ANDRÉ LUIZ SIQUEIRA DA SILVA

**Pesquisa de células-tronco tumorais em
pacientes com linfoma não-Hodgkin**

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

Programa de: Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2014**

ANDRÉ LUIZ SIQUEIRA DA SILVA

**Pesquisa de células-tronco tumorais em
pacientes com linfoma não-Hodgkin**

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

Programa de: Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do
Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da
Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018/11, de 1 de novembro de 2011.
A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

**São Paulo
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, André Luiz Siqueira

Pesquisa de células-tronco tumorais em pacientes com linfoma não-Hodgkins / André Luiz Siqueira Silva. -- São Paulo, 2014.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Descritores: 1.Células-tronco neoplásicas 2.Células-tronco 3.Linfoma não-Hodgkin 4.Transformação celular neoplásica 5.Divisão celular 6.Humanos 7.Camundongos nus

USP/FM/DBD-068/14

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais e minha irmã, por serem meu porto
seguro e o bem maior que possuo.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado neste momento tão importante da minha vida.

Aos meus pais, José Renato e Nadja Rodrigues e a minha irmã, Renata Beatriz por acreditarem nos meus sonhos, me ajudando a transformá-los em realidade.

A minha namorada Juliana Tironi, por todo carinho e dedicação, sentimentos esses que me deram forças para superar os momentos de dificuldade.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, pela oportunidade, pelos ensinamentos e orientações passadas durante o desenvolvimento deste estudo.

Às amigas Dra. Rita Cavaglieri, Dra. Zenaide Providello e Dra. Andréa Turbuck, pela paciência, por sempre estarem dispostas a me ajudar, incentivando e de diversas maneiras colaborando para a execução deste trabalho.

Às Dra. Adriana Debis, Dra. Luciana Maselli, Dra Débora Levy e ao Dr. Jorge Ruiz pelo auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Juliana Pereira, pela colaboração prestada na aquisição das amostras, e por todo conhecimento passado durante os momentos cruciais do projeto.

Aos amigos de laboratório, Ana Carolina (Nany), Carolina Romão, Natália Nascimento, Carolina Macedo, Karolline Santana, Viviane Dias, Bruno Sini, Ana Stern, Lívia Rosa e Suelen Feitoza pela ajuda, pelo companheirismo e pelo bate-papo que foram tão importantes durante o momento da execução do projeto para diminuir no estresse do dia a dia.

Às Dra. Nair Maeda e Dra Rosangela Soares pelas ótimas conversas, risadas e incentivos.

À CAPES e CNPq pelo apoio financeiro.

À Cleide Appolonio (Cleidinha), pelo carisma e assistência dada a todos os alunos do LIM 31.

À Denise Chaves, Linah Fukuya e Joel Bispo pela convivência e ajuda prestada.

A todos os amigos do LIM 10 pela companhia nos almoços e pela colaboração na reta final do projeto.

Aos amigos aqui não citados, que me ajudaram direta ou indiretamente a trilhar o meu caminho no desenvolvimento deste estudo.

Aos pacientes, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*A nossa maior glória não reside no fato
de nunca cairmos, mas sim em
levantarmo-nos sempre depois de cada
queda.*

Confúcio

SUMÁRIO

Lista de Abreviatura
Lista de Figuras
Lista de Tabelas
Resumo
Summary

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Células-tronco (CT)	1
1.1.1.	Definição das células-tronco	1
1.1.2.	Classificação das células-tronco	1
1.1.3.	Tipos de células-tronco	4
	<u>1.1.3.a) Células-tronco embrionárias (CTE).....</u>	4
	<u>1.1.3.b) Células-tronco adultas (CTA).....</u>	5
	<u>a) Células-tronco hematopoéticas (CTH).....</u>	6
	<u>b) Células-tronco mensequimais (CTM).....</u>	7
	<u>c) Células-tronco tumorais (CTT).....</u>	8
1.2.	A origem das CTT.....	10
1.3.	Identificação e isolamento das células-tronco tumorais.....	12
1.3.1.	Genes de indiferenciação nas células-tronco tumorais	12
1.3.2.	Marcadores de superfície celulares.....	13
1.4.	Células-tronco <i>versus</i> células-tronco tumorais.....	14
1.5.	Linfomas.....	16
1.5.1.	Epidemiologia dos linfomas no Brasil	17
1.5.2.	Linfoma não-Hodgkin.....	17
	<u>1.5.2.a) Tipos de linfoma não-Hodgkin.....</u>	18
	<u>1.5.2.b) Epigenética e a origem dos LNH.....</u>	21
1.6.	Xenoinxerto em camundongos IMUNODEPRIMIDOS (<i>in vivo</i>).....	21
2.	OBJETIVOS.....	23

3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1.	Parte I – Linfonodo.....	25
3.1.1.	Dissociação mecânica – técnica de explante.....	25
3.1.2.	Cultura primária.....	26
3.2.	Parte II - Medula óssea (MO).....	27
3.2.1.	Processamento da Medula Óssea.....	29
3.2.2.	Cultura primária.....	30
3.2.3.	Curva de crescimento.....	32
3.3.	Caracterização das células-tronco tumorais.....	32
3.3.1.	Citometria de fluxo para caracterizar a população celular.....	33
3.3.2.	RT-PCR para verificar expressão de genes de indiferenciação.....	36
	<u>3.3.2.a) Extração de RNA pelo método trizol.....</u>	<u>36</u>
	<u>3.3.2.b) Tratamento com DNase.....</u>	<u>37</u>
	<u>3.3.2.c) Síntese do DNA complementar – cDNA</u>	<u>37</u>
	<u>3.3.2.d) Reação em cadeia de polimerase – PCR</u>	<u>38</u>
	<u>3.3.2.e) Expressão dos genes de indiferenciação por RT-PCR</u>	<u>38</u>
3.4.	Estudo “<i>in vivo</i>”.....	39
3.4.1.	Xenoinxerto com células isoladas de linfonodo.....	40
3.4.2.	Xenoinxerto com células isoladas de medula óssea.....	40
3.4.3.	Imunofluorescência em camundongos imudodeprimidos.....	43
3.4.4.	Pesagem dos animais e dos órgãos.....	44
3.4.5.	Hemograma dos animais que receberam células da MO.....	44
3.5.	Análises estatísticas.....	44
4.	RESULTADOS.....	45
4.1.	Parte I – Linfonodo.....	45
4.1.1.	Triagens das amostras.....	45
4.1.2.	Isolamento das células a partir de cultura primária (explante).....	46
4.1.3.	Evidencias dos 2 diferentes tipos de meio de cultura	48

4.1.3.a) Aderência celular a partir das células em suspensão.....	48
4.1.3.b) Crescimento celular a partir dos explantes.....	49
4.1.4. Curva de crescimento das células isoladas de biópsias de linfonodo.....	51
4.1.5. Caracterização da população isolada por citometria de fluxo nas células isoladas de linfonodo.....	52
4.1.6. Biologia molecular – expressão dos genes de indiferenciação.....	53
4.1.7. Xenoenxerto em camundongos imunodeprimidos.....	54
 4.2. Parte II – Medula óssea.....	55
4.2.1. Triagens das amostras	55
4.2.2. Isolamento das células a partir de cultura primária de MO.....	57
4.2.2.a) Aderência celular a partir das células em suspensão.....	57
4.2.2.b) Crescimento celular a partir das células isoladas da camada mononucleada.....	58
4.2.3. Curva de crescimento das células isoladas de MO.....	59
4.2.4. Caracterização da população isolada por citometria de fluxo nas células isoladas medula óssea.....	59
4.2.5. Isolamento de células CD133+ pré-cultivo e pós-cultivo.....	61
4.2.6. Biologia molecular - expressão dos genes de indiferenciação.....	62
4.2.7. Xenoenxerto em camundongos imunodeprimidos.....	63
4.2.7.a) Avaliação macroscópica.....	63
4.2.7.b) Avaliação do peso corpóreo (PC).....	67
4.2.7.c) Avaliação do peso dos órgãos.....	68
4.2.7.d) Migração das células isoladas da MO marcadas com material fluorescente	70
4.2.7.e) Hemograma dos animais que receberam células	

	<u>isoladas da MO</u>	72
5.	DISCUSSÃO	73
6.	CONCLUSÃO.....	82
7.	ANEXOS.....	83
7.1.	Termo de consentimento.....	83
7.2.	Aprovação CAPPesq.....	86
7.3.	Adendo ao projeto.....	87
7.4.	Aprovação do ICESP.....	88
7.5.	Aprovação do uso de animais.....	89
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS

α -MEM	<i>alpha- Modified Eagle Medium</i>
ATV	<i>Associate tripsine Versene</i>
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTT	Célula-tronco tumoral
DMEMF12	<i>Dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture F-12</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNTP	Desoxiribonucleotídeo
DPEC	Dietilpirocarbonato
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
GUSB	Glucuronidase beta
LH	Linfoma de Hodgkin
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MO	Medula Óssea
Oct-4	<i>Octamer-binding transcription factor 4</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PC	Peso corpóreo
PE	<i>Phycorythrin</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SFB	Soro fetal bovino

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrativo da classificação das células-tronco (Adaptado de National Institutes of Health, 2013).

Figura 2 - Ilustração de como as drogas anti células-tronco tumorais atuaria na eliminação das mesmas (Adaptado de Reya et al., 2001).

Figura 3 - Proliferação e divisão das células tumorais. **A)** Células tumorais são heterogêneas, mas muitas das células podem proliferar consideravelmente e formar novos tumores. **B)** Células tumorais são heterogêneas e somente a célula-tronco tumoral (em amarelo) tem a habilidade para proliferar extensivamente e formar novos tumores (Adaptado de Reya et al., 2001).

Figura 4 - Falha no sistema de autorrenovação das células-tronco, vindo a originar as células-tronco tumorais (Adaptado de Reya et al., 2001).

Figura 5 - Ilustração da técnica de aspiração de medula óssea (Adaptado de Health Central, 2013).

Figura 6 - Ilustração do processamento de amostra líquida de medula óssea após centrifugação com reagente Ficoll-Paque™. Na visualização do produto é possível observar as frações da solução separadas por gradiente de densidade como plasma, células mononucleadas, o reagente Ficoll-Paque™ e os eritrócitos.

Figura 7 - Fluxograma de cultura primária das amostras de linfonodo e MO.

Figura 8 - Infográfico do xenoenxerto das amostras de células de linfonodo e MO.

Figura 9 - Imagem ilustrativa da lavagem da biópsia de linfonodo.

Figura 10 - Imagem ilustrativa dos fragmentos em placas de 6 poços. **(A)** Aderência dos fragmentos ao plástico após 1 hora de incubação; **(B)** As amostras foram suplementadas e incubadas com o meio de cultura com 20% de SFB.

Figura 11 - Após a realização dos explantes foi possível observar no 7^a dia de cultura primária as primeiras células aderidas **(A)** meio α -MEM **(B)** meio DMEM F12. (aumento de 40x).

Figura 12 - Crescimento celular ao redor dos explantes. **(A)** meio α -MEM **(B)** meio DMEM F12 (aumento de 40x).

Figura 13 - Confluência celular entre 70-90% na 3ª passagem. **(A)** meio α -MEM **(B)** meio DMEM F12 (aumento de 40X).

Figura 14 - Representação gráfica do tempo de dobramento das células isoladas de linfonodo pelo período de 10 dias.

Figura 15 – Marcadores de superfície para determinar a população celular isolada.

