróide <5% blastos;<15%anéis de sideroblastos
Anemia refratária com anéis de sideroblastos (RARS)		Anemia	Displasia eritróide <5% blastos;>15%anéis de sideroblastos
Citopenia refratária com displasia em multi linhagens (RCMD)		Citopenias; <1x10 ⁹ /L monócitos	Displasia em ≥ 2 linhagens <5% blastos;<15%anéis de sideroblastos
Citopenia refratária com displasia em multi linhagens (RCMD) e (RCMD – RS)		Citopenias; <1x10 ⁹ /L monócitos	Displasia em ≥ 2 linhagens; <5% blastos; ≥15%anéis de sideroblastos
Anemia refratária com excesso de blastos - I (RAEB-I)		Citopenias <5% blastos <1x10 ⁹ /L monócitos	Displasias em 1-3 linhagens 5% a 9% blastos
Anemia refratária		Citopenias	Displasias em 1-3

com excesso de	5% a 19% blastos	linhagens
blastos - II (RAEB-II)	<1x10 ⁹ /L monócitos	10% a 19% blastos
Síndrome	Citopenias	Displasia na linhagem
mielodisplásica não		celular neutrófila ou
classificada (SMD-		megacariócitos; <5%
U)		blastos
SMD associada a	Anemia;<5% blastos	Megacariócitos normal
del 5q	Plaquetas	ou aumentado; <5%
	aumentadas	blastos; isolada del 5q

(Hellström-Lindberg e Malcocati, 2008)

Um interessante paradoxo na SMD é a celularidade normal ou aumentada na medula óssea com presença de pancitopenia no sangue periférico, as quais têm sido atribuídas ao aumento da proliferação de células hematopoéticas contrabalanceada por simultâneo aumento de apoptose.

Citocinas exercem um papel importante na proliferação e diferenciação das células hematopoéticas durante a regulação da hematopoese normal. Nas SMDs, tem se observado elevados níveis de citocinas mielosupressoras e pró-inflamatórias no soro e na medula óssea de pacientes adultos com SMD (Navas e col., 2006). Sugeriu-se que um desequilíbrio entre citocinas de efeitos proliferativos ou apoptóticos, contribui para a manutenção da hematopoese deficiente (Sawanobori e col., 2003).

O aumento de apoptose nestas células parece estar associado ao aumento na sinalização através da via ativação das caspases. Macrófagos, elementos estromais ou linfócitos T citotóxicos podem produzir substâncias, tais como o fator de necrose tumoral (TNF) que estimulam os receptores de morte celular como CD95, também conhecido como Fas (Claessens e col., 2002; Campione e col., 2005).

O fator inibidor de leucemia (LIF) é uma glicoproteína pleiotrópica de 58 kDa, pertencente à família das interleucinas-6 (IL-6) está envolvida em várias atividades biológicas importantes tais como crescimento, diferenciação celular, metabolismo ósseo, caquexia, embriogênese e em processos inflamatórios (Chodorowska e col., 2004).

O LIF foi descrito por estimular a megacariopoese na linhagem leucêmica mielóide murina M1 e promover a sobrevivência e/ou proliferação de células precursoras hematopoéticas primitivas (Bilko e col., 2005). Citocinas como o LIF, produzidas por monócitos, fibroblastos, astrócitos, diferentes linhagens celulares tumorais e células mesenquimais (Göllner e col., 1999) são descritas na literatura como fundamentais na regulação de resposta imune e inflamatória, porém o excesso da produção destas citocinas contribui em parte para a hematopoese deficiente observada nas SMDs (Navas e col., 2006).

A ação do LIF se dá pela ligação direta a seu receptor (LIFR- β), porém este possui baixa afinidade, sendo assim se faz necessário que ocorra a heterodimerização com uma segunda molécula transmembrânica gp130, a qual foi originalmente identificada como um transdutor de sinalização da IL-6,

(Gearing e col., 1991) levando a formação de um complexo trimérico composto de LIF-LIFRbeta-gp130 (Kristensen e col., 2005). A ativação desse complexo, dá início a cascata de sinalização das Janus quinase (JAK)-STAT3 e a via de sinalização das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPK) (Cheng JG e col., 2001).

Muitos receptores de fatores de crescimento têm atividade intrínseca de tirosina quinase, mas os receptores de citocinas não as possuem e requerem o acoplamento de outras proteínas da família das tirosinas quinase. A ligação da citocina com seus respectivos receptores de superfície celular resulta em oligomerização do receptor e ativação da família Janus quinase (JAK). Essas quinases citoplasmáticas participam da sinalização de receptores celulares de superfície com perda intrínseca de atividade tirosina quinase. Quando ativadas as JAKs fosforilam o domínio citoplasmático do receptor iniciando a cascata de sinalização. As proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STATs) são então fosforiladas, dimerizadas e subsequentemente translocadas ao núcleo onde regulam a transcrição gênica (Valentino e Pierre, 2006).

Em 2005, Kristensen e colaboradores descreveu a STAT3 como a principal proteína envolvida na cascata de sinalização em células embriogênicas de camundongos após serem estimuladas por LIF (Kristensen e col., 2005).

O microambiente hematopoético, constituído por células estromais em especial miofibroblastos, adipócitos, células endoteliais, macrófagos e por células osteogênicas (Löwenberg B e col., 1999) é responsável pela produção

de fatores solúveis como fatores de crescimento, citocinas e componentes da matriz extracelular (Verfaillie e col., 1992; Koller e col., 1992), embora seu papel nas SMDs não esteja esclarecido. Vários estudos enfatizaram a participação das células estromais na manutenção da doença (revisado por Dührsen & Hossfeld, 1996). Por essa razão, o envolvimento de células estromais de origem não-hematopoética na fisiopatologia da SMD em crianças tem sido um dos focos de estudo pelo nosso grupo. Em estudos recentes, avaliamos a contribuição das células estromais no microambiente das SMDs e estas apresentaram uma tendência intrínseca em manter progenitores de células sangüíneas em estado não diferenciado, sustentando a proliferação e atraso da diferenciação terminal de linhagens mielóides (Borojevic e col., 2004).

Para melhor entender os mecanismos de progressão das SMDs e SMD/LMA determinamos em cultura primária de células estromais provenientes de medula óssea de crianças saudáveis (CT), com SMD e SMD/LMA a expressão diferencial de genes por cDNA microarray. Dentre os genes diferencialmente expressos observamos padrões de expressão específicos quando comparamos células estromais de CT, SMD e SMD/LMA sugerindo que estes genes possam estar associados ao processo de transformação e evolução para SMD/LMA. Estes genes foram agrupados em processos biológicos, tais como: a sinalização via GTPases, organização de microtúbulos, processamento de componentes da matriz extracelular, tráfico pela membrana citoplasmática e ao controle da formação de fusos mitóticos, todos importantes em vários processos celulares como ação de fatores

transcrpcionais, proliferação e apoptose (Roela e col., 2004).

Verificamos ainda pelo ensaio de proteção de ribonuclease (RPA) níveis elevados da expressão do LIF (RNA mensageiro) em cultura primária de células estromais provenientes da medula óssea de crianças com SMD e SMD/LMA se comparados a células estromais de crianças saudáveis (Roela e col., 2007). No entanto, o sinal que regula a expressão desta citocina não foi ainda determinado.

Evidências indicam que uma importante função das MAPKs é a geração de sinais importantes para o controle da hematopoese normal e ineficiente por citocinas e fatores de crescimento (Platanias, 2003).

Em estudos de amostras de pacientes adultos com SMD verificou-se que estas apresentaram super ativação das proteínas quinase ativadas por mitógenos (MAPKs) p38; e a inibição desta via por inibidores específicos levou ao estímulo da hematopoese, sugerindo assim que esta via de sinalização, p38 MAPK, é importante na transcrição de várias citocinas mielosupressoras nas SMDs (Navas e col., 2006).

Em trabalho anterior, Efstratios Katsoulidis e colaboradores, examinaram o papel do p38 na geração de efeitos mielosupressores de diferentes citocinas em células da medula óssea de adultos com SMD. Os autores observaram um aumento nos números de progenitores eritróides e mielóides após a adição de inibidores farmacológicos específicos de p38, concluíram o trabalho sugerindo o uso desses inibidores em aplicações terapêuticas no tratamento das SMDs

Em estudos recentemente publicados, Nakao e colaboradores, relataram o papel da família das proteínas tirosina quinase (MAPKs) na indução de LIF por soro fetal bovino e a secreção de IL-6 por células estromais “normais” imortalizadas da medula óssea humana (HS-5). Neste estudo, após tratamento das células HS-5 com soro fetal bovino constatou-se um aumento na fosforilação de membros das MAPKs, entre eles, p38, quinases reguladoras de sinal extracelular (ERK) e um aumento na atividade de c-Jun-N-terminal (JNK).

As MAPKs são serina-treonina quinases que medeiam sinais regulatórios na célula. Existem 3 grupos principais: p 38, ERK e JNK conforme tabela 1.

Nesse grupo de MAPK quinases encontramos diferentes isoformas de JNK1, 2, 3; ERK1, 2, 5 e ainda quatro isoformas de p38 (α , β , γ e δ) (Malemud 2007). Estes diferentes membros participam da cascata de sinalização conservada ao longo da evolução e regulam importantes atividades biológicas, bem como a geração de sinais importantes para o controle da hematopoese normal (conforme Platanias, 2003).

A cascata de sinalização das MAPKs é ativada em geral, por vários estímulos que regulam a produção de citocinas e fatores de crescimento (Roux e Bleins, 2004).

Tabela 2. Membros da família das MAPKs

Erk	p38	JNK	Outras
Erk1	p38 α	JNK1	Erk3
Erk2	p38 β	JNK2	Erk5
-----	p38 γ	JNK3	Erk7
-----	p38 δ		Erk8

Conforme (Platanias e col., 2003)

A cascata de sinalização das MAPKs respeita uma seqüência de reações de fosforilação e defosforilação as quais inicialmente ativam uma MAPK quinase quinase (MAPKKK - Raf); estas ativam uma MAPK quinase (MAPKK – MKK) que por fim ativa MAPKs específicas ERK, JNK e p38, estas serão responsáveis pela expressão gênica levando a resposta fisiológica apropriada (Mitalik e Venkatesh, 2005).

Quando ativadas, as MAPKs transmitem o estímulo recebido através da superfície celular por fosforilar seus alvos, tais como enzimas e fatores de transcrição, estes por sua vez regulam os processos celulares subsequentes tais como manutenção de sobrevivência, indução de morte celular, transformação maligna e regulação da progressão do ciclo celular (GUO e YANG, 2006).

A especificidade da ativação e função das MAPKs é determinada, em parte, por proteínas suporte que criam complexos multi-enzimáticos os quais aumentam, diminuem ou redirecionam o fluxo do sinal em resposta a

estímulos fisiológicos específicos (Aouadi e col., 2006). A maioria destas proteínas simplesmente facilita o aumento local da concentração dos componentes das MAPKs; porém, poderão também participar ativamente nas funções de seus parceiros. Assim, uma proteína suporte pode afetar a sua MAPK por: 1) interagir diretamente com ativadores da membrana; 2) localizar regiões de ação sobre a membrana ou em outra parte da célula; 3) causar mudanças para sensibilizar a MAPK para a ativação; 4) afetar a acessibilidade do substrato da MAPK; 5) influenciar a ativação cinética; 6) regulamentar a inativação; e 7) restringir respostas (Morrison e Daviz col., 2003).