Figura 16 - Gel ilustrativo da expressão gênica das células extraídas de linfonodos. A) gene endógeno Gusb; B) gene de indiferenciação Nanog e C) gene de indiferenciação Oct-4.

Figura 17 - Momento da inoculação das células (A) e observação dos animais após 30 dias do início do experimento (B).

Figura 18 - Após o processamento do Ficoll Paque™ PLUS foi possível observar no 10º dia de cultura primária as primeiras células aderidas (aumento de 40x).

Figura 19 - Imagem ilustrando mais ou menos 80% de confluência na placa de cultivo (Aumento de 40x).

Figura 20 - Representação gráfica do tempo de dobramento das células isoladas de medula óssea pelo período de 10 dias.

Figura 21 - Imagem ilustrativa dos histogramas de citometria de fluxo das amostras de medula óssea.

Figura 22 - Representação gráfica do aumento de células CD133⁺ após o cultivo celular.

Figura 23 - Observação da amplificação dos genes de indiferenciação e do gene endógeno. **A)** expressão gênica do Nanog; **B)** expressão gênica do Nanog e **C)** expressão gênica do Oct-4.

Figura 24 - Imagem representativa da alteração subcutânea nos camundongos na região do inóculo $0,25 \times 10^5$ células isoladas da medula óssea de pacientes com LNH.

Figura 25 - Imagens representativas da formação de tumores subcutâneos em vários ângulos em camundongos imunodeprimidos, após o inóculo de 1×10^6 células isoladas da medula óssea de pacientes com LNH.

Figura 26 - Comparação entre o peso corpóreo dos animais que receberam o inóculo de células isoladas da medula óssea e os controles. Teste t de Student com resultados expressos em Média±DP.

Figura 27 - Análise do peso das peles e dos testículos dos animais que receberam o inóculo de células isoladas da medula óssea. Teste t de Student com resultados expressos em Média±DP.

Figura 28 - Análise do peso dos diferentes órgãos dos animais que receberam o inóculo de células isoladas da medula óssea (Coração, Pulmão, Baço, Fígado e Rim). Teste Mann-Whitney com resultados expressos mediana intervalo interquartil.

Figura 29 - Análise da razão do peso do órgão/PC (coração, pulmão, baço, rim, testículo, pele e fígado). ** $p < 0,01$ controle *versus* inóculo $1,0 \times 10^6$.

Figura 30 - Imagem ilustrando as leituras realizadas no momento da inoculação **(A)**; 24 horas após a inoculação **(B)** e 48 horas após a inoculação **(C)**.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características presentes e ausentes nas CT e CTT.

Tabela 2 - Tipos de Linfomas não-Hodgkin de acordo com sua agressividade.

Tabela 3 - Tipos de LNH e alterações genéticas encontradas em oncogenes.

Tabela 4 - Anticorpos monoclonais utilizados na caracterização das células-tronco por citometria de fluxo.

Tabela 5 - Relação das sequencias utilizadas para a expressão de indiferenciação celular.

Tabela 6 - Quadro indicando os pacientes que foram inclusos ou excluídos neste projeto.

Tabela 7 - Quadro com os pacientes que foram inclusos e excluídos.

Tabela 8 - Inoculação de CTT por camundongo com a classificação e o tipo do linfoma, observados por 40 dias.

Tabela 9 - Hemograma dos animais que receberam de 5×10^5 e 1×10^6 células isoladas de pacientes com LNH.

RESUMO

Silva ALS. Pesquisa de células-tronco tumorais em pacientes com linfoma não-Hodgkin [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2014.

Células-tronco (CT) são células com um alto poder de indiferenciação, plasticidade celular e autorrenovação. Baseado na autorrenovação das CT, pesquisas recentes sugerem que uma falha durante este processo pode levar ao surgimento de um novo tipo de célula, sendo esta responsável pelo aparecimento, propagação e manutenção de diversos tipos de neoplasias. Além disso, apresenta resistência às formas de tratamento convencionais do câncer. Tais células foram denominadas de células-tronco tumorais (CTT). As CTT já foram caracterizadas em leucemias e em diversos tipos de tumores sólidos, porém, até o presente momento, não foram descritas em linfoma não-Hodgkin (LNH). Por esta razão, o presente estudo teve como objetivo investigar a presença de CTT em pacientes com LNH. Biópsias de linfonodos e medulas ósseas (MO) de pacientes com LNH foram as fontes utilizadas para isolar e cultivar as CT mesenquimais. Uma vez caracterizadas as CTT, estas foram inoculadas em camundongos imunodeprimidos para observar uma possível formação de tumor. As células isoladas de biópsias de linfonodo não apresentaram CD133 positivo, marcador de membrana presente nas CTT, bem como não expressaram os genes de indiferenciação (Nanog e Oct-4) e não formaram tumores quando inoculadas nos animais. Por outro lado, as células isoladas de MO apresentaram subpopulações de células positivas para o CD133, expressaram os genes de indiferenciação e, após inoculadas, desenvolveram tumores em camundongos imunodeprimidos. Com isto, conclui-se que as células isoladas dos linfonodos possam ser fibroblastos, indicando, assim, uma dificuldade de se isolar as CTT deste material. Enquanto que, como já bem descrito e estabelecido na literatura, CT foram facilmente isoladas de MO, entretanto, quando isoladas de pacientes LNH foi ainda possível caracterizar a presença de uma subpopulação de CTT.

Descritores: Células-tronco neoplásicas, células-tronco, linfoma não-Hodgkin, transformação celular, divisão celular, humanos, camundongos nus

SUMMARY

Silva, ALS. Research on cancer stem cells in patients with non-Hodgkin lymphoma [Dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014.

Stem cells (SC) are undifferentiated cells, with high capacity of cellular plasticity and self-renewal. Based on the self-renewal, recent research suggests that a failure during this process, it can lead to the emergence of a new type of cell, which is responsible for the development, propagation and maintenance of several types of malignancies. Moreover, it is resistant to the conventional treatment of cancer. These cells are denominated as cancer stem cells (CSC). CSC were already characterized in leukemia and in several types of solid tumors. However, until the present moment nothing was described in non-Hodgkin lymphoma (NHL). For this reason, the present study aimed to investigate the presence of CSC in patients with NHL. Biopsies of lymph nodes and bone marrow (BM) from patients with NHL were used for isolate and cultivate MSC. The techniques used to characterize these cells were flow cytometry and PCR. Once CSC were characterized, these cells were inoculated into immunodeficient animals to observe a possible tumor formation. Cells isolated from lymph node biopsies did not show the presence of CD133, a membrane marker present in the CSC, as well as did not express differentiation genes (Nanog and Oct-4) and no ability to form tumors in immunodeficient mice. In another hands, cells isolated from BM showed a subpopulation of CD133 positive, expressed undifferentiated genes and also after the inoculation was possible to observe the tumor formation in immunodeficient mice. In conclusion, isolated cells from lymph nodes could be fibroblasts, indicating a difficulty to isolate CSC from this material. Whereas, as already describe and establish in the literature, SC were easily isolate from MO. However, when isolated from NHL patients was possible to characterize the presence of CSC subpopulation.

Descriptors: Neoplastic stem cells, stem cells, non-Hodgkin lymphoma, cell transformation, cell division, humans, mice nus

1. INTRODUÇÃO

1.1. Células-tronco (CT)

1.1.1 Definição das células-tronco

As CT são células indiferenciadas, encontradas em tecidos embrionários e adultos, responsáveis pela formação do embrião e também pela manutenção e reparo na vida adulta (Verfaillie *et al.*, 2002).

Conceitualmente, as CT apresentam 3 características fundamentais: 1) capacidade de se multiplicar, gerando cópias idênticas à célula original ao longo da vida, sendo este processo denominado auto-replicação; 2) habilidade de se diferenciar em diferentes linhagens; 3) capacidade de reconstituir funcionalmente, in vivo, um tecido danificado (Verfaillie *et al.*, 2002).

1.1.2. Classificação das células-tronco

Essas células são classificadas de acordo com a sua capacidade de diferenciação: totipotentes, pluripotentes, multipotentes e unipotentes (Soares & Santos, 2008; Mitalipov & Wof, 2009).

Célula totipotente é definida como uma célula que apresenta a habilidade de se dividir e produzir todos os folhetos embrionários de um organismo, incluindo tecidos extraembrionários. Tal característica é reservada exclusivamente ao zigoto, um aglomerado celular formado de 50 a 150 células, que também é conhecido com blastocisto (Eve *et al.*, 2008).

Pluripotente, de acordo com o Ferreira (2004), o prefixo “pluri” significa “muitos, vários”, já o sufixo “potente” é definido como “pode ter, tem a capacidade de produzir algo.” Por outro lado, na linguagem científica, pluripotente refere-se a uma CT que possui o poder de se diferenciar em qualquer uma das três camadas germinativas (endoderme, mesoderme ou

ectoderme), ou seja, origina quaisquer tipo de células fetais ou adultas, exceto tecidos extraembrionários (Mitalipov & Wof, 2009).

Células que possuem a capacidade de se diferenciar em um número limitado de tecidos são descritas como multipotentes. Essas células são encontradas em indivíduos adultos e a sua capacidade de diferenciação está limitada a sua origem (Clarke *et al.*, 2000).

Células unipotentes são células progenitoras ou amplificadoras transitórias, sendo encontradas na maioria dos tecidos adultos. Possuem capacidade de originar apenas um tipo de tecido, sendo, assim, responsáveis por grande parte da regeneração tecidual nos organismos (Hochedlinger & Plath, 2009; Takahashi & Yamanaka, 2006; Lanza, Gearhart & Hogan, 2006).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da classificação das células-tronco (Adaptado de National Institutes of Health, 2013).

1.1.3. Tipos de células-tronco

1.1.3.a) Células-tronco embrionárias (CTE)

Após a fecundação do oócito pelo espermatozoide, a célula formada em seguida é denominada zigoto e classificada como totipotente. Após 4 dias e sucessivas divisões mitóticas, aquela única célula passa a ser um aglomerado celular, também conhecido como mórula. Essas células darão início ao processo de formação do blastocisto e da sua massa interna de onde são obtidas as CTE pluripotentes (Alison *et al.*, 2009; Slack, 2008).

CTE são dotadas de um grande poder de pluripotência, podendo diferenciar-se em diversos tecidos do folheto embrionário: ectoderme, mesoderme e endoderme (Odorico et al, 2001; Deb,& Sarda, 2008). Embora sejam pluripotentes, essas células não possuem a capacidade de, isoladamente, darem origem a um embrião, já que não geram os tecidos de sustentação extraembrionários (Dvash *et al.*, 2004; Slack, 2008).

Apesar de sua pluripotência, o mecanismo que regula a capacidade dessa célula se diferenciar em diferentes linhagens celulares ainda não está completamente dominado pela ciência. Com isso, o seu tratamento na medicina regenerativa deve ser cuidadoso, uma vez que, em trabalhos onde inocularam tais células em camundongos, constatou-se a formação de teratomas (neoplasias malignas que contém células dos três folhetos embrionários: ectoderme, mesoderme e endoderme) (Dvash *et al.*, 2004, Odorico et al., 2001; Deb & Sarda, 2008).

Para realizar a comprovação se uma determinada célula é uma CTE, faz-se necessário que ela expresse determinados marcadores, tais como: CD9,

CD24, Oct-4, Nanog, e Sox-2 (Trounson, 2006; Richards *et al.*, 2004; Chambers & Smith, 2004).

1.1.3.b) Células-tronco adultas (CTA)

As CT também são encontradas em tecidos e órgãos. Nestes, participam da manutenção tecidual, gerando novas células de acordo com a necessidade fisiológica daquele organismo. Essas células indiferenciadas que exercem esse trabalho são denominadas de células-tronco adultas (CTA) (Odorico *et al.*, 2001; Chiu, 1996; Watt & Hogan, 2000).

As CTA estão em um estado de baixa proliferação, geralmente nas fases G0 e G1 do ciclo celular, presentes em determinadas regiões que irão auxiliar no seu desenvolvimento e manutenção de suas funções, em especial na aptidão de autorrenovação no tecido a qual pertence (Gritti, Vescovi & Galli, 2002).

A indiferenciação presente nas CTA é um evento associado a sinais extracelulares e regulação do controle de transcrição nuclear. Tais recursos moleculares que comandam estes fenômenos determinaram os principais marcadores de indiferenciação presentes nessas células: os genes Oct-4 e Nanog (Kastrinaki *et al.*, 2008).

As CTA dão início as suas divisões e diferenciações através de várias interações que acontecem no microambiente em que estão presentes. Mais especificamente, as CTA e as células do estroma se comunicam entre si para formar várias conexões intercelulares que manterão a integridade do tecido entre o estado de latência e o proliferativo (Arai *et al.*, 2004; Fuchs, Tumba & Guasch, 2004; Hirao, Arai & Suda, 2004).

Estas regiões nas quais as CTA estão presentes são conhecidas como nichos celulares e, dentre os principais locais onde estão presentes, podemos citar: medula óssea (Heissig, Ohki & Sato, 2005), coração (Leri, Kajstura & Anversa, 2005), rins (Li *et al.*, 2004), pele (Tumbar, Guasch & Greco, 2004), fígado (Guettier, 2005), cordão umbilical (Shahrokhi *et al.*;2012), gordura (Matsuda *et al.*; 2013) e líquido amniótico, entre outros (Kim *et al.*, 2005).

As primeiras CTA relatadas em estudos foram as células-tronco hematopoéticas, isoladas da medula óssea. Tais células diferenciaram-se nos constituintes mieloides e linfoides do tecido sanguíneo e foram utilizadas com extremo sucesso em transplantes autólogos. Em seguida, outro tipo de CTA também pertencente à medula óssea foi isolada. Esta, porém, apresentava características diferentes das células hematopoiéticas. Os pesquisadores estavam diante de uma célula-tronco mensequimal (CTM), assim denominada, pois derivava da mesoderme (Hirao, Arai & Suda, 2004).

a) Células-tronco hematopoéticas (CTH)

As CTH são conhecidas como uma CTA que possui um grande poder proliferativo e de autorrenovação, característica que auxilia a sua diferenciação celular nas mais diferentes linhagens hematológicas (Jain, 1986, Gasper, 2000). Sendo possível encontrá-las na medula óssea, no sangue periférico, no sangue do cordão umbilical e no sistema hematopoiético fetal (Negrin *et al.*, 2000; Laughlin, 2001; Humeau,1996).

Devido a seu fácil acesso e isolamento, é o tipo de CTA mais estudado dentre as demais, sendo conhecida a mais de 50 anos. Em 1959, o pesquisador Thomas e colaboradores, realizaram o primeiro transplante de

CTH entre gêmeos idênticos, mostrando a capacidade dessas células povoarem a medula óssea do receptor com novas células sanguíneas.

Nos dias atuais, as CTH são usadas para combater os mais variados tipos de patologias hematológicas, tais como: anemia falciforme, talassemias, anemia aplásica, leucemias e linfomas (Locatelli *et al.*, 2001). Essas CTA são conhecidas por expressarem os antígenos de superfície CD34, CD90 e ausência do CD38 (Humeau, 1996).

b) Células-tronco mensequimais (CTM)

As CTM têm gerado grande expectativa e promessa como potencial fonte de células em estratégias terapêuticas, principalmente devido à sua capacidade de se diferenciar em diversos tipos de células funcionais que constituem o tecido de origem. As CTM são consideradas uma fonte importante de células, porque já foi demonstrada sua eficácia em vários tipos de terapias celulares, como no caso de doenças de origem hematopoéticas e em regeneração do tecido ósseo (Baksh, Sog & Tuan, 2004).

A presença de CTH na medula óssea foi sugerida pela primeira vez pelo patologista alemão Cohnheim, cerca de 130 anos atrás, que propôs que a medula óssea poderia ser uma fonte de fibroblastos. Porém, somente no início de 1970, com o trabalho pioneiro de Friedenstein, foi demonstrada a presença de células fibroblastóides em medula óssea de roedores (Schipani, Kronenberg, 2008). Friedenstein lavava a medula óssea e, posteriormente, colocava as células em cultura, utilizando um recipiente plástico como ambiente de cultivo. As células não aderentes eram descartadas, sendo observado, em poucas horas, células fusiformes aderentes ao plástico.

Friedenstein também demonstrou que poderia regenerar tecido ósseo em casos de transplante heterotópico. Ao longo dos anos, numerosos laboratórios confirmaram seus resultados, mostrando que células isoladas, segundo o protocolo Friedenstein, formavam uma variedade de células da linhagem mesenquimal, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Schipani, Kronenberg, 2008).

As CTM não são encontradas exclusivamente na medula óssea, fazendo-se presentes em outros tecidos como o adiposo, sangue do cordão umbilical, líquido amniótico, placenta, polpa dentária, tendões, membrana sinovial e músculo esquelético (Schipani, Kronenberg, 2008).

Para uma determinada população de células ser caracterizada como CTM, faz-se necessário que ela apresente aderência à superfície de cultivo, que os marcadores moleculares CD73, CD90 e CD105 estejam expressos e que CD14, CD34, CD45 ou CD11b, CD79 ou CD 19 e HLA-DR estejam ausentes em mais de 95% das células isoladas. Por fim, essas células precisam ser diferenciadas nos tecidos cartilaginoso, ósseo e adiposo (Bydlowski *et al.*; 2009).

c) Células-tronco tumorais (CTT)

Soltanian e Matin (2011) relataram que o modelo clássico de desenvolvimento neoplásico ocorre a partir de uma série de mutações sequenciais, sendo resultado da instabilidade genética e/ou fatores ambientais que afetam as células saudáveis. Neste modelo, propõe-se que, para o desenvolvimento cancerígeno, a célula saudável precisa estar exposta a fatores genéticos e/ou epigenéticos por um longo período para que ocorra a

primeira mutação e, assim, formar e sustentar o tumor maligno, contudo, tecidos que estão em constante renovação, tais como, sangue, intestino e epiderme estão propensos a uma menor formação de tumores devido a sua alta replicação e regeneração tecidual (Reya *et al.*,2001). Desta maneira, uma possível alternativa para explicar o desenvolvimento neoplásico seria que as células indiferenciadas são capazes de iniciar o crescimento e a sustentação do tumor (Soltanian & Matin, 2011).

As características dessas células seriam a incapacidade de diferenciação, a alta atividade de replicação e resistência ao tratamento quimioterápico convencional. Desta maneira, tais células foram definidas como células-tronco tumorais (CTT), e seriam uma população rara de células indiferenciadas com alto poder tumorigênico e responsáveis pela iniciação, manutenção e propagação do tumor (Pardal, Clarke, Morrison, 2003).

As CTT foram primeiramente identificadas em leucemias (Bonnet & Dick, 1997) e, mais tarde, em tumores sólidos, tais como, mama (Al-Hajj *et al.*,2003), cérebro (Singh *et al.*, 2003), pulmão (Kim *et al.*,2005), próstata (Collins *et al.*, 2005), ovários (Szotek *et al.*,2006), cólon (O'Brien *et al.*,2007; Ricci-Vitiani *et al.*,2007), pele (Taylor *et al.*,2000), fígado (Yang *et al.*,2008) e pâncreas (Li *et al.*,2004). Entretanto, até o presente momento, a literatura não descreve a presença de CTT em LNH.

O conceito de CTT pode fornecer explicações para a falha de certos tratamentos. De acordo, com a imagem abaixo, conforme demonstrado pelo grupo de Reya em 2001, as células-tronco tumorais apresentam resistência às drogas quimioterápicas convencionais e mesmo que o tumor regrida, ainda assim, volta a se regenerar (Figura 2).

Figura 2 - Ilustração de como as drogas anti células-tronco tumorais atuaria na eliminação das mesmas (Adaptado de Reya *et al.*, 2001).

1.2. A origem das CTT

Os fatores epigenéticos são considerados como potentes vias para mutações que ocasionam a desregulamentação dos genes supressores de tumores (Feinberg *et al.*, 2006, Iacobuzio-Donahue, 2009). Desta maneira, tem sido proposto que o processo de carcinogênese envolve alterações epigenéticas nas células-tronco (Feinberg *et al.*, 2006, Suzuki *et al.*, 2004, Hanada *et al.*, 1993). Este processo pode afetar tanto a genética quanto a plasticidade de uma célula-tronco e, com isso, permitir a aquisição de determinadas características, tais como, desenvolver metástase e resistência a quimioterápicos (Feinberg *et al.*, 2006, Iacobuzio-Donahue, 2009).

A transformação de uma célula considerada normal em uma célula tumoral é um processo que envolve múltiplos fatores causados pelo acúmulo de mutações e alterações epigenéticas. Baseado nisso, é muito provável que

as CTT se originam de maneira semelhante, através de alterações que ocorrem nas CT de um organismo (Mutsaers & Walkley, 2014).

Após o surgimento das CTT em um sistema, elas continuam a se dividir assimetricamente criando, pelo menos, duas populações celulares diferentes. Uma população retém as propriedades de autorrenovação das CTT enquanto a outra herda apenas a capacidade de se diferenciar em células tumorais, porém, sem a capacidade de manter e propagar o desenvolvimento de um tumor. Essas hipóteses são apoiadas pela observação de que nem todas as células de um tumor podem manter o crescimento do mesmo. Além disso, a grande maioria dos tumores é formada por uma população celular heterogênea (Nakagawara & Ohira, 2004).

Figura 3 - Proliferação e divisão das células tumorais. **A)** Células tumorais são heterogêneas, mas muitas das células podem proliferar consideravelmente e formar novos tumores. **B)** Células tumorais são heterogêneas e somente a célula-tronco tumoral (em amarelo) tem a habilidade para proliferar extensivamente e formar novos tumores (Adaptado de Reya *et al.*, 2001).

Muitos estudos estão sendo realizados por diferentes grupos de pesquisas, em diversos tipos de neoplasias, buscando identificar metilações

que ocorrem em determinados genes e que podem levar ao desenvolvimento das CTT (Tarayrah & Chenx, 2013). Diversos pesquisadores relataram que alterações epigenéticas podem levar ao desenvolvimento de neoplasias. Alguns exemplos de doenças e alterações gênicas são: leucemia e o gene DNMT1 (Trowbridge *et al.*, 2012). Neoplasias de próstata, mama, fígado, pulmão e melanoma que derivam de metilações nos genes da família TET (TET1, TET2, TET3) (Pui CH, 2003, Lian *et al.*, 2012 Yang H *et al.*, 2013). Glioblastoma derivam de alterações nos genes BMI1 (Chatoo *et al.*, 2009, Stupp 2009) e MLL1 (Heddlestone *et al.*, 2012). Assim como, tais mutações no gene LSD1 levariam ao desenvolvimento de teratocarcinoma e carcinoma embrionário (Strickland *et al.*, 1980, Cheng L *et al.*, 2007, Wang J *et al.*, 2011).

Portanto, a compreensão das características celulares e moleculares da CTT é essencial para o desenvolvimento de novas terapias estratégicas em combate ao câncer (Tarayrah & Chenx, 2013).