A família p38 está relacionada à resposta inflamatória, apoptose, ciclo celular, quando ativada a p38 fosforila inúmeros substratos em todos os compartimentos celulares (Aouadi e col., 2006). Dependendo do tipo celular e da natureza do estímulo recebido, isoformas diferentes (α , β , γ e δ) podem ter funções celulares diferentes redundantes ou específicas (Guo e Yang, 2006).

A sinalização de ERK é geralmente considerada predominantemente regulatória envolvida em resposta proliferativa celular frente a fatores de crescimento e citocinas (Malemud, 2007).

É composta pelas MAPKKKs: A-Raf, B-Raf e Raf-1; as MAPKKs: MEK1 e MEK2; e as MAPKs: ERK1 e ERK2 (Roux e Blenis, 2004). A ativação de MEK é dependente da sinalização de Raf/Raf, bem como a ativação de

proteínas suportes as quais modulam o complexo MEK/ERK de locais subcelulares (Malemud, 2007).

Após ligação do ligante ao seu receptor tirosina quinase (RTKs), Ras é ativada e ocorre então uma mudança de GDP para GTP, o que permite a interação com uma rede de proteínas efetoras localizadas abaixo na cascata (Roux e Blenis, 2004). Membros da família de ativadores associados à membrana (Raf) são recrutados e ativam MEK1/2, as quais são fosforiladas e se dissociam em ERK1/2, esta uma vez quando ativada é translocada para o núcleo onde juntas com outras quinases ativam alvos reguladores de transcrição como CREB (Murphy e Blenis, 2006).

O mecanismo exato da ativação de Ras não está bem definido, mas sabe-se que a regulação de Ras e Raf é crucial para a manutenção da proliferação celular, e que mutações nestes genes têm levado a oncogenes. (Roux e Blenis, 2004). A ativação de Ras está implicada no crescimento de células hematopoéticas malignas e nas SMDs mutações genéticas em Ras podem contribuir para a evolução para LMA (Braun e Fenaux, 2008).

A família de JNK compreende um subgrupo das MAPKs (JNK1, JNK2 e JNK3) (Xia e Karin, 2004); originalmente isolada em pulmões de ratos e ativada em resposta a citocinas, irradiação UV e agentes que danificam o DNA. Assim como ERK e p38, JNK localiza-se no citoplasma e após estímulo vai até o núcleo para que ocorra a transcrição gênica (Roux e Blenis, 2004).

Com base nos dados apresentados na literatura, nosso objetivo foi verificar os elementos envolvidos no aumento da expressão e síntese de LIF em células estromais provenientes da medula óssea de crianças com SMD e

com SMD/LMA. Inicialmente determinamos a indução temporal de LIF, ao nível de RNA mensageiro e proteína, por fatores solúveis presentes no soro e observamos uma maior expressão de LIF em cultura primária de células estromais com SMD e com SMD/LMA quando comparadas as de crianças saudáveis (CT).

O desenvolvimento de inibidores específicos para cada membro da família das MAPKs e sua ação nos diferentes níveis desses membros, facilitou grandemente a nossa compreensão sobre as interações complexas destas cascatas sinalizadoras (English e Cobb, 2002).

Em seguida avaliamos a participação das MAPKs na indução da expressão de LIF nessas células estromais. Para isso, usamos inibidores específicos SB203580 (p38MAPK), SP600125 (JNK) e PD98059 (MEK) inicialmente descritos pelos autores acima. Em nossos ensaios, observamos uma participação equivalente das três vias de sinalização estudadas em células estromais provenientes da medula óssea de crianças saudáveis. Porém, nossos dados sugerem que em células estromais de SMD e SMD/LMA, a principal via de sinalização envolvida na indução da expressão de LIF é a p38MAPK. Anteriormente relatada como uma via de sinalização super ativada em células hematopoéticas, a via de sinalização de p38 MAPK pode estar alterada também em células estromais.

Objetivos

1. Determinar a indução temporal da expressão de LIF por fatores solúveis presentes no soro fetal bovino em cultura primária de células estromais de medula óssea de crianças saudáveis (CT), com SMD e SMD/LMA.
 2. Determinar a participação das quinases p38, JNK e ERK na indução da expressão de LIF por soro fetal bovino em culturas primárias de células estromais de crianças saudáveis (CT), com SMD e SMD/LMA.
 - 3 Determinar a atividade das quinases p38 e ERK em células estromais de crianças saudáveis (CT), com SMD e SMD/LMA.
-

Casuística

As medulas ósseas de três pacientes de idade entre 1 a 12 anos foram obtidas da crista ilíaca durante procedimento para diagnóstico, sob supervisão do Dr. Luiz Fernando Lopes (Departamento de Pediatria do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer AC. Camargo (SP)). Dentre essas amostras, três pacientes tiveram diagnóstico confirmado para Síndromes Mielodisplásicas (SMD) e um paciente para Leucemia Mielóide Aguda associada à SMD (SMD/LMA), após análise das lâminas pelo comitê de patologia do Grupo cooperativo de SMD pediátrico (BCG-PED-MDS) (Tabela 3).

Tabela. 3 Características das crianças com SMD e SMD/LMA

Paciente	Idade	Classificação	Cariótipo
SMD1	1 ano	AREBII	46,XY[20]
SMD2	12 anos	AREBII	46,XY[20]
SMD/LMA	2 anos		47,XX,+21c[20]

As medulas ósseas de crianças consideradas clinicamente saudáveis (CT) foram obtidas em cirurgias de correção ortopédica de duas crianças de idade de 2 e 6 anos, encaminhadas para o Departamento de Ortopedia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob supervisão do Prof. Dr. Roberto Guarnieiro.

As coletas foram realizadas com aprovação dos comitês de ética de cada instituição e com anuência do responsável legal das crianças através do Termo Livre e Esclarecido durante o Projeto de Pesquisa temático “Caracterização molecular do estroma conjuntivo de medula óssea de pacientes com síndromes mielodisplásicas na infância”. O atual projeto foi apreciado e aprovado pela Comissão de Projeto de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Medicina (Protocolo de Pesquisa nº 486/06).

Métodos

Condições de cultivo das células estromais

A medula óssea após a coleta foi imediatamente adicionada ao meio de cultura Iscove's Modified Dubelcco's Medium (IMDM) (Gibco, Nova Iorque, EUA), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e acrescido de anticoagulante (Liquemine, 20 U/ml) e antibióticos (estreptomicina, 100 U/ml e penicilina 100 U/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil) e fungizona (concentração 2,5 mg/ml).

As células estromais foram cultivadas em garrafas próprias para o cultivo celular (Nalgene Inc, EUA) contendo meio de cultura Iscove's Modified Dubelcco's Medium (IMDM) (Gibco, Nova Iorque, EUA), ampicilina (concentração final 100 mg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil), estreptomicina (concentração final 100 mg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil), fungizona (concentração 2,5 mg/ml) e suplementado com 20% de SFB (Soro Fetal Bovino Gibco, Nova Iorque, EUA). As células foram mantidas em uma incubadora de umidade controlada a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO₂.

Durante as primeiras quatro semanas de cultivo, somente 50% do volume do meio de cultura foi trocado por semana. Neste processo, as células provenientes do clone hematopoético não-aderentes foram gradativamente eliminadas da cultura. Do clone hematopoético apenas os macrófagos aderentes mantiveram-se em cultura até por volta da 3ª passagem, por serem resistentes a tripsina as culturas foram consideradas livre de contaminantes hematopoéticos (Borojevic e col., 2004).

Todo o procedimento foi realizado em um fluxo laminar da Veco (Veco do Brasil Indústria e Comércio de Equipamentos Ltda, Campinas, Brasil).

Após o estabelecimento de uma cultura celular homogênea, iniciou-se um banco de congelamento dessas células. A contagem celular foi realizada e um total de 1×10^6 células foi congelado usando-se a seguinte solução para cada ampola de 1 ml: 95% de SFB e 5% de DMSO (Dimetil-sulfóxido, SIGMA – ALDRICH Corporation, Saint Louis, EUA). O congelamento celular resultou da redução gradativa de temperatura por 24 horas em sistema de congelamento NalgeneTM Cryo (Nalgene Inc, EUA) em freezer a -70°C e depois transferidas para um container de nitrogênio líquido, onde permaneceram até o uso. Os ensaios deste projeto foram realizados com as células congeladas durante o projeto “Caracterização molecular do estroma conjuntivo de medula óssea de pacientes com síndromes mielodisplásica na infância” com ciência da Comissão de Ética.

As células estromais descongeladas foram transferidas para garrafas de cultura celular com área de 75cm^2 contendo meio de cultura Iscove's Modified Dubelcco's Medium e antibióticos, a saber, ampicilina (concentração final 100mg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil), estreptomicina (concentração final 100mg/ml) (FURP, Guarulhos, Brasil) e fungizona (concentração 2,5mg/ml); e suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco, Nova Iorque, EUA). As células foram mantidas em uma incubadora de umidade controlada a 37°C em atmosfera constante de 5% de CO_2 até o momento da realização dos ensaios.

Em nossos ensaios, as células estromais encontravam-se na confluência de 70% e inicialmente mantidas em meio de cultura Iscove's acrescido dos antibióticos citados, porém sem a presença de SFB por 48 horas, período esse denominado de carenciamento. Após o carenciamento as amostras foram cultivadas de acordo com cada desenho experimental para a análise da indução temporal de LIF por SFB, ensaios de inibição das vias de sinalização das MAPKs p38, JNK e ERK; de quantificação ou de atividade das quinases acima citadas.

Extração de RNA total

Para estes ensaios utilizamos 1×10^6 células em garrafas de cultivo celular de 75 cm² células estromais foram submetidas ao período de carenciamento por 48 horas. A indução da expressão temporal do fator inibidor de leucemia (LIF) foi analisada para o tempo inicial (sem adição de soro), definido como 0 hora e após a adição de SFB em tempos de 1 hora, 2 horas e 3 horas. Para cada tempo (ponto) as células estromais foram tripsinizadas e removidas da garrafa de cultivo. O homogeneizado celular foi centrifugado a 1600 rpm (Centrifuge 5415R, Eppendorf) por 7 minutos, o sobrenadante foi reservado para os ensaios de ELISA para determinação da proteína LIF. Após a verificação da concentração celular e viabilidade as células estromais foram lavadas com tampão fosfato (PBS) gelado, e acrescidas de 1 ml de TRizol (Invitrogen, EUA) e após vigorosa homogeneização as células foram levadas ao freezer -70°C prontas para a fase seguinte de extração do RNA total.

Os RNAs totais de células provenientes das culturas primárias foram extraídos utilizando-se o reagente TRizol[®] (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina) (Invitrogen, EUA), que é uma modificação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987).