1.3. Identificação e isolamento das células-tronco tumorais

1.3.1. Genes de indiferenciação nas células-tronco tumorais

Os genes Oct-4 e Nanog são marcadores específicos para células indiferenciadas. Sua expressão afere o potencial de pluripotência relacionada às CT. No entanto, várias pesquisas confirmaram que as CTT isoladas de diferentes linhagens de neoplasias também expressam esses genes. Por consequência disto, a expressão desses genes passou a ser fundamental para o isolamento e identificação de CTT (Phuc *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Wen *et al.*, 2013).

1.3.2. Marcadores de superfície celulares

Os marcadores de superfície celular para CTT são utilizados para auxiliar no seu isolamento. Contudo, devido à frequência de CTT presente em uma massa tumoral ser extremamente baixa (entre 1 e 4% da população total de células do tumor), o processo de isolamento destas células se torna extremamente complexo (Rasheed, 2010).

A identificação de marcadores específicos de neoplasias é essencial para a detecção precoce de câncer ou para o desenvolvimento de novas terapias que visam ao tratamento dessas patologias. Extensas pesquisas foram realizadas nos últimos anos para a identificação de marcadores celulares específicos para CTT. Entretanto, devido ao grande número de neoplasias estudadas, não foi possível até o presente momento afirmar quais seriam os marcadores celulares específicos para essa caracterização. Sabe-se que as escolhas dos marcadores variam de acordo com a origem do tumor (Yoon, 2012).

Um dos grandes marcadores que vem sendo apontado como marcador para CTT é o CD133. Em estudos recentes, este marcador foi encontrado em populações de células isoladas de neoplasias cerebrais e tais células foram capazes de sofrer autorrenovação e propagar tumores quando injetadas em camundongos imunodeprimidos (Hemmati *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2003). Além disso, a expressão do CD133 foi encontrada também em populações de células isoladas de câncer de colón (Ricci-Vitain *et al.*, 2007), próstata (Collins *et al.*, 2005) pulmão (Eramo *et al.*, 2008) e fígado (Ma *et al.*, 2007).

Outro marcador apontado como presente em CTT é o CD44. Este já foi demonstrado em neoplasias de mama (Al-Hajj *et al.*, 2003), ovário (Zhang *et al.*, 2008), próstata (Collins *et al.*, 2005), cabeça e pescoço (Prince *et al.*, 2007).

1.4. Células-tronco *versus* células-tronco tumorais

Determinar as diferenças e semelhanças existentes entre as CT e CTT é crucial para a compreensão da biologia do tumor, bem como para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (Mishra *et al.*, 2009).

Na tabela abaixo, estão relacionadas algumas semelhanças, assim como características específicas de cada tipo celular.

Tabela 1 – Características presentes e ausentes nas CT e CTT.

CARACTERÍSTICAS	CT	CTT
ESPECÍFICAS	Diferenciação celular em tecidos das 3 camadas germinativas.	Formação de tumor em camundongos imunodeprimidos Resistência a quimioterápicos
EM COMUM	Autorrenovação Genes de indiferenciação Marcadores de superfície semelhantes	

Uma das primeiras perguntas que surge aos pesquisadores que tentam entender esses dois tipos de células é, como essas células se proliferam e quais as suas diferenças? Pesquisas sugerem que a diferença entre uma e outra estaria, justamente, no seu mecanismo de autorrenovação que ambas possuem (Lobo *et al.*, 2007; He, Nakada, Morrison, 2009).

Uma importante observação nestes estudos foi a marcante associação entre a perda do fator que regula a correta autorrenovação das CT e o desenvolvimento de oncogenes nas novas células geradas. Dessa forma, muitos genes que promovem a autorrenovação também são oncogenes e muitos genes que inibem a autorrenovação também são supressores de tumores. Estas observações levaram à ideia de que as origens de algumas neoplasias estavam associadas a alguma falha na atividade de autorrenovação intrínseca das CT, falha essa que poderia ter ligação com fatores epigenéticos (Figura 4) (Shackleton, 2010; Lobo et al, 2007; He, Nakada & Morrison, 2009).

Figura 4 – Falha no sistema de autorrenovação das células-tronco, vindo a originar as células-tronco tumorais (Adaptado de Reya *et al.*, 2001).

1.5. Linfomas

O primeiro pesquisador a observar alterações no tecido linfoide foi Thomas Hodgkin, em 1832, que pelo seu pioneirismo veio a batizar tal patologia com seu nome. Desde então, tais distúrbios proliferativos têm sido estudados com o intuito de observar sua natureza inflamatória, infecciosa e neoplásica. Contudo, somente em 1858, o pesquisador Virchow empregou pela primeira vez, o termo linfoma e em 1868, o linfossarcoma foi identificado como um tumor maligno do sistema linfoide (Akanji, 2006; Stone, 2005).

Os linfomas dividem-se em duas grandes categorias, linfoma de Hodgkin (LH) e linfoma não-Hodgkin (LNH). Embora existam diferenças biológicas e clínicas que permitam separar os grandes grupos de LH e LNH, o diagnóstico definitivo só é feito pelo exame histopatológico, por vezes, acompanhado da imunofenotipagem da neoplasia (Soares *et al.*, 2006). Em ambos os casos, encontramos substituição do tecido linfático normal por um acúmulo de células linfáticas anormais (Silva, 2009).

Os linfomas caracterizam-se pela proliferação atípica e clonal de populações celulares que mantêm semelhanças morfológicas, imunológicas e funcionais com as células normais correspondentes. Em contrapartida, os linfomas compõem um vasto número de neoplasias que podem manifestar-se exclusiva ou predominantemente sob a forma tumoral, em massas sólidas, ou se apresentar sob a forma leucêmica (Soares *et al.*, 2006).

A maioria dos casos de linfoma não possui uma origem etiológica definida, sugerindo que fatores infecciosos, alimentares e/ou ocupacionais, possam agir no desenvolvimento e aumento na incidência desta patologia (Müller *et al.*, 2005; Roman & Smith, 2011; Kristinsson *et al.*, 2009).

É importante citar que, enquanto a incidência e a mortalidade têm diminuído na maioria dos cânceres, a incidência mundial de linfomas tem aumentado, sendo mais comum entre indivíduos com idade mais avançada, caucasianos e do sexo masculino (Müller et al., 2005; Said, 2009).

1.5.1. Epidemiologia do linfoma não- Hodgkin no Brasil

Dados epidemiológicos do Instituto Nacional do Câncer – INCA (2012) revelaram que no período de janeiro de 2008 a agosto de 2009, o linfoma não-Hodgkin (LNH) foi responsável por 1667 óbitos (1033 em 2008 e 664 de janeiro a agosto de 2009), sendo 963 homens e 704 mulheres. No ano de 2010 foram constatados alarmantes 3.733 mortes ocasionadas por LNH, sendo 2.045 homens e 1.688 mulheres. Já em 2012, ocorreu uma incidência de 9.640 novos casos, sendo 5.190 homens e 4.450 mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5 casos novos a cada 100 mil homens e 4 novos casos a cada 100 mil mulheres. Para o ano de 2014, estima-se que atinja uma incidência 5 novos casos a cada 100 mil homens e 5 novos casos a cada 100 mil mulheres no Brasil (INCA 2014).

1.5.2. Linfoma não-Hodgkin

Uma característica que diferencia os LH de LNH é a presença das células de Reed-Sternberg. Nos casos de LNH, a presença desta célula não é relatada (Gedik *et al.*, 2003). A origem do LNH ainda está incerta. Todavia, pesquisas relatam que falhas no sistema imune podem está diretamente ligadas a esta neoplasia, especialmente em pacientes que foram submetidos a procedimentos radioterápicos ou que possuem algum tipo de doença

autoimune, como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Levine, 1992; Silva, 2003; Urizar, Goicouría & Del 2004).

Os LNH são relatados com maior incidência em lesões do tipo extranodal, em órgãos como pulmão, pele, cavidade oral, tonsilas e base da língua (Pinto *et al.*, 2004; Wright & Radman, 1995). O diagnóstico do LNH é realizado através de biópsia incisional ou excisional, realizando, posteriormente, análise histopatológica e imunofenotípica. De acordo com as variações histológicas deste tumor, o mesmo pode ser dividido em 3 categorias: grau baixo, grau intermediário e grau alto (Regezi & Sciubba, 2000). Com o término do diagnóstico é obtido o estadiamento do tumor, com o objetivo de oferecer um prognóstico da neoplasia, tanto ao paciente quanto ao oncologista que cuidará do caso (Regezi & Sciubba, 2000).

1.5.2.a) Tipos de linfoma não- Hodgkin

Linfomas não-Hodgkin abrangem um grupo heterogêneo de câncer, dos quais 85% a 90% surgem a partir de linfócitos B e o restante deriva de linfócitos T ou natural killer. Além disso, podem ser classificados de acordo com sua agressividade: LNH indolentes ou agressivos (Shankland *et al.*, 2012).

Emily e colaboradores publicaram no ano de 2012 um estudo onde realizavam uma distinção dos tipos de LNH de acordo com a sua agressividade. Na tabela abaixo, podemos observar um breve resumo do estudo.

Tabela 2 – Tipos de Linfomas não-Hodgkin de acordo com sua agressividade.

Linfomas não-Hodgkin	
Indolentes	Agressivos
Folicular	Difuso de grandes células B
Pequeno linfocítico	Células do Manto
Zona marginal	Burkitt
MALT	Linfoma de células T
	Linfoma de células B primárias do mediastino

1.5.2.b) Epigenética e a origem dos LNH

Durante décadas, os LNH foram classificados pela sua morfologia e histologia. Entretanto, em 1994, a revista “European-american Lymphoma” introduziu a imunfenotipagem, os fatores genéticos e as características clínicas como pontos primordiais para o diagnóstico. Mais tarde, a Organização Mundial da Saúde (OMS) também passou a usar esses critérios em sua classificação dos LNH (Harris *et al.*, 1999). Assim, o primeiro consenso mundial referente à classificação se deu no ano de 2001 e, finalmente, foi atualizado em 2008 (Swerdlow *et al.*, 2008).

Através disso, um progresso substancial foi feito na compreensão da patogênese molecular de várias formas de LNH (Apter *et al.*, 2002, Hennessy *et al.*, 2004). Hoje, sabemos que várias formas de LNH estão diretamente ligadas com um agente infeccioso, tais como o linfoma de Burkitt que está

associado com o vírus Epstein-Barr e o linfoma de MALT com a bactéria *Helicobacter pylori* (Ahmad *et al.*, 2003, An *et al.*, 2001).

Além disso, translocações moleculares de genes foram identificadas como vias para o desenvolvimento de LNH, não apenas refletindo na patologia, mas também servindo como marcadores para o diagnóstico e monitoramento molecular (Apter *et al.*, 2002, Hennessy *et al.*, 2004).

Alterações genéticas e epigenéticas desempenham um papel vital na tumorigênese e no desenvolvimento do câncer. A metilação do DNA é uma importante via de modificação epigenética e essas alterações são características importantes na patogênese e no desenvolvimento de várias doenças, incluindo o câncer. As metilações que ocorrem em regiões promotoras dos genes supressores de tumores tem sido correlacionada com a proliferação descontrolada de células tumorais (Kuang *et al.*, 2010, Whitman *et al.*, 2008).