As amostras foram descongeladas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se a este homogeneizado 200 µl de clorofórmio (NUCLEAR, São Paulo, Brasil), homogeneizado vigorosamente, e após 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugado a 14000 rpm (Centrifuge 5415R, Eppendorf) por 15 minutos a 4°C. Este procedimento foi baseado na habilidade do RNA permanecer solúvel na fase constituída por fenol e clorofórmio na presença de isotiocianato de guanidina. O sobrenadante constituído pela fase aquosa foi transferido para um tubo novo e então adicionado a este 500 µl de álcool isopropílico (NUCLEAR, São Paulo, Brasil). Após vigorosa homogeneização as amostras de RNA foram incubadas no freezer -20°C por 12 horas para a fase de precipitação.

Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm (Centrifuge 5415R, Eppendorf) por 10 minutos à 4°C, e a seguir, 500 µl de Ethanol a 75% foram adicionados para a lavagem, após vigorosa agitação foram centrifugados a 12000 rpm (Centrifuge 5415R, Eppendorf) por 10 minutos à 4°C. Esse processo de lavagem foi repetido por duas vezes. O precipitado celular foi ressuspenso em 20 µl de água deionizada tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), o qual constitui um forte inibidor de ribonucleases.

A concentração de RNA total foi determinada por espectrofotometria e a pureza e integridade da amostra avaliada pela relação da D.O. 260/280 e gel analítico de agarose 1%, respectivamente.

Reação de Transcriptase Reversa (RT) para obtenção de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada a partir de 4 µg de RNA total diluídos em 10 µl de água DEPEC e ao qual foram acrescentados 1 µl de oligonucleotídeos hexâmeros iniciadores (Amersham Biosciences, Inglaterra). A mistura foi aquecida a 70°C por 10 minutos para romper qualquer estrutura secundária que pudesse ter sido formada e, posteriormente colocada imediatamente no gelo por 2 minutos. Adicionou-se 8 µl de tampão da *SuperScript III* (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂) (Invitrogen, EUA), 4 µl de mistura de nucleotídios (dNTPs) a 2,5 mM, 2 µl de ditioneitol (DTT) a 0,1M (Invitrogen, EUA) que age na desnaturação da cadeia molde. Incubou-se por 10 minutos a 55°C e colocou-se 2 µl da enzima *SuperScript III Reverse Transcriptase* (200U/µl) (Invitrogen, EUA). A mistura foi então aquecida a 42°C por 1 hora, logo depois de incubada a 70°C por 10 minutos.

Após período de incubação foi feita a leitura espectofotométrica e a concentração de cada amostra foi calculada (40 ng), a seguir foram diluídas as amostras em água ultra-pura.

Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (*PCR-Real Time*)

A técnica de PCR em tempo real consiste na medição da quantidade de produto amplificado a cada ciclo da reação. É baseada na amplificação enzimática de um fragmento de DNA pela extensão de dois oligonucleotídeos (primers), que hibridizam com as fitas complementares de uma sequência molde (alvo ou template). As extremidades 3' dos primers são orientadas apontando uma em direção à outra. O procedimento envolve repetidos ciclos com variações de temperatura, que permitem a desnaturação do DNA molde, hibridização dos primers as suas sequências complementares e extensão dos primers hibridizados pela DNA polimerase, uma enzima termo-resistente que permite a utilização de altas temperaturas nas etapas de hibridização e extensão, aumentando assim o rigor da reação e minimizando a obtenção de produtos inespecíficos.

Ao final dos ciclos temos um acúmulo exponencial de um fragmento específico cujas extremidades são definidas pelas extremidades 5' dos primers.

Reagentes fluorescentes foram utilizados como identificador de sinal, o resultado foi obtido na fase exponencial da reação. O sistema utilizado denominado sistema SYBR Green de detecção refere-se ao uso de um fluoróforo (SYBR Green I) que se intercala a dupla fita de DNA resultando na emissão de fluorescência.

A detecção de fluorescência pode ser comprometida pela formação de dímeros de primers, pela concentração inadequada de primers e pela formação de estruturas secundárias no produto de PCR. Para isso, o desenho dos primers (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e a otimização da reação são passos cruciais para o processo de quantificação pelo sistema SYBR Green I de PCR em Tempo Real. Para a técnica de PCR em tempo real utilizamos o equipamento Rotor gene analysis software v. 6.0.

As condições foram testadas e os produtos de PCR específicos detectados pela fluorescência do SYBR Green incorporado à dupla fita de DNA. Os valores quantitativos foram obtidos através do ciclo limiar, no qual o aumento do sinal associado à fase exponencial de amplificação do produto de PCR começa a ser detectada.

Foi utilizado para a normalização um gene de referência, a beta actina. A quantificação da expressão gênica ocorreu em parâmetros baseados em Cts (*Threshold cycle* ou ciclo limite). A expressão relativa foi determinada pelo controle do gene alvo - controle do gene de referência.

Para cada amostra de cDNA, em duplicata foram adicionadas: 2,0 µl do tampão 1X PCR buffer; 0,8 µl de MgCl₂ 50mM; 1,6 µl de dNTP 2,0 mM (Invitrogen life Technologies); 0,4 µl do Primer (LIF sense e LIF anti sense); 0,4 µl do Primer Beta actina (Invitrogen); 1,0 µl de DMSO (Sigma); 0,3 µl da Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen life Technologies); 0,2 µl do SYBR Green I (1:100) (Molecular Probes) e 8,3 µl de água ultra pura.

Para esses ensaios foram utilizados os seguintes primers:

β -actina	5' AGA GGC GTA CAG GGA TAG CA 3';
	5' AGA AAA TCT GGC ACC ACA CC 3';
LIF	5' CAG GGA GGT GCC AAG GTA 3';
	5' AAC GCC ACC TGT GCC ATA 3'

Quantificação de LIF proteína por ELISA

As células estromais foram submetidas ao período de carenciamento celular por 48 horas. Após esse período, para a indução da expressão temporal do fator inibidor de leucemia (LIF) ao nível de proteína, adicionou-se a essa cultura 20% de SFB em tempos determinados de 1 hora, 2 horas, 3 horas e usou-se como controle o tempo zero hora.

O sobrenadante celular foi então separado em tubos de 50 ml e submetido ao processo de Liofilização por um período entre 16 horas ou até o volume de sobrenadante atingir 1/10 do volume inicial. Após esse período, iniciou-se o ensaio de Elisa para a quantificação da expressão de LIF proteína.

A concentração da proteína LIF foi determinada no sobrenadante utilizando o Kit Quantikine – Human LIF Immunoassay (R&D System, Inc., USA) para a determinação de LIF ao nível de proteína. *Elisa (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)* é um teste imunoenzimático que permite a detecção de antígenos específicos no soro. O método utilizado se baseia na interação anticorpo-antígeno.

Normalmente é usada uma placa de superfície inerte com poços onde serão adsorvidas as proteínas de interesse. Foram adicionados 200 µl do diluente RD5U ao primeiro poço da placa, e 200 µl da amostra nos demais poços, a placa foi então vedada com tampa adesiva. Após incubação por 2 horas a temperatura ambiente, o sobrenadante foi aspirado e os poços foram então lavados por 3 vezes com 400 µl da solução de lavagem devidamente preparada (24 ml da *Wash* concentrada acrescido de 1 ml de H₂O MQ).

A superfície é então tratada com 200 µg de anti-LIF conjugado, uma solução de anticorpo primário específico para a proteína de interesse e este vai se ligar a ela. Após 1 hora de incubação a temperatura ambiente, a superfície é lavada novamente com 400 µl da solução de lavagem para retirar os anticorpos primários que não foram incorporados em nenhuma proteína.

Em seguida o produto é tratado com 200 µl de anticorpos secundários (solução substrato), a saber: 1800 µl do reagente de cor A e 1800 µl do reagente de cor B sem interferência direta de luz (o tubo foi envolvido por papel alumínio para que a solução não sofresse influência da luz). Essa solução possui um anticorpo secundário acoplado a uma enzima que em contato com o substrato produzirá uma substância corada.

Após incubação por 20 minutos sem contato direto da luz, foram adicionados 50 µl da solução de parada e então, a densidade ótica foi determinada em comprimento de onda de 540nm-570nm em leitor de ELISA modelo 550 (BIORAD).

Todos os reagentes foram utilizados à temperatura ambiente e preparados de acordo com instruções do fabricante.

Inibição das vias de sinalização das MAPKs: p38, JNK e ERK em cultura primária de células estromais

Para estes ensaios, as células estromais foram mantidas em placas de cultura celular de seis poços sob condições favoráveis de cultivo, a saber, meio Iscove's acrescido de 20% de SFB e antibióticos. Quando na confluência desejada (70%) as células estromais cultivadas foram submetidas ao carenciamento de SFB por 48 horas. Após esse período, as células estromais foram expostas a concentrações de inibidores específicos de p38 (SB203580), JNK (SP600125) e MEK-ERK1/2 (PD98059) por 1 hora (Calbiochem). As concentrações dos inibidores foram estabelecidas com base na literatura e em nossos ensaios prévios de padronização, a saber: p38 e JNK (0,02 μ M; 0,2 μ M; 2 μ M e 20 μ M) e ERK1/2 (0,05 μ M; 0,5 μ M; 5 μ M; e 50 μ M). A viabilidade das células foi verificada pela coloração de Tripán blue e as concentrações utilizadas mostraram-se não tóxicas as células.

Após 1 hora de exposição os inibidores foram removidos e as células foram mantidas em meio de cultura Iscove's acrescido de 20% de SFB por 24 horas. O sobrenadante celular foi então processado como descrito para o ensaio de indução temporal por SFB para determinação por ELISA de LIF.

Extratos Proteicos

Para estes ensaios as células estromais foram submetidas a um período de carenciamento de soro por 48 horas. Após esse período, para a indução da expressão temporal do fator inibidor de leucemia (LIF), adicionou-se a essa cultura 20% de SFB em tempos determinados de 1/2 hora, 1 hora e 2 horas, e usou-se como controle o tempo zero hora.

As células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 1 ml de Tampão de Lise (Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7.4), contendo inibidores de proteases Aprotinina 2 µg/ml (SIGMA) e Fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1mM. O lisado foi então submetido à agitação por 15 minutos a 4°C e o extrato solúvel foi isolado do material precipitado insolúvel após centrifugação a 13000 rpm por 15 minutos a 4°C. Os extratos foram mantidos a temperatura de -20°C até o momento do uso, quando sua concentração protéica foi determinada.

Dosagem Proteica

A concentração protéica dos extratos foi determinada com Kit de Ensaio de Proteína BCA (Bio Agency) que é um método de Lowry Modificado. O método combina a redução do cobre pela proteína em um meio alcalino, com alta sensibilidade e seletividade de detecção colorimétrica do cátion de cobre utilizando um reagente único contendo ácido bicinconínico.

A coloração púrpura resultante da reação é formada pela interação duas moléculas do reagente BCA com íons de cobre.

Em uma placa de 96 poços, foram colocados 4 µl de cada amostra a ter sua concentração protéica determinada, 40 µl dos reagentes A e B na proporção de 50:1. A placa foi homogeneizada vagarosamente e após 30 minutos a temperatura de 37°C, sua absorbância a 595 nm (Bio Rad Model 550, Microplate reader) foi determinada e comparada às obtidas em curva padrão de BSA (0 – 5mg).

Western Blotting

As amostras foram separadas por eletroforese em gel 10% de poliacrilamida segundo o protocolo de Laemmli et al., em 1970 e em condições não redutora. O gel de corrida foi preparado com Tris 0,375 M pH 8.8, SDS 0.1%, Acrilamida 10%, persulfato de amônio (APS) 0.03% e N,N,N,N tetra metiletilenodiamina (TEMED, Sigma). O gel de empilhamento foi preparado com Tris 0,125M pH 6.8, SDS 0,1%, Acrilamida 4%, APS 0,045% e TEMED. Os extratos protéicos foram diluídos em tampão de amostra não redutor (Tris-HCL 240 mM pH 6.8, SDS 0,8%, glicerol 40% e azul de bromofenol 0,02%). A eletroforese foi feita em tampão Tris 25mM, Glicina 0,19 M pH 8.3, SDS 0,1% à temperatura ambiente e sob uma voltagem constante de 60V.

Os extratos protéicos separados em gel 10% de poliacrilamida-SDS foram eletroforeticamente transferidos para membrana de PVDF (Hydrophobic Polyvinylidene Difluoride, Amersham).

A transferência foi feita em tampão Tris 25 mM, Glicina 192 mM e Metanol 20% por 1 hora a 100V a 4°C.

Ligações não específicas foram bloqueadas por incubação da membrana em tampão de leite desnatado 5% em PBS por 1 hora a temperatura ambiente sob agitação. Após ser lavada 3 vezes por 10 minutos com PBS/leite desnatado a membrana foi incubada durante a 4°C com o anticorpo específico e novamente lavada com PBS/leite desnatado por 3 vezes durante 10 minutos. Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpo secundário anti-IgG de rato conjugado a peroxidase (HRP – Horseradish Peroxidase Conjugate, KPL – Kirkegard & Perry Laboratories, Maryland, USA) 1:1000 diluído em PBS/leite desnatado por 1 hora a temperatura ambiente, o qual foi visualizado pelo sistema de detecção ECL (Amersham Pharmacia Biotech) como descrito pelo fabricante.

Após as lavagens, as membranas foram colocadas em um saquinho plástico, em seguida foi adicionado 1 ml do reagente de detecção (proporção 1:1) dos reagentes A e B. Foram expostas a um filme de Raio X (Hyperfilme ECL, Amersham) em um chasis contendo um par de intensificadores de imagem, esses foram deixados a temperatura ambiente por 1 a 3 minutos.

Para a revelação, o filme foi colocado no revelador (Kodac) até o aparecimento das bandas e, em seguida, fixado com fixador (Kodac) e lavado em água corrente.

Resultados

Expressão temporal de LIF (RNAm) em células da medula óssea de crianças saudáveis(CT1 e CT2) e com SMD-LMA

Para a determinação da expressão de LIF (RNAm) induzida por soro em células estromais de medula óssea de crianças saudáveis (CT1 e CT2) e com Leucemia Mielóide Aguda associada a SMD (SMD-LMA), após 48 horas de carenciamento celular (livres de SFB), estas células foram cultivadas com adição de 20% de soro por períodos determinados de 0 hora, 1 hora, 2 horas e 3 horas.

O RNA foi isolado e transcritos para cDNA foram quantificados por PCR em tempo real. Assim, observamos um aumento temporal da expressão de LIF ao nível de RNA mensageiro pela adição de soro fetal bovino, o qual foi maior em células estromais da medula óssea de crianças com SMD-LMA quando comparadas às células de crianças saudáveis (CT1 e CT2). Utilizamos como controle negativo uma linhagem de câncer de mama, a MDA-MB-231, esta célula é derivada de efusão pleural de paciente com câncer de mama metastático (Cailleau et al., 1974; Jessen et al, 1996), conforme figura abaixo.

Figura. 2. Indução temporal de LIF (RNAm) por SFB. Níveis de expressão de LIF foram determinados em células estromais de crianças saudáveis (CT1 e CT2) e de SMD-LMA. Foram usadas como controle negativo para indução de LIF por soro células de câncer de mama (MDA-MB-321) após carenciamento de SFB por 48 horas (0 h) e com adição de 20% de SFB (1h, 2h, 3h) (n=3).

Expressão temporal de LIF (proteína) em células da medula óssea de crianças saudáveis (CT1), com SMD e com SMD-LMA.

Para a verificação da expressão temporal de LIF ao nível de proteína, foram cultivadas as células estromais da medula óssea de crianças saudáveis (CT), com SMD e SMD-LMA por 48 horas sem a presença de soro fetal bovino. Após esse período adicionamos 20% de soro por períodos determinados de 0 hora, 1 hora, 2 horas e 3 horas. Através da dosagem protéica pelo ensaio de ELISA, observamos após adição de SFB, um aumento da expressão de LIF (proteína) tempo dependente. Os níveis basais de LIF foram respectivamente, 4.83, 12.65 e de 6.33 pg, conforme demonstrado na figura 3.

Figura 3. Indução tempo dependente de LIF (proteína) por SFB. Células estromais de uma criança saudável (CT1), com SMD e com SMD-LMA foram cultivadas livres de SFB (0) e com adição de 20% de

SFB (1h, 2h, 3h). A quantidade de LIF (proteína) expressa em pg/10⁶cel foi determinada por ELISA.

Participação da via de sinalização das MAPKs na expressão de LIF em células estromais de crianças saudáveis (CT1 e CT2), com SMD e com SMD-LMA.

Efeito dos inibidores.

Para avaliar o papel das vias de sinalização da família das MAPKs na expressão de LIF pela indução de SFB, foi necessário inibir cada uma dessas vias.

As células estromais da medula óssea de crianças saudáveis (CT1 e CT2), com SMD e com SMD-LMA foram cultivadas livres de SFB por 48 horas. A seguir essas células foram incubadas por 1 hora com inibidores específicos de p38 (SB203580), MEK/ERK1/2 (PD98059) e JNK (SP600125), nas seguintes concentrações: SB203580 e PD98059 (0,02µM, 0,2µM, 2µM, 20µM) e SP600125 (0,05µM, 0,5µM, 5µM, 50µM). Após este período as células foram estimuladas com 20% de SFB por 24 horas.

Observamos pela coloração de Tripán blue que as concentrações utilizadas mostraram-se não tóxicas as células.

Avaliamos os efeitos de bloqueio da família das MAPKs envolvidos na expressão de LIF em células estromais da medula óssea de crianças saudáveis (CT1 e CT2). Observamos que a quantidade de LIF expresso por estas células após tratamento com os inibidores específicos de p38, MEK/ERK1/2 e JNK em diferentes concentrações, mostrou-se equivalente nas células estromais de CT1 e CT2, respectivamente figuras 4.A e B. A concentração de LIF no controle (SFB) corresponde às células tratadas com soro fetal bovino durante 24 horas.

A

B

Figura 4. Indução de LIF (proteína) por SFB. Após 48 h livres de SFB, as células estromais de crianças saudáveis CT1 (A) e CT2 (B) foram tratadas por 1h com inibidores específicos de p38 (SB203580) e MEK/ERK1/2 (PD98059) em concentrações de 0,02μM, 0,2μM, 2μM, 20μM e JNK (SP600125) em concentrações de 0,05μM, 0,5μM, 5μM, 50μM. A inibição de LIF foi determinada após 24h de cultivo com SFB por ELISA e expressa em pg de LIF/10⁶cel. SFB, controle.

Efeito dos inibidores das MAPKs em células estromais de crianças com SMD-LMA

Avaliamos os efeitos de bloqueio da família das MAPKs envolvidos na expressão de LIF em células estromais da medula óssea de crianças com SMD/LMA e notamos a participação das três vias estudadas (p38, ERK1/2 e JNK) na expressão de LIF. Porém, observamos que após serem tratadas com inibidor específico de p38 (SB203580) as células estromais de crianças com SMD/LMA tiveram uma menor expressão de LIF, conforme demonstrado na figura 5.

Figura 5. Indução de LIF (proteína) por SFB. Após 48 h livres de SFB, as células estromais de crianças com SMD/LMA foram tratadas durante 1h com inibidores específicos de p38 (SB203580) e MEK/ERK1/2 (PD98059) em concentrações de 0,02μM, 0,2μM, 2μM, 20μM e JNK (SP600125) em concentrações de 0,05μM, 0,5μM, 5μM, 50μM.

A quantidade de LIF foi determinada após 24h de cultivo com 20% de SFB por ELISA expressa em pg de LIF/ 10^6 cel.

Efeito dos inibidores das MAPKs em células estromais de crianças com SMD

Por fim, avaliamos os efeitos de bloqueio da família das MAPKs envolvidos na expressão de LIF em células estromais da medula óssea de crianças com SMD notamos a participação das três vias estudadas (p38, ERK1/2 e JNK) na expressão de LIF. Porém, assim como observado anteriormente nas células estromais de SMD-LMA, as células estromais de crianças com SMD, após serem tratadas com inibidor de p38 (SB203580) também apresentaram uma baixa expressão de LIF se comparada aos resultados obtidos com os outros inibidores, que aparentemente não são diferentes dos valores obtidos no controle, conforme demonstrado na fig.6.

Figura 6. Indução de LIF (proteína) por SFB. Após 48 h livres de SFB, as células estromais de crianças com SMD foram tratadas durante 1h com inibidores específicos de p38 (SB203580) e MEK/ERK1/2 (PD98059) em concentrações de 0,02μM, 0,2μM, 2μM, 20μM e JNK (SP600125) em concentrações de 0,05μM, 0,5μM, 5μM, 50μM. A quantidade de LIF foi determinada após 24h de cultivo com 20% de SFB por ELISA.

Atividade das MAPKs (p38 e ERK) na expressão de LIF em células estromais de crianças saudáveis (CT1 e CT2), com SMD e com SMD-LMA

Para determinar se a adição de fatores de crescimento presentes no SFB poderia induzir a ativação de ERK e p38 em células estromais de crianças CT1 e CT2, de crianças com SMD e com SMD/LMA, cultivamos as células estromais por 48 horas sem a presença de soro fetal bovino. Após esse período adicionamos 20% de soro por períodos determinados de 0, 15 min., 30 min., 60 min. e 120 min. Após dosagem proteica, quantificamos a fosforilação de ERK 1/2 (44 e 42 kDa, respectivamente) e de p38 MAPK pela análise de Western Blotting.

Atividade de ERK e p38 em células estromais de crianças saudáveis (CT1 e CT2)

Após serem estimuladas com SFB nos tempos pré-determinados, as células estromais de CT1 mostraram atividade inicial de p38, seguido de uma diminuição gradativa até ter sua atividade novamente aumentada em 120 minutos. Observamos um pico de fosforilação de ERK1/2 em 15 minutos, o qual foi gradativamente diminuindo até ser quase imperceptível nos instantes finais do tratamento (120 min.).

Figura 7 – Ativação das MAPKs em células estromais de crianças saudáveis (CT1) estimuladas por SFB. Após 48h livres de soro, as células foram estimuladas com 20% de SFB por tempos determinados de 0, 15, 30, 60 e 120 min., em seguida as proteínas extraídas foram separadas em gel de poliacrilamida 12% e transferidas para membranas de PVDF e analisadas utilizando anticorpos específicos.

A análise da atividade de p38 fosforilado em células CT2 mostrou um gradual aumento de sua atividade nos primeiros 60 minutos. Nestas células ERK fosforilado mostrou uma grande atividade já no instante inicial, com um pico de atividade observado em 60 minutos seguido por pequena diminuição.