Baseado nisso, a formação de linfoma pode ser causada por alterações na sequência do DNA devido à translocação cromossômica, mutação, deleção ou ganho de material genético (Siebert *et al.*, 2001). Hassler, Schiefer e Egger, em um artigo publicado no ano de 2013, listaram os tipos de LNH que já foram estudados e tiveram o seu desenvolvimento diretamente ligado a fatores epigenéticos. Abaixo, podemos conferir uma tabela com alguns tipos de LNH e os oncogenes que sofreram alterações genéticas.

Tabela 3 - Tipos de LNH e alterações genéticas encontradas em oncogenes.

Tipo de LNH	Oncogenes	Referência
Folicular	BCL2	Siebert R <i>et al.</i> , 2001 Horsman DE <i>et al.</i> , 2003
	BCL6	
Zona marginal	BCL3	Martin-Subero JI <i>et al.</i> , 2007
Difuso de grande células B	BCL6	Siebert R <i>et al.</i> , 2001; Ngo NV <i>et al.</i> , 2011
	BCL2	
	MYC	
	MYD88 ₊	
Células do Manto	CCND1	Siebert R <i>et al.</i> , 2001 Gesck S <i>et al.</i> , 2006
	CCND2	
Burkitt	MYC	Project TIN HSLPF, 1993 Schmitz R <i>et al.</i> , 2012
	TCF3	
	ID3	
Linfoma de células B primárias do mediastino	REL, PDL1, PDL2	Wessendorf S <i>et al.</i> , 2007
	BCL11A	

1.6. Xenoenxerto em camundongos imunodeprimidos (in vivo)

O modelo de CTT não é referido apenas como ponto inicial das neoplasias, mas também o meio pelo qual os tumores são propagados (Dick, 2008; Shackleton *et al.*, 2009).

Baseado no modelo de CTT, neoplasias são compostas por células distintas: aquelas que possuem potencial para a formação do tumor e células que perderam o potencial de formação de novos tumores, mas mantém alguma atividade proliferativa (Lobo *et al.*, 2007; Dick, 2008; Zhou, 2009).

Na verdade, o modelo de CTT é assim chamado por causa das semelhanças de autorrenovação e genéticas com as CT. No entanto, é importante limitar ligações entre as CT e CTT para compreender melhor como ocorre a propagação das neoplasias neste novo conceito de origem do câncer (Mark Shackleton, 2010).

O poder de iniciação, propagação e manutenção das CTT pode ser comprovado através da realização da técnica de xenoenxerto em camundongos imunodeprimidos. Tal técnica consiste em injetar uma alíquota de células de forma subcutânea e a formação dos tumores de CTT pode ser observada em até 30 dias (Li *et al.*, 2007; Eramo *et al.*, 2008).

Deste modo, o conceito de CTT aponta a necessidade de desenvolver novas estratégias de tratamento, através das quais essas células possam ser eliminadas.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo comprovar a presença de células-tronco tumorais isoladas em pacientes com linfoma não-Hodgkin (LNH), bem como a capacidade dessas células formarem tumor após serem inoculadas em animais imunodeprimidos.

Mais detalhadamente, os objetivos podem ser descritos como:

- 1) Isolar as células mesenquimais aderentes de linfonodo, bem como de medula óssea de paciente com LNH;
- 2) Verificar se as células isoladas apresentaram características de células-tronco;
- 3) Analisar se dentro da população de células-tronco isoladas existe células com características de células-tronco tumorais através do marcador CD133⁺;
- 4) Verificar o potencial das células-tronco tumorais isoladas na sua capacidade de formar tumor em animais imunodeficientes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para melhor explanar este tópico, foi necessário dividi-lo em duas partes:

Parte I – Nessa parte do estudo foram analisadas células isoladas de pacientes que possuíam o quadro clínico de linfonodomegalia, no entanto, sem o diagnóstico definitivo para LNH. Para isso, foram utilizadas amostras de biopsias de linfonodo desses pacientes para isolar as células do nosso interesse.

Parte II – Pacientes que já possuíam o diagnóstico de LNH foram escolhidos para esta fase do estudo, para isso, foram utilizadas amostras de medula óssea dos mesmos para isolar as células pertinentes ao estudo.

O trabalho foi desenvolvido de forma experimental no laboratório de Genética e Hematologia Molecular – LIM 31, com aprovação prévia do Comitê de Ética do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP – NP 174/2011) e da Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPEsq – NP 0797/11).

Previamente às coletas, todos os pacientes envolvidos autorizaram o uso das amostras, através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em conformidade com as normas da Comissão de Ética para Análises de Projetos e Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.1 Parte I - Linfonodo

Foram coletadas e processadas 13 amostras de pacientes que apresentavam o quadro clínico de linfonodomegalia. Estas amostras foram colhidas após a realização da biópsia excisional no ambulatório de Pequenas Cirurgias do HC-FMUSP, ficando para esta pesquisa apenas o excedente do material que não seria aproveitado pelo exame patológico.

Foram excluídas as amostras que, após o resultado do exame de patologia, apresentaram resultado negativo para LNH e/ou sorologia positiva e amostras que não cresceram em ambiente de cultivo. Por fim, sendo avaliadas 5 amostras de LNH.

As amostras de linfonodo foram obtidas através de uma incisão nas seguintes regiões: pescoço, virilha ou axila, retirando-se o linfonodo por inteiro (biópsia excisional); após este procedimento, o material coletado foi acondicionado em um frasco contendo 20 ml de solução de PBS (Solução Salina de Fosfato), com a finalidade de realizar o seu transporte até o laboratório onde o mesmo seria processado.

3.1.1. Dissociação mecânica – técnica de explante

O tamanho médio do excedente de cada amostra variou entre 1 cm² a 2 cm². O material coletado foi primeiramente lavado 3 vezes com solução de PBS contendo estreptomicina na concentração de 5% com o objetivo de evitar qualquer tipo de contaminação que possa ter ocorrido entre a sala de cirurgia e o laboratório.

Em seguida, com o auxílio de bisturi e pinças, o linfonodo foi dissecado para retirar restos de vasos sanguíneos ou qualquer outro tipo de tecido que

não fosse de interesse para esta pesquisa, ficando apenas o gânglio linfático. Posteriormente, foi realizada uma dissociação mecânica, que consiste em fragmentar o linfonodo em pequenos pedaços, técnica também conhecida como explante.

3.1.2. Cultura primária

Nesse primeiro passo, foram utilizados 2 meios de cultura celular distintos, a intenção foi determinar em qual meio as células apresentavam melhor desenvolvimento. Para isso, foram selecionados os seguintes meios: meio essencial mínimo alpha - α -MEM (Sigma-Aldrich®, EUA), dulbecco's modificado por mistura de nutriente eagle - F12 Ham (Sigma Aldrich®, EUA). Todos os meios foram suplementados com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), penicilina 100U/mL e estreptomicina 100 μ g/mL (Sigma-Aldrich®, EUA).

Os linfonodos foram seccionados em pequenos fragmentos e estes foram distribuídos em placas de cultura de 6 poços (Corning Incorporated, NY, USA), mantendo-se certa distância entre os mesmos, sobre a superfície das placas previamente acrescidas com 0,5mL do meio de cultura escolhido. Em seguida, as placas foram acondicionadas em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Forma, EUA), durante o período de 1 hora, esse procedimento foi realizado com a finalidade de facilitar a adesão do material ao plástico. Após o término do tempo, foram acrescentados 2 ml de meio em cada poço e as placas foram novamente colocadas na incubadora de CO₂, sendo realizada a primeira troca de meio após o 7º dia de cultivo e as demais a cada 72 horas.

Na primeira troca de meio, selecionou-se somente as células aderentes à superfície de cultivo. Os explantes foram retirados das placas, em média, na terceira semana de cultivo, e quando as células aderidas atingiram a confluência, por volta da quarta semana, foi realizada a primeira dissociação das mesmas.

O meio de cultura foi retirado, para realizar a lavagem das células com PBS e incubá-las com ATV (solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil) a 37°C por, aproximadamente, 5 minutos. Após o descolamento das células, as mesmas foram lavadas com meio de cultura suplementado com SFB e centrifugadas a 450 x g por 5 minutos. O sedimento de células encontrado no fundo do tubo foi ressuspenso em meio suplementado com SFB e as células contadas. As contagens ocorreram em câmara de Neubauer; (Optik Labor, Alemanha), com o corante de exclusão Azul de Tripán (Sigma-Aldrich®, EUA). Em seguida, as células foram plaqueadas em uma densidade de inóculo de 5.000 céls/cm². A partir de então, o meio passou a ser trocado a cada 72 horas até as culturas atingirem 85% de confluência, quando foram novamente dissociadas e semeadas em novas garrafas com a finalidade de expandir a maior quantidade de células possíveis, visando à utilização em experimentos de citometria de fluxo, biologia molecular e xenoenxerto. As células foram utilizadas entre a 2ª e a 4ª passagem.

3.2. Parte II - Medula óssea (MO)

Foram coletadas e processadas 24 amostras de medula óssea (MO) humana de pacientes que já possuíam o diagnóstico de LNH e iriam passar pelo procedimento de punção medular para a realização do exame de

mielograma. Tais amostras foram colhidas através da aspiração de MO, no ambulatório do departamento de Hematologia do ICESP.

O material foi colhido através de uma punção óssea realizada com agulha de biópsia, seguida de aspiração, sendo realizada sob anestesia local. O osso escolhido para fazer a punção foi a crista ilíaca. A medula foi acondicionada em um tubo com EDTA (do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid ou ácido etilenodiamino tetra-acético) para evitar a formação de coágulo e consequente perda do material, em seguida, o mesmo foi transportado até o laboratório para a realização do processamento.

Figura 5 - Ilustração da técnica de aspiração de medula óssea (Adaptado de Health Central, 2013).

As amostras que continuaram no presente estudo foram aquelas que apresentaram sorologia negativa para HIV e/ou hepatites e as amostras que tiveram um bom desenvolvimento no cultivo celular. Portanto, foram estudadas 19 amostras.

3.2.1. Processamento da medula óssea

Em média, o volume dos aspirados esteve entre 3 e 5 ml. Cada amostra foi diluída em tampão PBS (Solução Salina de Fosfato) na concentração 1:2 (v:v) e, em seguida, adicionada cuidadosamente pela parede de um tubo cônico contendo Ficoll Paque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences, EUA), de maneira que as duas fases se mantiveram separadas.

A quantidade de Ficoll utilizada variava de acordo com o volume final resultante da diluição da amostra em PBS (Solução Salina de Fosfato), sempre aferindo que ambos os produtos ficassem com os volumes iguais.

A solução foi centrifugada a 450 x g por 30 minutos à temperatura ambiente com parada lenta (centrífuga sem freio), e o produto obtido foi uma solução com 4 camadas distintas, de acordo com a densidade de cada componente da amostra (Figura - 6).

Figura 6 - Ilustração do processamento de amostra líquida de medula óssea após centrifugação com reagente Ficoll-Paque™. Na visualização do produto é possível observar as frações da solução separadas por gradiente de densidade como plasma, células mononucleadas, o reagente Ficoll-Paque™ e os eritrócitos.

A camada contendo o concentrado das células mononucleadas foi retirada e transferida para um novo tubo, onde foram adicionados 10 ml de tampão PBS, seguido de centrifugação a 450 x g por 10 minutos, a fim de eliminar qualquer vestígio de Ficoll Paque™ PLUS (GE Healthcare Life

Sciences, EUA), e a toxicidade que esse reagente pode causar nas células. Esta etapa foi repetida 3 ou mais vezes, se necessário.

3.2.2. Cultura primária

Após a realização do processamento das amostras de MO, o sedimento celular foi ressuspenso em 13 ml de meio de cultura dulbecco's modificado por mistura de nutriente eagle - F12 Ham (Sigma Aldrich®, EUA), suplementados com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL (Sigma-Aldrich®, EUA) (Figura 7 Fluxograma).

Em seguida, as células foram plaqueadas para o cultivo em garrafas de cultura de 75 cm² (Santa Cruz, CA) e acondicionadas em incubadora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Forma, EUA). Nas primeiras 3 semanas, período levado para adesão das primeiras células, foi adicionado apenas 3 ml de meio de cultura a cada 72 horas e após a formação das primeiras colônias de células aderidas foi realizado a primeira troca de meio, na qual selecionou-se apenas as células aderidas ao plástico. A partir de então, as trocas de meio passaram a ocorrer a cada 48 horas e as células foram observadas até atingirem a confluência da garrafa para que fosse realizada a primeira passagem por volta da quarta semana.

Para realizar a primeira soltura das células, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com 10 ml de PBS e incubadas com 3 ml de ATV (solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil) pelo período de 5 minutos, a 37°C em incubadora de CO₂ (Thermo Forma, EUA).

Com o término do destacamento das células, elas foram lavadas com meio de cultura suplementado com SFB e centrifugadas a 450 x g por 5

minutos, com a finalidade de inibir a ação do ATV (solução de tripsina 0,2% + Versene 0,02%, Instituto Adolfo Lutz, SP, Brasil).

Com a aquisição do sedimento celular, as células foram novamente resuspensas em meio de cultura dulbecco's modificado por mistura de nutriente eagle - F12 Ham (Sigma Aldrich®, EUA) e contadas, para isso, foi utilizada uma câmera de Neubauer; (Optik Labor, Alemanha), juntamente, corante de exclusão Azul de Tripán (Sigma-Aldrich®, EUA). A finalidade era aferir a viabilidade celular, separar e plaquear as mesmas em uma densidade de inóculo de 5.000 céls/cm². Por fim, o meio de cultura foi trocado a cada 72 horas até o momento em que as células atingiram a confluência de 85%. Sendo dissociadas novamente e adicionadas em novas garrafas de cultura, com a finalidade de expandir o maior número possível de células para serem usadas nos experimentos deste estudo entre a 2ª e 4ª passagem.

Linfonodo

Medula Óssea

Figura 7 - Fluxograma de cultura primária das amostras de linfonodo e MO.

3.2.3. Curva de crescimento

As células isoladas de MO e das biopsias de pacientes com LNH foram avaliadas com o intuito de aferir a melhor densidade de inóculo para análise de adesão ao plástico, tempo de dobramento e proliferação celular através de uma curva de crescimento realizada por 10 dias, utilizando 3 amostras diferentes.

Em vista disso, as células foram plaqueadas em triplicadas na densidade de 5×10^4 células por poço em placas de 12 poços (Corning Incorporated, NY, USA) com o meio de cultura escolhido para cada linhagem em estudo. Para as células isoladas das biopsias foram utilizados os meios Dmem-F12 e α -MEM, já para as células de MO foi usado apenas o meio Dmem-F12. Ambos os meios estavam suplementando com 20% de SFB, penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 μ g/ml.

Durante cada dia, as células foram lavadas com PBS, soltas dos poços e contadas em câmeras de Neubauer com o auxílio de microscópio óptico. Ao final do experimento, o número de células encontrado em cada poço foi exportado para um gráfico linear (dias x número de células). O cálculo do tempo de dobramento (TD) foi realizado através da fórmula: $t / 3,3 \times \log (Y/Y_0)$ onde: T: tempo (horas), Y: número de células final e Y_0 : número de células inicial.

3.3. Caracterização das células-tronco tumorais

Para comprovar a presença de células-tronco tumorais nas células isoladas, tanto do linfonodo quanto da medula óssea, foram realizadas 2 técnicas laboratoriais: citometria de fluxo e PCR.

3.3.1. Citometria de fluxo para caracterizar a população celular

A caracterização celular foi realizada pela técnica de citometria de fluxo para determinar a presença de antígenos de superfície de membrana plasmática.

A identificação dos antígenos foi realizada através da utilização de diferentes anticorpos monoclonais conjugados (Tabela 4) com 2 tipos de fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês fluorescein isothiocyanate) e ficoeritina (PE, do inglês phycoeritin). Controles das marcações inespecíficas foram utilizados para realizar a calibração do equipamento, bem como a análise dos resultados e definição da positividade das amostras. A aquisição foi feita em citômetro de fluxo (BD FACS Calibur, EUA) e os dados analisados pelo programa BD CellQuest Pro® (BD, EUA).

Seguindo o protocolo já estabelecido previamente pelo laboratório (LIM-31), as células foram obtidas através da tripsinização celular e quantificadas como descrito anteriormente. 5×10^5 de células em 500 μ L de meio de cultura completo foram transferidas para tubos específicos utilizados no citômetro (Becton Dickinson, EUA). As células foram ressuspensas em 1 ml de PBS gelado e centrifugadas por 5 minutos a 450 x g.

Após serem lavadas, as células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS e os anticorpos conjugados com os fluorocromos foram incubados por um período de 15 minutos em campo escuro em temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 2 ml de PBS e realizada uma nova centrifugação de 5 minutos a 450 x g. O precipitado celular foi homogeneizado e ressuspenso em 500 μ L de solução de formaldeído a 1% (Sigma-Aldrich, EUA). Por fim, as

amostras foram estocadas em geladeira ao abrigo da luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo, sendo este tempo para análise de, no máximo, 24 horas.

A relação de todos os anticorpos utilizados no presente estudo encontra-se na Tabela 4.

As células foram adquiridas e a intensidade da fluorescência foi captada pelo citômetro de fluxo no aparelho FacScaliburTM (Becton Dickinson, EUA) e os dados foram analisados no CELLQuestTM (Becton Dickinson, EUA). Para cada amostra foi realizada uma aquisição de 30,000 eventos. Os resultados foram fornecidos e analisados na forma de histograma e em percentual da população celular com reação positiva para cada anticorpo.

Tabela 4 - Anticorpos monoclonais utilizados na caracterização das células-tronco por citometria de fluxo.

Anticorpo	Especificidade	Fluorocromo conjugado	Diluição
CD14	Macrófagos e células dendríticas	PE	1:100
CD29	Células-tronco mesenquimais	PE	1:100
CD31	Células endoteliais	FITC	1:100
CD34	Célula-tronco hematopoiética	FITC	1:100
CD38	Leucócitos	PE	1:100
CD44	Células-tronco mesenquimais	PE	1:100
CD45	Pan-leucocitários	FITC	1:100
CD86	Células-T	FITC	1:100
CD90	Células-tronco mesenquimais	FITC	1:100
CD105	Células-tronco mesenquimais	PE	1:100
CD117	Células-tronco hematopoiéticas	PE	1:100
CD133	Células-tronco Hematopoiéticas, células-tronco tumorais e células progenitoras	PE	1:100

3.3.2. RT-PCR para verificar expressão de genes de indiferenciação

3.3.2.a) Extração de RNA pelo método trizol

As amostras tiveram o seu RNA extraído pelo método de Trizol® (Invitrogen™, EUA). O meio de cultura foi retirado, sendo adicionado 1 ml de Trizol para cada 1×10^6 células. Após a homogeneização da mistura, a mesma foi transferida para um tubo de 1,7 ml tratados contra RNase. Posteriormente, foi adicionado a cada amostra 200 µl de clorofórmio (Merck Chemicals, Brazil) com subsequente agitação por 15 segundos no vórtex. Na continuação, a mistura foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada a 450 x g por 15 minutos a 4° C. Terminada a centrifugação, a fase aquosa da mistura, cerca de 600 µl, foi transferida para um novo tubo estéril livre de RNases.

Na fase seguinte da extração, foi efetuada a precipitação do RNA, utilizando-se para cada tubo 500 µl de álcool isopropílico (Merck Chemicals, Brazil). Logo após, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, após o término desse período, centrifugadas por 12.000 x g por 10 minutos a 4°C. Com o descarte do sobrenadante, acrescentou-se ao RNA precipitado 1 ml de etanol 75%. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas por 7.500 x g por 5 minutos a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado novamente e 50 µl de água DEPC foram utilizados para ressuspender o RNA total extraído. Para observar a integridade das amostras, elas foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo (0,1 µg/ml) e visualizado no transiluminador de luz ultravioleta. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro (Nanodrop®,

Corbett, EUA), e o armazenamento em freezer -80°C até a realização de novos experimentos.

3.3.2.b) Tratamento com DNase

Todos os RNAs utilizados no estudo foram tratados com os reagentes kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, Madison, WI, USA), seu objetivo era a remoção de qualquer resíduo de DNA genômico presente. Logo em seguida, os DNAs completos – cDNA foram confeccionados.

3.3.2.c) Síntese do DNA complementar - cDNA

As amostras de RNA foram diluídas em água tratada com DEPC, com o cuidado de obter como volume final a quantia de 8 µL contendo, no máximo, 1 µg de RNA.

Este material foi incubado, com a enzima RQ1 RNase-Free DNase 1U/µL e com Reaction Buffer 1X, a 37°C, durante 30 minutos, para a digestão do DNA genômico. Após o término do tempo de incubação, foi adicionado o tampão de parada da reação, (Promega, Madison, WI, USA), para que ocorresse a inativação da enzima, seguido de incubação a 85°C por 10 minutos.

Com o RNA tratado, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA com o kit de alta capacidade de transcrição reversa do cDNA (Applied Biosystems), possuindo como condições ideais para as reações a temperatura de 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos. Para as incubações utilizou-se termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA).

3.3.2.d) Reação em cadeia de polimerase - PCR

A reação de RT-PCR foi realizada inicialmente com uma etapa de 50°C por 30 minutos, com a finalidade de ocorrer a transcrição reversa do RNA, em seguida por 95°C pelo tempo de 5 minutos, ocorrendo a desnaturação. A amplificação do DNA foi feita através de 35 ciclos repetitivos constituídos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento de 55°C a 65°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto e finalizando com mais uma etapa de extensão a 72°C por 8 minutos. Os resultados do RT-PCR foram analisados em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídeo (0,1µg/mL) visualizado em transiluminador de luz ultravioleta.

3.3.2.e) Expressão dos genes de indiferenciação por RT-PCR

Para comprovar a presença de CT nas populações isoladas, foi determinada a expressão dos genes de indiferenciação Oct-4, Nanog e o gene endógeno Gusb, por meio da técnica de RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction). A relação dos genes utilizados está indicada na tabela 5.

Tabela 5 - Relação das sequencias utilizadas para a expressão de indiferenciação celular.

Gene	Sequencia
Oct-4	5' - aag cga tca agc agc gac tat -3' 5' - gga aag gga ccg agg agt aca - 3'
Nanog	5' - caa agg caa aca acc cac tt - 3' 5' - tct gct gga ggc tga ggt at - 3'
Gusb	5' - gaa aat acg tgg ttg gag agc tca tt - 3' 5' - ccg agt gaa gat ccc ctt ttt aa - 3'

3.4. Estudo “*in vivo*”

Os procedimentos experimentais deste projeto foram realizados em concordância com as normas de cuidados e uso de animais de laboratório, com aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa e Experimentação Animal (CAPpesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), Brasil (0797/11). Utilizamos camundongos nude atímicos, que são incapazes de produzir células T, devido a sua imunodeficiência nos experimentos de xenoenxerto e imunofluorescência. Foram utilizados camundongos fêmeas para o experimento com células isoladas de linfonodo e camundongos machos para os ensaios com células isoladas da MO.