Figura 8 – Ativação das MAPKs em células estromais de crianças saudáveis (CT2) estimuladas por SFB. Após 48h livres de soro, as células foram estimuladas com 20% de SFB por tempos determinados de 0, 15, 30, 60 e 120 min., em seguida as proteínas extraídas foram separadas em gel de poliacrilamida 12% e transferidas para membranas de PVDF e analisadas utilizando anticorpos específicos.

Atividade de ERK e p38 em células estromais de crianças com SMD1 e SMD2

Nas células estromais provenientes de SMD1 a atividade inicial de ERK1/2 fosforilado foi considerável. A atividade de p38 fosforilado observada tanto em SMD1 como em SMD2 também foi importante já nos instantes iniciais, sem variação da atividade durante os tempos estudados.

Figura 9 – Ativação das MAPKs em células estromais de crianças com Síndrome Mielodisplásica (SMD1) estimuladas por SFB. Após 48h livres de soro, as células foram estimuladas com 20% de SFB por tempos determinados de 0, 15, 30, 60 e 120 min., em seguida as proteínas extraídas foram separadas em gel de poliacrilamida 12% e transferidas para membranas de PVDF e analisadas utilizando anticorpos específicos.

Em SMD2, observou-se uma grande foi a atividade de ERK1/2 fosforilado em 15 minutos seguida de uma diminuição gradativa em sua atividade.

Figura 10 – Ativação das MAPKs em células estromais de crianças com Síndrome Mielodisplásica (SMD2) estimuladas por SFB. Após 48h livres de soro, as células foram estimuladas com 20% de SFB por tempos determinados de 0, 15, 30, 60 e 120 min., em seguida as proteínas extraídas foram separadas em gel de poliacrilamida 12% e transferidas para membranas de PVDF e analisadas utilizando anticorpos específicos.

Atividade de ERK e p38 em células estromais de crianças com SMD-LMA

Após serem estimuladas com SFB, as células estromais de SMD-LMA mostraram uma grande atividade de ERK1/2 fosforilado no instante inicial com gradual diminuição de atividade nos instantes subseqüentes. A atividade observada de p38 fosforilado nestas células foi considerável também no instante inicial, e após uma pequena e gradual diminuição observou-se um aumento de atividade em 120 min. muito próximo da basal.

Figura 11 – Ativação das MAPKs em células estromais de crianças com Síndrome Mielodisplásica (SMD-LMA) estimuladas por SFB. Após 48h livres de soro, as células foram estimuladas com 20% de SFB por tempos determinados de 0, 15, 30, 60 e 120 min., em seguida as proteínas extraídas foram separadas em gel de poliacrilamida 12% e transferidas para membranas de PVDF e analisadas utilizando anticorpos específicos.

Discussão

As Síndromes Mielodisplásicas são principalmente observadas em indivíduos idosos sendo somente em 1987 descritas pela primeira vez em um grupo de 21 crianças diagnosticadas com uma forma agressiva da doença (Elghetany, 2007).

Tanto em adultos como em crianças, as SMDs são erroneamente associadas à LMA, porém um fator marcante que as distingue é que nas células provenientes de pacientes com LMA, os blastos mostram bloqueio na diferenciação em estágios iniciais, em contraste, a diferenciação nas SMDs progride normalmente em parte da população de células hematopoéticas diferenciadas terminalmente.

Esta diferença é importante, pois o acúmulo de células jovens em LMA se deve a um bloqueio na diferenciação e uma redução de morte celular; entretanto a falta de células em estágios terminais nas SMDs é devido a um descontrole entre diferenciação e morte celular por apoptose. Sendo assim, o bloqueio faz com que as células se diferenciem até um determinado ponto e se acumulem, enquanto a falta de diferenciação faz com que as células sigam apropriadamente um caminho e ao invés de terminar o estágio seguinte, elas morrem por apoptose.

Quando a SMD progride à LMA, há uma distinta ausência de apoptose, sugerindo que qualquer subsequente mudança que tenha ocorrido em células progenitoras na SMD, resultou no aumento da sobrevivência celular. O aumento da apoptose no microambiente hematopoético mielodisplásico ocasiona uma diminuição ou ausência de células hematopoéticas primárias na medula óssea destes pacientes (Corey e col., 2007).

Sabe-se que o aumento de apoptose observado nas células de pacientes adultos com SMD está intimamente ligado ou a um desequilíbrio intrínseco na transdução do sinal citocina-receptor ou à excessiva produção de citocinas inibitórias, tais como o TNF- α (Allampallam e col., 2002; Claessens e col., 2005). Em 2006, Navas e colaboradores relataram que interferons α , β e γ , TGF β e TGF γ estão implicados na hematopoese ineficiente presente nas SMDs. Estes autores identificaram que a p38 MAPK está ativa em células de um grande número de pacientes com SMD e sugeriram que a via do p38 está envolvida na regulação de apoptose em células progenitoras hematopoéticas.

Em estudos anteriores, TNF e IL-1 são citados como citocinas envolvidas na sinalização de p38 citocinas estas sabidamente envolvidas na indução de LIF (Melmed S e col., 1998). Em trabalho recentemente publicado, nosso grupo demonstrou um aumento na expressão de LIF mRNA nas células estromais da medula óssea de crianças com SMD e com SMD-LMA (Roela e col., 2007).

No trabalho presente, estendemos nossos resultados anteriores avaliando o aumento da expressão da proteína LIF nestas células, bem como o envolvimento das vias de sinalização das MAPKs neste processo. Em ensaios iniciais, observamos que as células estromais da medula óssea de crianças saudáveis, com SMD e com SMD-LMA, apresentaram níveis basais de LIF na ausência de soro, respectivamente de 4.83, 12.65 e de 6.33 pg/10⁶cel, indicando um aumento maior da produção basal de LIF nas células associadas à SMD e SMD-LMA em relação às células de indivíduos normais, sugerindo

que estas células estromais apresentaram uma capacidade intrínseca de produção de LIF.

Para um melhor entendimento sobre a participação das MAPKs em nossas células, avaliamos cada via separadamente, e após tratamento com inibidores farmacológicos específicos de p38 (SB203580), de MEK/ERK1/2 (PD98059) e de JNK (SP600125), observamos que estas três vias participam de modo equivalente na indução de expressão de LIF pela adição de soro a células provenientes de medula de crianças saudáveis. Por outro lado, em células estromais provenientes de crianças com SMD-LMA e SMD a participação de p38 parece ser mais importante que as outras vias, uma vez que a expressão de LIF ao nível de proteína induzida por soro nestas células, foi fortemente reduzida após tratamento com o inibidor específico de p38 (SB203580). A importância da via do p38 já foi descrita anteriormente como sendo importante para a síntese de fatores de crescimento em vários tipos celulares (Uddin e col., 1995; Katsoulidis e col., 2005; Platanias 2003).

Em função dos resultados acima, determinamos a atividade das MAPKs (ERK e p38) e observamos que as células estromais de nossos indivíduos controle (CT1e CT2), após serem estimuladas com SFB nos tempos pré-determinados, apresentaram uma variação significativa da atividade de ERK, a qual mostrou oscilações nos tempos avaliados. Vale ressaltar a diferença observada na atividade das MAPKs nestas células, as quais embora provenientes da medula óssea de crianças saudáveis, ambas apresentaram comportamentos bem diferenciados da atividade de ERK, refletindo uma heterogeneidade existente entre as células obtidas de crianças saudáveis.

Observamos valores iniciais maiores que os descritos por Nakao e col. (2002) que não encontrou a forma fosforilada de p38 no tempo zero, e contrariamente aos resultados deste autor, a adição de soro em nossas células estromais de CT1 e CT2, não induziu um aumento posterior da atividade de p38.

Outro detalhe interessante foi observado na atividade de p38 nas células estromais de crianças com SMD1 e SMD2. Ao analisarmos a atividade de p38 fosforilado verificamos que a atividade basal de p38 nestas células, foi significativa. Estes níveis basais altos de fosforilação foram mantidos nos tempos subseqüentes após estímulo por soro. Já a atividade de ERK nestas células, embora apresentasse níveis basais consideráveis, demonstrou variações nos tempos seguintes de tratamento, embora pouco significativas.

Em relação às células estromais provenientes de SMD-LMA, a atividade inicial de ERK mostrou-se bem expressiva, diminuindo durante o curso do experimento. A atividade basal do p38 também foi expressiva e embora tivesse diminuído nos tempos intermediários, notamos um novo e significativo aumento de atividade de p38 nos instantes finais de tratamento atingindo níveis muito próximos aos valores basais, fato este que não foi observado na atividade de ERK.

Em resumo, neste estudo sugerimos que as vias de sinalização das MAPKs parecem desempenhar papéis importantes na expressão de LIF nas células estromais da medula óssea de crianças saudáveis. No entanto, a via de sinalização de p38 MAPK parece ser funcionalmente mais importante nas células estromais provenientes de crianças com SMD e com SMD-LMA.

Porém, para uma melhor compreensão dos mecanismos que regem a expressão de LIF e sua ação no microambiente estromal a análise em um número maior de pacientes se faz necessária, para validar os nossos resultados.

Os nossos resultados sugerem que as células estromais da medula óssea podem representar uma fonte importante na produção de LIF, cuja secreção poderia contribuir para alguns aspectos da fisiopatologia das células hematopoéticas nas mielodisplasias.

A implicação do p38 na indução de LIF, poderia se constituir em um possível alvo para futuras propostas terapêuticas para pacientes infantis portadores de Síndromes Mielodisplásicas e SMD associadas à Leucemia Mielóide Aguda.