3.4.1. Xenoenxerto com células isoladas de linfonodo

Para inoculação das células nos animais, as mesmas foram dissociadas das garrafas de culturas e, em seguida, centrifugadas a 450 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado, ficando apenas o sedimento celular, sendo este ressuspenso em 5 ml de PBS e novamente centrifugado a 450 x g por 5 minutos, novamente o sobrenadante foi descartado, ficando apenas o sedimento celular de interesse.

Alíquotas de 1×10^6 células de linfonodos foram injetadas no dorso inferior de 3 camundongos de forma subcutânea (SC) e 2 animais foram utilizados como controle, nos quais foi injetado 1 ml de PBS.

Na figura 8, podemos observar um infográfico que descreve o período que levou cada etapa desse experimento e as fases subsequentes do mesmo.

3.4.2. Xenoenxerto com células isoladas de medula óssea

Como descrito para as células de linfonodo, o processo de dissociação foi semelhante para as células de medula óssea. O sobrenadante foi descartado, ficando apenas o sedimento celular, sendo este ressuspenso em 50 μ L de meio de cultura dulbecco's modificado por mistura de nutriente eagle - F12 Ham (Sigma Aldrich®, EUA) suplementados com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), penicilina 100U/mL e estreptomicina 100 μ g/mL (Sigma-Aldrich®, EUA).

Realizamos uma curva de dose resposta ($0,25 \times 10^5$; $0,5 \times 10^5$ e 1×10^6 células) para a padronização do número de células ideais para a formação de tumores. Essas células de medula óssea foram mantidas em meio de cultura num volume de 50 μ L onde foram adicionados 50 μ L de matrigel (código

A1413202, Life Technologies, EUA), resultando em um volume final de 100 μ L que foram injetados subcutaneamente no dorso inferior dos camundongos, num total de 28 animais e 10 camundongos controles, nos quais foi injetado apenas veiculo (Figura 8).

Figura 8 - Infográfico do xenoenxerto das amostras de células de linfonodo e MO.

3.4.3. Imunofluorescência em camundongos imunodeprimidos

As células isoladas da medula óssea entre a 2ª e 4ª passagem foram tripsinizadas como anteriormente descritas nos procedimentos de cultura primária e separadas em alíquotas de 1×10^6 células. Sendo ressuspensas posteriormente em 1 ml de meio de cultura dulbecco's modificado por mistura de nutriente eagle - F12 Ham (Sigma Aldrich®, EUA) sem a presença de soro fetal bovino, após esse procedimento foi adicionado 2 μ L do CellTracker (Invitrogen, EUA) nas alíquotas.

Em seguida, as amostras foram mantidas em incubadoras a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Forma, EUA), pelo período de 15 a 45 minutos. Após o término do tempo, o material foi centrifugado a 450 x g por 5 minutos, sendo ressuspensado em 100 μ L meio de cultura dulbecco's modificado por mistura de nutriente eagle - F12 Ham (Sigma Aldrich®, EUA) com a ausência de SFB. Por fim, os 100 μ L de meio de cultura, juntamente com células, foram inoculados por via caudal nos camundongos e os mesmos foram mantidos em observação pelo período de 48 horas.

A observação da migração das células pelo corpo dos animais foi realizada utilizando o sistema de imagem IVSIS Spectrum (Caliper Life Science – EUA). Para a realização da leitura foi necessário, primeiramente, anestésiar os camundongos através da inalação de Isoflurano. Após os animais devidamente anestesiados, eles foram colocados na posição decúbito dorsais dentro do sistema, onde permaneceram recebendo anestésico inalatório. Foram realizadas três leituras: a primeira, no momento do inóculo, a segunda, após 24 horas e a terceira com 48 horas. Para isso, foi utilizado um tempo de

exposição de 1 a 4 segundos utilizando a excitação do feixe de luz de 570 nm e a emissão 620 nm.

3.4.4. Pesagem dos animais e dos órgãos

Para a realização deste procedimento os animais foram anestesiados com isoflurano e, em seguida, pesados. Após a análise do peso total dos animais, os órgãos: coração, pulmão, baço, fígado, rim, testículo e pele foram retirados e pesados isoladamente. Todo o procedimento foi realizado em balança de precisão (Sartorius H110).

3.4.5. Hemograma dos camundongos que receberam células da MO

Os animais foram submetidos à coleta de sangue por acesso retro-ocular, realizando hemograma através do sistema automatizado (Coulter T-890).

3.5. Análises estatísticas

Os dados contínuos foram expressos como média $\pm$ DP ou mediana (percentis 25-75), de acordo com distribuições normal ou não normal, respectivamente. Ao comparar dois grupos, os dados contínuos foram analisados usando o teste t de Student ou o teste de Mann-Whitney, conforme apropriado.

As análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 5 (GraphPad, Inc).

4. RESULTADOS

4.1. Parte I - Linfonodo

4.1.1. Triagens das amostras

Em todas as amostras coletadas foi realizado o imuno-histoquímica para a confirmação de LNH. Os laudos foram liberados no prazo de 30 dias. Dessa maneira, apenas as amostras que possuíram resultados positivos para LNH e sorologia negativa (HIV e hepatites) continuaram neste projeto.

No total, foram coletadas e processadas 13 amostras de pacientes com suspeita de LNH, entretanto, apenas 5 foram diagnosticados como LNH e, conseqüentemente, foram mantidas em culturas, enquanto as demais amostras foram eliminadas deste estudo.

Tabela 6 - Quadro indicando os pacientes que foram inclusos ou excluídos neste projeto.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	IDADE	
01	Linfoma de células do Manto	86	Incluso
02	Linfoma epidermotrópico	73	Incluso
03	Linfoma difuso de grandes células B	45	Incluso
04	Linfoma difuso de grandes células B	61	Incluso
05	Sarcoma Mielóide	59	Excluído
06	Linfadenite dermatopática	28	Excluído
07	Linfadenite dermatopática	64	Excluído
08	Linfoma Linfocítico	26	Excluído
09	Adenocarcinoma metastático	79	Excluído
10	Linfoma de Hodgkin	49	Excluído
11	Linfadenite dermatopática	68	Excluído

12	Linfoma folicular (LNH)	62	Incluso
13	Linfadenite dermatopática	54	Excluído

4.1.2. Isolamento das células a partir de cultura primária (explante)

Após a coleta das biopsias de linfonodos, as amostras foram lavadas com PBS e estreptomicina (Figura 9).

Figura 9 - Imagem ilustrativa da lavagem da biópsia de linfonodo.

Com o término da lavagem, foi realizada a dissecação do fragmento para a remoção dos tecidos não interessados. Em seguida, os fragmentos foram colocados numa placa de 6 poços com 0,5 ml de meio de cultura e incubados por 1 hora a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (Thermo Forma, EUA).

Com o término do período de incubação, os fragmentos de linfonodos encontravam-se levemente ressecados (Figura 10A), porém, bem fixados ao plástico. Posteriormente, foram adicionados 2 ml de meio com 20% de SFB para cobrir os fragmentos (Figura 10B).

Figura 10 - Imagem ilustrativa dos fragmentos em placas de 6 poços. **(A)** Aderência dos fragmentos ao plástico após 1 hora de incubação; **(B)** As amostras foram suplementadas e incubadas com o meio de cultura com 20% de SFB.

4.1.3. Evidências dos 2 diferentes tipos de meio de cultura

4.1.3.a) Aderência celular a partir das células em suspensão

As amostras de explante foram cultivadas nos meios Meio Essencial Mínimo Alpha - α -MEM (Sigma-Aldrich®, EUA) e Dulbecco's Modificado por mistura de nutriente Eagle - F12 Ham (Sigma-Aldrich®, EUA). Passado o período de 7 dias, foi observada uma grande quantidade de células em suspensão e uma pequena população celular aderidas ao plástico em ambos os meios (Figura 11).

Figura 11 - Após a realização dos explantes foi possível observar no 7^a dia de cultura primária as primeiras células aderidas **(A)** meio α -MEM **(B)** meio DMEM F12 (aumento de 40x).

4.1.3.b) Crescimento celular a partir dos explantes

Ao longo das 3 primeiras semanas de cultivo, foram realizadas trocas de meio de cultura a cada 72 horas sem a retirada do explante, com o intuito de retirar células e restos celulares que encontravam-se em suspensão, permanecendo, assim, apenas as células aderidas ao redor dos explantes. (Figura 12).

Figura 12 - Crescimento celular ao redor dos explantes. **(A)** meio α -MEM **(B)** meio DMEM F12 (aumento de 40x).

Após ser observada uma grande quantidade de células aderidas ao redor dos explantes, foi realizado o desprendimento celular e o replaqueamento das mesmas em garrafas de cultura de 75 cm² (Santa Cuz, CA).

A partir de então, as células apresentaram características morfológicas grandes, alongadas e fibroblastóides (Figura 13). Entretanto, após a 4^o passagem, ocorreu uma diminuição na viabilidade celular, bem como uma diminuição da taxa de proliferação e um aumento de restos celulares em suspensão.

Figura 13 - Confluência celular entre 70-90% na 3^o passagem. **(A)** meio α -MEM **(B)** meio DMEM F12 (aumento de 40X).

Baseado nessas observações, foi estabelecido que as células seriam cultivadas até a 4ª passagem para selecionar populações com morfologia homogênea e obtenção de número de células suficiente para a realização dos experimentos seguintes.

4.1.4. Curva de crescimento das células isoladas de biópsias de linfonodo

Para determinar o tempo de dobramento da população celular isolada, foi utilizada a técnica de curva de crescimento. Independente do meio de cultivo utilizado (α -MEM e DMEM-F12), as células apresentaram um tempo de 35,2 horas.

Figura 14 - Representação gráfica do tempo de dobramento das células isoladas de linfonodo pelo período de 10 dias.

4.1.5. Caracterização da população isolada por citometria de fluxo nas células isoladas de linfonodo

Todas as populações de células isoladas testadas, tanto no meio α -MEM quanto DMEM-F12, demonstraram-se negativas para os marcadores CD14, CD34, CD38, CD45, CD86 e CD117 e positivas para CD44, CD90 e 105. Com relação ao marcador de células tumorais, o CD133 apresentou população negativa (Figura 15).

Figura 15 - Marcadores de superfície para determinar a população celular isolada.

4.1.6. Biologia molecular - expressão dos genes de indiferenciação

Nas 5 amostras de células isoladas de pacientes com resultados positivos para LNH cultivadas em Essencial Mínimo Alpha - α -MEM e DMEMF12, não foi possível observar a expressão dos genes de indiferenciação. A linhagem celular Ntera foi utilizada como controle positivo para a amplificação do gene Nanog e Oct-4 (Figura 16).

Figura 16 - Gel ilustrativo da expressão gênica das células extraídas de linfonodos. A) gene endógeno *Gusb*; B) gene de indiferenciação *Nanog* e C) gene de indiferenciação *Oct-4*.

4.1.7. Xenoenxerto em camundongos imunodeprimidos

Três camundongos imunodeprimidos receberam 1×10^6 de células diluídas em 0,1mL de PBS. As injeções foram realizadas de forma subcutânea na região dorsal. Dois animais foram utilizados como controle experimental, ou seja, receberam somente o veículo utilizado para inocular as células (PBS). Todos os animais foram acompanhados por 30 dias.

Conforme ilustrado nas imagens na figura 17, nenhum tumor foi constatado nestes animais durante todo o protocolo experimental.