Conclusões

1. As células estromais da medula óssea de crianças saudáveis, de SMD e SMD-LMA apresentaram expressão basal de LIF ao nível de mRNA e de proteína o qual aumentou após adição de soro.
 2. As vias de sinalização ERK, p38 e JNK parecem estar envolvidas de maneira equivalente na indução de LIF pela adição de fatores de crescimento presentes no soro nas células estromais da medula óssea de crianças saudáveis. Entretanto, em indivíduos com SMD e SMD-LMA a via de sinalização do p38 parece ser a mais funcionalmente importante via envolvida neste processo.
 3. Em células estromais de crianças saudáveis, com SMD e SMD-LMA observamos a presença da forma fosforilada de ERK1/2 na ausência de soro e estes níveis basais foram heterogeneamente alterados pela adição deste. A atividade de p38 nas células estromais não apresentou alteração significativa entre seus níveis iniciais de atividade na ausência do soro e após adição deste, sugerindo que a manutenção temporal de p38 fosforilado seja importante para a indução de LIF nas células estromais associadas à SMD.
-

Anexos

Constituintes do soro fetal bovino

Constituintes	Concentrações
Proteínas e Polipeptídeos	40-80 mg/ml
Albumina	20-50 mg/ml
Fetuin	10-20 mg/ml
Fibronectina	1-10 µg/ml
Globulinas	1-15 mg/ml
Inibidores de protease:	
αantitripsina, α ₂ - macroglobulina	0,5-2,5 mg/ml
Transferrin	2-4 mg/ml
Fatores de crescimento	
EGF, PDGF, IGF-1 e 2, EGF, IL-1, IL-6	1-100ng/ml
Aminoácidos	0,01-1,0 µM
Lípides	2-10 mg/ml
Ácido linoleico	0,01-0,1 µM
Fosfolípidos	0,7-3,0 mg/ml
Carboidratos	1,0-2,0 mg/ml
Glucose	0,6-1,2 mg/ml
Hexosamina	6-1,2 mg/ml
Ácido Lácteo	0,5-2,0mg/ml
Ácido piruvico	2-10 µg/ml
Poliaminas	
Putrecina, espermidina	0,1-1,0 µM
Uréia	170-300 µg/ml
Inorgânicos	0,14-0,16 M
Cálcio	4-7 mM
Clorídrico	100 µM
Ferro	10-50 µM
Potássio	5-15 mM
Fosfatase	2-5 mM
Selênio	0,01 µM
Sódio	135-155 mM
Zinco	0,1-1,0 nM
Hormônios	0,1-200 nM
Hidrocortisona	10-200 ng/ml
Insulina	1-100 ng/ml
Triodoironina	20 nM
Tiroxina	100 nM
Vitaminas	10 ng-10 µg/ml
Vitamina A	10-100 ng/ml
Folato	5-20 ng/ml

(Freshney, 2000)

**The role of p38 mitogen-activated protein kinase in serum-induced leukemia
inhibitory factor secretion by bone marrow stromal cells from pediatric
Myelodysplastic Syndromes**

Simone V. da Costa, Rosimeire A. Roela, Mara Souza Junqueira, M. Mitzi Brentani

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Departamento de Radiologia
(LIM24), São Paulo, Brazil

Abstract

In this study we evaluated the role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) family in serum-induced secretion of leukemia inhibitory factor (LIF) by bone marrow stromal cells from pediatric myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukemia (AML) associated with MDS (MDS-AML). We demonstrated that extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK and c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK) contribute equally to serum induction of LIF in stromal cells from healthy children, whereas in MDS and MDS-AML, p38 MAPK was critical for LIF secretion. Sustained high basal p38 MAPK activated form, independent of serum addition may contribute to maintenance of LIF production.

Keywords: Pediatric myelodysplastic syndromes, bone marrow stromal cell, leukemia inhibitor factor; MAPK, p38 MAPK, serum

1. Introduction

Pediatric myelodysplastic syndromes (MDS) are rare, and constitute a heterogeneous group of hemopoietic stem cell disorders characterized by varying degrees of anemia, leukopenia and thrombocytopenia. MDS that occur in children present an increased risk for progression to acute myeloid leukemia (MDS-AML). The hematopoietic progenitors in MDS show a decreased capacity for differentiation and an increased propensity for apoptosis, leading to ineffective hematopoiesis and often to a compensatory marrow hyperplasia (1). The defective hematopoiesis in MDS has been suggested as being due to overproduction of growth inhibitory cytokine or either to an intrinsic disturbance in cytokine receptor-signal transduction (2).

These cytokines including IL-6, IL-7 and leukemia inhibitory factor (LIF) are mainly

secreted from adherent stromal cells of nonhematopoietic origin, which together with the extracellular matrix constitute the Bone Marrow (BM) microenvironment (3). Recently, we recorded higher LIF mRNA levels in stromal cells from pediatric MDS and MDS-AML as compared to those found in normal cells (4). In agreement with our results, Narendran et al., 2004 described enhanced LIF expression in stromal cells from one pediatric MDS case related with trisomy 8, probably having as a consequence a direct stimulatory effect of the soluble protein on hematopoietic malignant cells and the induction of apoptosis of normal cells observed in MDS (5). An *in vitro* study evaluated the role of extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and the *c-jun* NH₂-terminal kinase (JNK) in serum-induced LIF secretion by a human bone marrow stromal cell line (HS-5) and was reported that among these kinases, ERK and p38MAPK

activation played an important role in the LIF production (6).

Interestingly, pediatric MDS is, at least in part, seem to be caused by aberrant signal transduction resulting from mutations of components of the RAS signaling pathway including ERK (7), whereas p38 MAPK has been previously described as constitutively activated or phosphorylated in MDS (8, 9).

Pharmacologic inhibitors to these pathways have shown therapeutic applications in the MDS treatment (10) and may act in part by inhibition of cytokine production (11) which seems to be a valuable therapeutic approach to induce remissions and prolong survival of such patients. Thus, the aim of the present study was determine the participation of ERK, p38MAPK, and JNK kinases in LIF expression in primary cultures from bone marrow stromal cells from MDS, MDS-AML patients and healthy children.

2. Patients, material and methods

2.1. Patients and primary cell culture

Local ethics committee approval (informed consent in accordance with the Helsinki protocol) was obtained for the use bone marrow aspirates from pediatric MDS patients and healthy donors. Bone marrow aspirates were obtained from the posterior iliac crest of two patients classified as RAEB II and one as MDS-AML (two males and one female ranging age from 1 to 12 years) considering FAB classification and two healthy age-matched children submitted to corrective orthopedic surgeries.

Primary bone marrow stromal cell cultures were obtained as previously reported by our group (12). For all experiments, cells at 70% confluence were serum starved during 48 h and then stimulated with 20 % foetal calf serum (FCS, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for specific times. The serum starvation was not toxic to cells, as evaluated by Trypan blue (Sigma, St. Louis, MO, USA) staining (data not shown).

2.2. Quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR)

Total RNA obtained from bone marrow stromal cells from one MDS-AML patient and one healthy child (CT) was used to perform quantitative real-time PCR as previously described in our report (4). LIF mRNA expression were plotted as

relative expression values determined by dividing the quantity of PCR product in FCS-stimulated cells by values obtained to unstimulated cells, using the normalized values.

2.3. Microarray analysis

Total RNA from bone stromal cells from two MDS and two healthy children (CT) were extracted by TRIZOL reagent (Invitrogen) and purified with RNeasy minicolumns and reagents (Qiagen, Hilden, Germany). RNA microarray analysis was performed with 10 µg of biotin-labelled cRNA target prepared by a linear amplification method from pool of samples. The poly(A)⁺ RNA (mRNA) subpopulation within the total RNA population is primed for reverse transcription by a DNA oligonucleotide containing the T7 RNA polymerase promoter 5' to a d(T)₂₄ sequence. After second-strand cDNA synthesis, the cDNA serves as the template for an *in vitro* transcription (IVT) reaction to produce the target cRNA. This cRNA was hybridized using CodeLinkTM Human Whole Genome 55K Bioarray (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and the hybridization signal was normalized using the CodeLinkTM System Software Analysis (GE Healthcare). Genes with two-fold in MDS VS. CT comparison were considering as differentially expressed genes. The analyses of these genes were performed using KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) and MILANO (<http://milano.md.huji.ac.il/>) databases.

2.4. Quantification of LIF protein levels by ELISA

Cell-free supernatants from cells bone marrow cultures were assayed for the presence of LIF using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits purchased from R&DSYSTEMS (Minneapolis, MN, U.S.A.). The concentrations of LIF were calculated based on standard curves generated from recombinant LIF provided with the kits. All assays were conducted according to manufacturer's specifications. The density optics was determined in wave length of 540nm-570nm in ELISA reader model 550 (BIORAD).

2.5. MAPK contribution in bone marrow stromal cells LIF production induced by serum.

Serum-starved stromal cells were incubated with specific inhibitor concentrations of p38 (SB203580), JNK (SP600125) and ERK1/2 (PD98059) for 1 hour followed by serum stimulation for 24 hours. All MAPK inhibitors

were obtained from Calbiochem (San Diego, CA, USA). The cell supernatants were then processed to determine LIF protein levels by ELISA. Results are presented as mean $\pm$ SD. Statistical significance was determined with one-way analysis of variance (ANOVA). Differences were considered statistically significant at a value of $P < 0.001$.

2.5. Protein isolation and Western blot analysis

After treatment, the stromal cells were washed with phosphate buffer saline (PBS) and lysed with the lysis buffer (Triton X-100 1%, NaCl 150 mM, Tris 50 mM pH 7.4), with the proteases inhibitors phenylmethyl sulphonyl fluoride [PMSF] and aprotinin. The cells were centrifuged, and the supernatants were stored -20°C until use. The protein concentration was determined using the Kit assay BCA protein (BioAgency).

Protein extracts (40 mg) from bone marrow stromal cells were separated by 10% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS $\pm$ PAGE), and the separated proteins were electrophoretically transferred to Hybond $\pm$ PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, U.K.). Nonspecific background was blocked by incubating the membrane in Tris buffered saline-Tween20 (TBST) buffer (Tris 25, pH 7.8, NaCl 125, and Tween-20 0.1%) containing 5% bovine serum albumin (BSA) for 2h at room temperature. The membrane was washed three times in TBS-T buffer and then incubated overnight at 48 °C with the appropriate dilution of primary antibody. After three washes in TBS-T buffer, the membrane was incubated for 1 h at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit immunoglobulin (Amersham Pharmacia Biotech), and the antibody complexes were visualized by the ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech) as indicated by the manufacturer.

3. Results

3.1. FCS induces LIF production by bone marrow stromal cells from MDS and healthy children.

To investigate the effects of growth factors from serum on LIF production by bone marrow stromal primary cell cultures from children with MDS, we stimulated serum starved cells (48h) with FCS and measured the protein level of LIF in the cell

supernatant by ELISA and LIF mRNA expression was determined in the stromal cells using quantitative real time PCR.

As shown in figure 1A, unstimulated bone marrow stromal cell cultures from MDS, MDS-AML and healthy (CT) children presented respectively 12.65, 6.33 and 4.83 pg of LIF protein per 10^6 cells. All FCS-stimulated stromal cells showed an increased protein LIF levels in a time dependent manner.

The LIF mRNA expression in MDS-AML and CT children were also increased during the time course of FCS stimulation but LIF mRNA enhancement was larger in cells from MDS-AML (figure 1B).

3.2. Effects of MAPK inhibitor on LIF production by stromal cells

We used ERK (PD98059), p38 (SB302580) and JNK (SP600125) inhibitors to evaluate the role of these MAPK which might be involved with LIF production by FCS-stimulated stromal cells. Serum-starved (48h) cells were incubated with various concentrations of inhibitors by 1h. These concentrations were not toxic to the cells, as determined by trypan blue staining. Cells were then stimulated for 24h with FCS and the concentrations of LIF protein in culture supernatant were determined. As shown in figure 2 A and B, in stromal cells from the two healthy children, LIF production induced by FCS was inhibited in a dose-independent manner by all three inhibitors. However, in stromal cells from MDS and MDS-AML, FCS-induced LIF production was significantly decreased ($p < 0.001$, ANOVA test) by SB302580, as compared with the inhibition observed with PD98059 and SP600125. Therefore ERK, p38 kinase and JNK are involved in serum-induction of LIF by bone marrow stromal cells from healthy children whereas p38 kinase appears critical for LIF production by MDS and MDS-AML.

3.3. FCS effects on phosphorylation of ERK and p38 kinase in bone stromal cells

To determine whether FCS could induce the activation of ERK and p38 kinase in stromal cells from MDS, MDS-AML and healthy children, we exposed these cells to FCS for desired times after 48h of serum starvation, and phosphorylation of ERK and p38 kinase was measured by Western blot analysis. All bone marrow stromal cells FCS-unstimulated

presented basal phosphorylated forms of ERK1/2 and p38 kinase at different levels.

Primary bone marrow stromal cells presented various patterns of ERK phosphorylation: *i)* Amounts of phosphorylated form of ERK1/2 in FCS-stimulated bone marrow stromal cells were rapidly increased, peaked at 15 minutes in CT1 and MDS2 and then gradually declined to lower than those considered as basal levels; *ii)* FCS - unstimulated CT2 and MDS-AML bone marrow stromal cells presented higher phosphorylation of ERK1/2 which was decreased during serum exposure; and *iii)* FCS -stimulated MDS1 bone marrow stromal cells maintained the same high levels of ERK1/2 phosphorylated observed in cells without FCS (Figure 3).

Levels of phosphorylated form of p38 kinase did not change significantly during the time course of FCS stimulation in this study, as compared to those determined for cells before treatment (Figure 3).

3.4. MAPK pathway

We previously described the gene expression profile in bone marrow stromal cells from pediatric MDS using a cDNA platform representing 4608 genes/ Open reading frame-expressed sequences tags. In this context, pathway analysis of these genes were performed using KEGG pathway database and presented a significant number of genes involved in signaling pathways (4). To confirm these data we have determined genes differentially expressed (more than 2-fold changes) in MDS bone marrow stromal cells as compared to healthy children using a CodeLink™ Human Whole Genome 55K Bioarray. Among these we observed genes differentially expressed in common determined using our home-made platform, such as GLTSCR2, IGFBP4, TOP2A e SLC20A1 that were validated by quantitative real-time PCR (4). The analyses performed by KEGG database classified 1990 genes differentially expressed in a large number of signaling pathways (Table 1S, supplementary information). Among signaling pathways evaluated were observed mainly genes involved with 'MAPK signaling pathway' (Table 1 and figure 4). Interestingly, we determined 20 genes from the 65 down-expressed and 13 from the 31 genes up-regulated associated with leukemia inhibitory factor (LIF) (Table 1).

4. Discussion

In MDS cytokines together with growth factors are described to contribute to the paradox of increased proliferation of hematopoietic cells being cancelled by an equally increased rate of intramedullary apoptosis (2). Several lines of evidence suggest that alterations in the stromal compartment of pediatric MDS might contribute to abnormal hematopoiesis in this pathology (12). This effect may be mediated at least in part by release of soluble cytokines produced by stromal cells. Our previous report (4) showed that among the cytokines determined only LIF mRNA levels in stromal cells from pediatric MDS and MDS-AML was higher as compared to those found in healthy stromal cells. In accordance, Narendran et al., 2004 described enhanced LIF expression in stromal cells from one pediatric MDS case related with trisomy 8, and suggested that LIF might be associated with a direct stimulatory effect on hematopoietic malignant cells and the induction of apoptosis of normal cells observed in MDS (6). A previous report also suggested that LIF produced by stromal cells may contribute to stem cell expansion (13). The bone marrow stromal cells is source of many molecules described to induce LIF expression such as Interleukin 1alpha (IL-1alpha), IL-1beta, IL-3, IL-6, IL-8, tumour necrosis factor (TNF-alpha) and SCF that stimulate LIF production and by contrast macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), granulocyte (G)-CSF, GM-CSF, basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-activating factor (PAF), prostaglandin E2 (PGE2), leukotriene B4 (LTB4), and leukotriene C4 (LTC4) did not (14).

However, the pathways required for stromal cells to increase LIF expression in pediatric MDS remain to be clarified. In a previous work, ERK and p38 MAPK have been associated to LIF serum-induced secretion in a human bone marrow transformed stromal cell line, HS-5 (6).

In this work we performed the analysis using KEGG database of differentially expressed genes in bone marrow stromal cells from MDS as compared with healthy children and we determined genes mainly involved with 'MAPK signaling pathway'. Among these 96 genes 34% were associated with LIF suggesting a possible relation between MAPK pathway and LIF secretion by MDS stromal cells. Interestingly, among genes associated simultaneously with 'MAPK signaling pathway' and LIF we noted, for example, MYC, and genes from FGF family which are associated mainly with morphogenesis. Thus, LIF modulates c-Myc and

FGF expression contributing to the cascade of gene expression that supports pluripotency of embryonic stem cells (14, 16).

Considering all these findings our goal was to determine the participation of ERK, p38MAPK, and JNK in LIF expression in bone marrow cells from MDS, MDS-AML and healthy children.

Our next step was the kinetic analysis of LIF expression by stromal cells stimulated with serum that contains an undefined mix of growth factors and mitogens which normally exist in the marrow microenvironment. Our results indicated that all uninduced stromal cells produced LIF protein expression. After serum stimulation, a simultaneous increase of LIF protein production and their mRNA levels were observed in both MDS-AML as well in control cells. However LIF protein production increase was higher in MDS stromal cells than in CT and MDS-AML stromal cells.

Our next goal was to investigate the participation of ERK, p38MAPK and JNK in the induction of LIF production. In this study, we used specific pharmacological inhibitors PD98059, SB203580 and SP600125 in order to elucidate the biological function of these MAP kinases. Pretreatment of bone stromal cells from healthy children with ERK, p38MAPK and JNK inhibitors equally decrease 75% the FCS-induced LIF production, while, in MDS and MDS-AML stromal cells only the p38 MAPK inhibitor suppressed 70% of LIF production serum induced suggesting that p38 MAPK has an important role during LIF induction in MDS and MDS-AML. Interestingly, the importance of p38 MAPK in MDS has been described as overactivated but not overexpressed in a large number of MDS patients, even in those with different chromosomal alterations (9).

Therefore, we measured phosphorylated forms of ERK and p38 MAPK in all bone marrow stromal cells and both kinases were detected in the unstimulated cells. After exposure to FCS we noted an enhanced phosphorylation of ERK as compared with that observed for p38 kinase whose basal levels of phosphorylation were maintained suggesting that p38 activation was not serum dependent, but the sustained activation of p38 kinase might be an important mediator of LIF production. Our data contradicted findings from Nakao et al., 2002 (6) which reported the appearance of phosphorylated forms of ERK and p38MAPK only after serum induction in an immortalized bone marrow stromal cell from an adult healthy donor which may not always reflect primary pediatric MDS cell cultures.

Our study contributed to determinate the possible importance of p38 MAPK pathway in bone marrow stromal cells from pediatric MDS and MDS-AML for LIF production, that was already observed in hematopoietic cells from adult patients with MDS (Navas et al,2006). However, further studies will require validation with an enhanced number of patients.

Acknowledgments: The authors would like to acknowledge Dr. Luiz Fernando Lopes from the Cancer Treatment and Research Center, Hospital do Câncer, and Dr Roberto Guarnieiro from Instituto de Ortopedia e Traumatologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo for providing MDS and healthy donors bone marrow aspirates.

This study was supported by Grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e tecnológico (CNPq no. 401053/2005-9).

Author Contribution:

S.V. Costa: performed research, analyzed data, and wrote the manuscript; R. A. Roela: designed research, performed research, analyzed data, and wrote the manuscript; M.S. Junqueira: performed western blot experiments and analyzed these data; M. M. Brentani: designed research, performed research, analyzed data, and wrote the manuscript.

5. References

1. Cazzola M. and Malcovati L., Myelodysplastic syndromes—coping with ineffective hematopoiesis, *N Engl J Med.* 2005; 352: 536 – 8.
 2. López-Karpovitch X, Barrales-Benítez O, Flores M, Piedras J. Effect of azacytidine in the release of leukemia inhibitory factor, oncostatin m, interleukin (IL)-6, and IL-11 by mononuclear cells of patients with refractory anemia. *Cytokine.* 2002; 20(4):154 - 62.
 3. Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, Yang YS, Im HJ, Kim KH, Jung HL, Sung KW, Koo HH. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine.* 2005;31(2):119-26.
 4. Roela RA, Carraro DM, Brentani HP, Kaiano JH, Simão DF, Guarnieiro R, Lopes LF, Borojevic R, Brentani MM. Gene stage-specific expression in the microenvironment of pediatric myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* 2007;31(5):579-89.
-

-
5. Narendran A, Hawkins LM, Ganjavi H, Vanek W, Gee MF, Barlow JW, Johnson G, Malkin D, Freedman MH. Characterization of bone marrow stromal abnormalities in a patient with constitutional trisomy 8 mosaicism and myelodysplastic syndrome. *Pediatr Hematol Oncol.* 2004;21(3):209-21.
 6. Nakao T, Kim S, Ohta K, Kawano H, Hino M, Miura K, Tatsumi N, Iwao H. Role of mitogen-activated protein kinase family in serum-induced leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 secretion by bone marrow stromal cells. *Br J Pharmacol.* 2002;136(7):975-84.
 7. Zebisch A, Czernilofsky AP, Keri G, Smigelskaite J, Sill H, Troppmair J. Signaling through RAS-RAF-MEK-ERK: from basics to bedside. *Curr Med Chem.* 2007;14(5):601-23.
 8. Navas TA, Mohindru M, Estes M, Ma JY, Sokol L, Pahanish P, Parmar S, Haghazari E, Zhou L, Collins R, Kerr I, Nguyen AN, Xu Y, Platanias LC, List AA, Higgins LS, Verma A. Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood.* 2006;108(13):4170-7.
 9. Zhou L, Opalinska J, Verma A. p38 MAP kinase regulates stem cell apoptosis in human hematopoietic failure. *Cell Cycle.* 2007;6(5):534-7.
 10. Katsoulidis E, Li Y, Yoon P, Sassano A, Altman J, Kannan-Thulasiraman P, Balasubramanian L, Parmar S, Varga J, Tallman MS, Verma A, Platanias LC. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cytokine-mediated hematopoietic suppression in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res.* 2005;65(19):9029-37.
 11. Greenberg P. Treatment of myelodysplastic syndrome with agents interfering with inhibitory cytokines. *Ann Rheum Dis.* 2001;60 Suppl 3:iii41-2.
 12. Borojevic R, Roela RA, Rodarte RS, Thiago LS, Pasini FS, Conti FM, Rossi MI, Reis LF, Lopes LF, Brentani MM. Bone marrow stroma in childhood myelodysplastic Syndrome: composition, ability to sustain hematopoiesis in vitro, and altered gene expression. *Leuk Res.* 2004;28(8):831-44.
 13. Shih CC, Hu MC, Hu J, Weng Y, Yazaki PJ, Medeiros J, Forman SJ. A secreted and LIF-mediated stromal cell-derived activity that promotes ex vivo expansion of human hematopoietic stem cells. *Blood.* 2000;95(6):1957-66.
 14. Lorgeot V, Rougier F, Fixe P, Cornu E, Praloran V, Denizot Y. Spontaneous and inducible production of leukaemia inhibitory factor by human bone marrow stromal cells. *Cytokine.* 1997;9(10):754-8.
 15. Cartwright P., McLean C., Sheppard A., Rivett D., Jones K. and Dalton S. (2005) LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 132, 885–896.
 16. Dvorak P, Hampl A. Basic fibroblast growth factor and its receptors in human embryonic stem cells. *Folia Histochem Cytobiol.* 2005;43(4):203-8.
-

Table

Table 1 - Gene differentially expressed involved in MAPK Signaling Pathway

Genes down-expressed	ACVR1C AKT3 ARRB1 ARRB2 ATF4 CACNA1B CACNA1C CACNA1G CACNA1H CACNA1S CACNB2 CACNB3 CACNG8 CD14 CDC42 CHP DUSP10 ECSIT ELK1 FGF13 FGF14 FGF16 FGF17 FGF19 FGF22 FGF7 FGF9 FGFR3 FGFR4 FLNB IKBKB IL1A MAP3K12 MAP3K13 MAP3K6 MAP4K2 MAPK3 MAPK7 MAPK8IP3 MAPT MEF2C MKNK1 MOS MYC NF1 NFATC4 NR4A1 NTRK2 PAK1 PDGFRB PLA2G2A PLA2G2E PLA2G2F PPP3R1 PPP3R2 PTPN7 RAP1B RASA1 RASGRP1 RASGRP2 RPS6KA1 RPS6KA2 TAOK2 TGFB2 TP53
	ATF2 BDNF CACNG1 CDC42 CHUK ELK4 EVI1 FGF2 FGF21 FGF5 GNG12 GRB2 MAP3K1 MAP3K2 MAP3K7 MAP4K4 MAPK1 MAPK9 NLK NRAS PPP3CA PRKACB PRKCA RAC1 RAP1A RAP1B RASA2 RASGRF2 RPS6KA3 STK4 STMN1

Genes associated with LIF using MILANO database were shown in bold

Figures

Figure 1 FCS induces LIF production. After 48h of serum starvation, MDS, MDS-AML and CT1 bone marrow stromal cells were cultured with 10% FCS and LIF protein (A) and mRNA (B) levels were determined at 0, 0.5, 1, 2 and 3 hours. The amount of LIF protein levels (A) were normalized to cell concentration in each sample and LIF mRNA expression (B) were plotted as relative expression values determined by dividing the quantity of PCR product in FCS-stimulated cells by values obtained to unstimulated cells. Results are expressed as mean±SD (n=3).

Figure 2 P38 kinase, JNK and ERK contribution in serum induction of LIF production by bone marrow stromal cells. After serum starving, stromal cells were cultured with and without increasing concentration of SB203580 (P38 kinase), SP600125 (JNK) and PD98059 (ERK) inhibitors for 1h. Then stromal cells were stimulated with FCS and concentrations of LIF were determined by ELISA in cells from (A) CT1, (B) CT2, (C) MDS-AML and (D) MDS patients. The amount of LIF protein levels were normalized to cell concentration in each sample and the results are expressed as mean $\pm$ SD (n=3). *** P<0.001 compared with other MAPK inhibitors.

Figure 3 Bone marrow stromal cells presented phosphorylated forms of ERK1/2 and p38 MAPK in basal levels. After 48 hours of serum starving, stromal cells were stimulated with FCS for indicated periods of time. Phosphorylated and native forms of p38 and ERK1/2 were analyzed using specific antibodies. (A) CT1, (B) CT2 (C) MDS1, (D) MDS2 and (E) MDS-AML displayed different kinetic of ERK1/2 phosphorylation, whereas phosphorylated form of p38 maintained basal levels.

Figure 4 Representative signaling pathways were identified for genes differentially expressed in bone marrow stromal cells from MDS patients in CodeLink platform.

Referências

Allampallam K, Shetty V, Mundle S, Dutt D, Kravitz H, Reiddy PL, Alvi S, Galili N, Anthawal S, Shaikh MW, York A, Raza A. Biological significance of proliferation, apoptosis, cytokines, and monocyte/macrophage cells in bone marrow biopsies of 145 patients with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol*. 2002 Apr;75(3):289-97.

Borojevic R, Roela RA, Rodarte RS, Thiago LS, Pasini FS, Conti FM, Rossi MI, Reis LF, Lopes LF, Brentani MM. Bone marrow stroma in childhood myelodysplastic syndrome: Composition, ability to sustain hematopoiesis in vitro, and altered gene expression. *Leuk Res*. 2004;28(8):831-44.

Braun T e Fenaux P. Farnesyltransferase inhibitors and their potential role in therapy for myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2008 May;141(5):576-86. Epub 2008 Apr 10.

Cailleau R, Yong R, Olivé M, Reeves WJ Jr. Breast tumor cell lines from pleural effusions. *J Natl Cancer Inst*. 1974 Sep;53(3):661-74.

Cheng JG, Chen JR, Hernandez L, Alvord WG, Stewart CL. Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 17;98(15):8680-5. Epub 2001 Jul 3.

Chodorowska G, Glowacka A, Tomczyk M. Leukemia inhibitory factor (LIF) and its biological activity. *Ann. Univ. Marie Curie Skłodowska*. 2004;59(2):189-93.(Chodorowska e col., 2004).

Chomczynski P e Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987 Apr;162(1):156-9.

Claessens YE, Bouscary D, Dupont JM, Picard F, Melle J, Gisselbrecht S, Lacombe C, Dreyfus F, Mayeux P, Fontenaiy-Roupie M. In vitro proliferation and differentiation of erythroid progenitors from patients with myelodysplastic syndromes: evidence for Fas-dependent apoptosis. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1594-601.

Gearing DP, Thut CJ, VanBos T, Gimpel SD, Delaney PB, King J, Price V, Cosman D, Beckmann MP. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J.* 1991 Oct;10(10):2839-48.

Dührsen U, Hossfeld DK. Stromal abnormalities in neoplastic bone marrow diseases. *Ann. Hematol.*, 1996; 73: 53 – 70.

Katsoulidis E, Yongzhong Li, Patrick Yoon, Antonella Sassano, Jessica Altman, Padma Kannan-Thulasiraman, Lakshmi Balasubramanian, Simrit Parmar, John Varga, Martin S. Tallman, Amit Verma e Leonidas C. Platanias. Role of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Cytokine-Mediated Hematopoietic Suppression in Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Res* 2005; 65: (19). October 1, 2005.

Hellström-Lindberg Eva e Malcovati Luca. Supportive care, growth factors, and new therapies in myelodysplastic syndromes. *REVIEW Blood Reviews* (2008) 22, 75–91.

Göllner G, Bug G, Rupilius B, Peschel C, Huber C, Derigs HG. Regulatory Elements of the Leukemia Inhibitor Factor (LIF) Promoter in Murine Bone Marrow Stromal Cells. *Cytokine* 1999;11(9):656-663.

English JM. e Cobb MH. Pharmacological inhibitors of MAPK pathways. *TRENDS in Pharmacological Sciences* Vol.23 No.1 January 2002.

Koller MR, Bender JG, Miller WM, Papoutsakis ET. Reduced oxygen tension increase hematopoiesis in long-term culture of human stem and progenitor cells from blood and bone marrow. *Exp. Hematol.* 1992;20(2):264-70.

Kristensen DM, Kalisz M e Nielsen JH. Cytokine signaling in embryonic stem cells. *APMIS* 2005;113:756-72.e col., 2005).

Platanias LC.. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *BLOOD*, 15 JUNE 2003.VOLUME 101, NUMBER 12.

Murphy LO e Blenis John. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *TRENDS in Biochemical Sciences* Vol.31 No.5 May 2006.

Löwenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341(14):1051-62.

Malemud CJ. Inhibitors of stress-activated protein/mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Pharmacol*. 2007 Jun;7(3):339-43. Epub 2007 Mar 29. Review.

Aouadi M., B. Binetruy, L. Caron, Y. Le Marchand-Brustel, F. Bost. Role of MAPKs in development and differentiation: lessons from knockout mice. *Biochimie* 88 (2006) 1091–1098.

Sawanobori M, Yamaguchi S, Asegawa M, Inoue M, Suzuki K, Kamiyama R, Hirokawa K, Kitagawa M. Expression of TNF receptors and related signaling molecules in the bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 27 (2003) 583-591. e col., 2003).

Lawrence MC, Jivan A, Shao C, Duan L, Goad D, Zaganjor E, Osborne J, McGlynn K, Stippec S, Earnest S, Chen e Cobb MH. The roles of MAPKs in disease. *Cell Res*. 2008 Apr;18(4):436-42.

Morrison DK & Daviz RJ. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2003;19:91-118.

Elghetany MT. Myelodysplastic Syndromes in Children: A Critical Review of Issues in the Diagnosis and Classification of 887 Cases From 13 Published Series. *Arch Pathol Lab Méd*. Vol 131, July 2007.

Bilko NM, Votyakova IA, Vasylovska SV, Bilko DI. Characterization of the interactions between stromal and haematopoietic progenitor cells in expansion cell culture models. *Cell Biology International* 29 (2005) 83e86.

Delaney PB, King J, Price V, Cosman D e Beckmann MP. Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *The EMBO Journal* vol.10 no.10 pp.2839-2848, 1991.

Roux PP e Blenis J. ERK and p38 MAPK-Activated Protein Kinases: a Family of Protein Kinases with Diverse Biological Functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, June 2004, p. 320–344.

Polychronopoulou S, Panagiotou JP, Kossiva L, Mavrou A, Anagnostou D, Haidas S. Clinical and morphological features of paediatric myelodysplastic syndromes: a review of 34 cases. *Acta Paediatr.* 2004 Aug;93(8):1015-23.

Roela RA, Cararo DM, Brentani HP, Kaiano JHL, Simão DF, Guarnieiro R, Lopes LF, Borojevic R, Brentani MM. Gene stage-specific expression in the microenvironment of pediatric myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research* 2007;31(5):579-89.

Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JCY e Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nature Reviews.* (7). 2007.

Nakao T, Kim S, Ohta K, Kawano H, Hino M, Miura K, Tatsumi N e Iwao H. Role of mitogen-activated protein kinase family in serum-induced leukaemia inhibitory factor and interleukin-6 secretion by bone marrow stromal cells. *British Journal of Pharmacology* (2002) 136, 975 ± 984.

Navas TA, Mohindru M, Estes M, Ma JY, Sokol L, Pahanish P, Parmar S, Haghnazari E, Zhou L, Collins R, Kerr I, Aaron N, Nguyen AN, Yin Xu, Platanias LC, Alan A. Inhibition of overactivated p38 MAPK can restore hematopoiesis in myelodysplastic syndrome progenitors. *Blood*, 2006. (13).108.

Uddin S, Yenush L, Sun XJ, Sweet ME, White MF, Platanias LC. Interferon- α engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3Vkinase. *J Biol Chem* 1995;270:15938–41.

Valentino L, Pierre J. JAK/STAT signal transduction: regulators and implication in hematological malignancies. *Biochem Pharmacol.* 2006;71(6):713-21.

Verfaillie CM. Direct contact between human primitive hematopoietic progenitors and bone marrow stroma is not required for long-term in vitro hematopoiesis. *Blood*. 1992;1:79(11):2821-6.

Mutalik VK, Venkatesh KV. Effect of the MAPK cascade structure, nuclear translocation and regulation of transcription factors on gene expression *BioSystems* 85 (2006) 144–157

Guo Yan-Lin e Yang B. Altered cell adhesion and cell viability in a p38alpha mitogen-activated protein kinase-deficient mouse embryonic stem cell line. *Stem Cells Dev.* 2006 Oct;15(5):655-64

Xia Y e Karin M. The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun Kinases. *Trends in Cell Biology* ;14(2) 2004.