Figura 17 - Momento da inoculação das células (A) e observação dos animais após 30 dias do início do experimento (B).

4.2. Parte II – Medula óssea

4.2.1. Triagens das amostras

As amostras de medula óssea foram selecionadas de acordo com o laudo dos exames de sorologia (HIV e hepatites), sendo estudadas apenas as amostras que possuíam resultado negativo.

Dessa maneira, foram selecionadas, inicialmente, 24 amostras, sendo, nesse momento, excluídas as que não apresentaram células aderidas ao plástico da garrafa de cultura após 15 dias de cultivo primário. Por fim, foram estudadas 19 amostras.

Tabela 7 – Quadro com os pacientes que foram incluídos e excluídos.

PACIENTE	DIAGNÓSTICO	IDADE	
01	Linfoma difuso de grandes células B	71	Incluído
02	Linfoma folicular	57	Incluído
03	Linfoma difuso de pequenas células B	63	Incluído
04	Linfoma de células T anaplasico Alk-1 negativo	58	Incluído
05	Linfoma linfocítico pequeno	74	Incluído
06	Linfoma Linfocítico	74	Excluído
07	Linfoma de grande células B	67	Excluído
08	Linfoma de grandes células B	73	Incluído
09	Linfoma de grandes células B difuso	45	Incluído
10	Linfoproliferação B crônica - LNH	64	Incluído
11	Linfoma de pequenos linfócitos B	72	Excluído
12	Linfoma folicular	19	Excluído
13	Linfoma de grandes células B	61	Excluído
14	Linfoma de grandes células B	67	Incluído
15	Linfoma linfoplasmocítico + Linfoma de grandes células B	78	Incluído
16	Linfoma de malte ocular	61	Incluído
17	Linfoma de grandes células B	42	Incluído
18	Linfoma folicular + Linfoma de grandes células B	73	Incluído
19	Linfoma folicular	57	Incluído
20	Linfoma linfocítico	65	Incluído
21	Linfoma folicular	60	Incluído
22	Linfoma difuso de grandes células B	24	Incluído
23	Linfoma folicular	45	Incluído
24	Linfoma difuso de grande células B	57	Incluído

4.2.2. Isolamento das células a partir de cultura primária de MO

4.2.2.a) Aderência celular a partir das células em suspensão

As amostras de MO coletadas foram processadas de acordo com metodologia do Ficoll Paque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences, EUA) e, após a separação das células, apenas as que estavam presentes na camada mononuclear foram colocadas em garrafas de culturas de 75 cm².

No décimo dia de cultura foi possível observar as primeiras células aderidas, desta maneira, foi realizada a primeira troca de meio e as demais a cada 72 horas.

Figura 18 - Após o processamento do Ficoll Paque™ PLUS foi possível observar no 10º dia de cultura primária as primeiras células aderidas (aumento de 40x).

4.2.2.b) Crescimento celular a partir das células isoladas da camada monoclonada

Com a formação das primeiras colônias de células aderidas, foi esperado que as mesmas atingissem uma confluência de 85% para que fosse realizada a primeira soltura das mesmas. Após isso, as células foram expandidas até a 4ª passagem para que fossem utilizadas nos demais experimentos deste trabalho.

As células que se encontravam até a 4ª passagem apresentavam características morfológicas grandes, alongadas e fibroblastoides, da 5ª passagem em diante, tais células começavam a perder o seu poder proliferativo, diminuindo a viabilidade celular e aumentando o número de restos celulares presentes no meio.

Foi padronizado que as células de MO isoladas seriam utilizadas até a 4ª passagem para evitar a perda das características morfológicas ditas como ideais para a realização dos experimentos.

Figura 19 - Imagem ilustrando mais ou menos 80% de confluência na placa de cultivo (Aumento de 40x).

4.2.3. Curva de crescimento das células isoladas de MO

Através da realização deste experimento, foi possível determinar o tempo necessário para dobrar a sua população celular das amostras de medula óssea. O tempo de dobramento observado nessas células, após 10 dias de cultivo, partindo de um inóculo inicial de 5×10^4 , foi de 34,3 horas.

Figura 20 - Representação gráfica do tempo de dobramento das células isoladas de medula óssea pelo período de 10 dias.

4.2.4. Caracterização da população isolada por citometria de fluxo nas células isoladas de medula óssea

Nas populações de células isoladas das 24 amostras de medula óssea foi observado que os marcadores hematopoiéticos CD14 (4%), CD34 (1%), CD38 (3%), CD45 (3%), CD86 (2%) e CD117(4%) encontravam-se negativos. Por outro lado, os marcadores de células-tronco mesenquimais: CD29 (83%) CD44 (93%), CD90 (54%), CD105 (86%) foram positivos. O marcador de células-tronco tumorais CD133 apresentou uma população de 5% de células

positivas para este marcador (Figura 21). Para esse experimento, os resultados foram expressos em média.

Figura 21 - Imagem ilustrativa dos histogramas de citometria de fluxo das amostras de medula óssea.

4.2.5. Isolamento de células CD133⁺ pré-cultivo e pós-cultivo

Em 6 amostras coletadas foi realizada uma citometria de fluxo a fresco e outra após o período de cultura, o intuito seria constatar o isolamento e ampliação do número de células positivas para o marcador CD133. Em 4 amostras estudadas ficou evidente o aumento do número de células CD133⁺ após o cultivo, em uma amostra encontramos diminuição do número de células positivas e na última amostra analisada foi observada uma estagnação no número de células CD133⁺ (Figura 22).

Figura 22 - Representação gráfica do aumento de células CD133⁺ após o cultivo celular.

4.2.6. Biologia molecular - expressão dos genes de indiferenciação

Nas 6 amostras utilizadas para realizar os experimentos de biologia molecular, foi possível observar a presença dos genes de indiferenciação Nanog e Oct-4. O gene endógeno Gusb foi utilizado como controle, para aferir a confiabilidade do resultado obtido.

Figura 23 - Observação da amplificação dos genes de indiferenciação e do gene endógeno. **A)** expressão gênica do Nanog; **B)** expressão gênica do Gusb e **C)** expressão gênica do Oct-4.

4.2.7. Xenoenxerto em camundongos imunodeprimidos

4.2.7.a) Avaliação macroscópica

Inicialmente, realizamos uma curva de inoculação celular para estabelecer a quantidade de células necessárias para formar tumor em camundongos imunodeprimidos. Os inóculos foram de $0,25 \times 10^5$, 5×10^5 e 1×10^6 células com matrigel subcutaneamente na região dorsal dos animais e os controles receberam 100 μ L de matrigel. Todos os animais foram acompanhados por 40 dias.

Na Tabela 8, estão relacionados os 38 animais que receberam as CT, bem como a divisão e subdivisão dos grupos, a classificação e tipo de linfoma e as observações encontradas antes do sacrifício.

Mais detalhadamente, os animais que receberam $0,25 \times 10^5$ de CTM com CTT derivadas da medula óssea de paciente LNH do tipo agressivo não apresentaram nenhuma formação de massa tumoral no local inoculado. Entretanto, na região em que as células foram inoculadas, foi possível observar uma alteração subcutânea no animal, atingindo um aspecto mais fino em relação às demais regiões do corpo. Conforme indicado pela seta, na figura 24. Os animais que recebem 5×10^5 e 1×10^6 de células, também de pacientes com LNH agressivo, apresentaram formação de tumor com 10 dias após inoculação (Figura 25). Esses animais foram acompanhados por mais 30 dias e, surpreendentemente, ao invés do tumor progredir, apresentou uma pequena diminuição no seu tamanho.

Com relação aos animais que receberam as CTM com CTT de paciente LNH indolentes, nenhuma formação de tumor ou alteração na pele do animal foi constatada, independentemente do número de células inoculadas na região dorsal.

Figura 24 - Imagem representativa da alteração subcutânea nos camundongos na região do inóculo $0,25 \times 10^5$ células isoladas da medula óssea de pacientes com LNH.

Figura 25 - Imagens representativas da formação de tumores subcutâneos em vários ângulos em camundongos imunodeprimidos, após o inóculo de 1×10^6 células isoladas da medula óssea de pacientes com LNH.

4.2.7.b) Avaliação do peso corpóreo (PC)

Após o período de 40 dias, todos os camundongos foram pesados, com o intuito de verificar o estado de caquexia, que poderia ser resultante do desenvolvimento de algum tipo de neoplasia, não observamos diferença do peso corpóreo entre os animais controles ($18,86 \pm 1,96$ g) e os que receberam o inóculo $0,25 \times 10^5$ ($18,55 \pm 1,06$ g); $0,5 \times 10^5$ ($20,47 \pm 1,60$ g) e $1,0 \times 10^6$ ($18,27 \pm 1,88$ g) (Figura 26).

Figura 26 - Comparação entre o peso corpóreo dos animais que receberam o inóculo de células isoladas da medula óssea e os controles. Teste t de Student com resultados expressos em Média±DP.

4.2.7.c) Avaliação do peso dos órgãos

Avaliamos, através do peso dos órgãos absolutos (coração, pele, testículo, pulmão, baço, fígado e rim), se ocorreu alteração do tamanho, porém não encontramos diferenças significativas no peso absoluto dos órgãos dos camundongos que receberam o inóculo em relação aos controles. Entretanto, a razão do peso hepático/PC foi significativamente maior no grupo que recebeu inóculo de $1,0 \times 10^6$ em relação ao controle [0,063 g (0,062-0,065) versus 0,058 g (0,054-0,060); $p < 0,01$] (Figura 27, Figura 28 e Figura 29).

Figura 27 - Análise do peso das peles e dos testículos dos animais que receberam o inóculo de células isoladas da medula óssea. Teste t de Student com resultados expressos em Média $\pm$ DP.

Figura 28 - Análise do peso dos diferentes órgãos dos animais que receberam o inóculo de células isoladas da medula óssea (Coração, Pulmão, Baço, Fígado e Rim). Teste Mann-Whitney com resultados expressos mediana intervalo interquartil.

Figura 29 - Análise da razão do peso do órgão/PC (coração, pulmão, baço, rim, testículo, pele e fígado). **p<0,01 controle versus inóculo 1,0x10⁶.

4.2.7.d) Migração das células isoladas da MO marcadas com material fluorescente

Através do sistema de imagem IVSIS Spectrum (Caliper Life Science – EUA), verificamos a migração das células-tronco no corpo dos camundongos imunodeprimidos, através de uma fluorescência conjugada às células (CellTracker). Neste experimento, foram realizadas 3 leituras, sendo: a primeira no momento do inóculo, a segunda após 24 horas e a terceira com 48 horas (Figura 30 A, B e C). Para isso, foram utilizados 3 camundongos: 1 controle (primeiro animal da esquerda para a direita) e 2 animais que receberam as células conjugadas com a fluorescência.

No momento do inóculo, não observamos a presença das células, contudo, após o período de 24h, uma intensa captura de fluorescência foi observada na região abdominal do camundongo. Porém, após 48h não observamos essa fluorescência (Figura 30 C).

Figura 30 - Imagem ilustrando as leituras realizadas no momento da inoculação **(A)**; 24 horas após a inoculação **(B)** e 48 horas após a inoculação **(C)**.

4.2.7.e) Hemograma dos camundongos que receberam células isoladas da MO

Os camundongos que apresentaram o desenvolvimento de tumores subcutâneos (inóculo de 5×10^5 e 1×10^6 células) tiveram o seu sangue colhido para verificação de possíveis variações no seu perfil hematológico. Porém, não foram encontradas alterações significativas quando comparamos os animais tratados com os nossos controles (Tabela 9).

Tabela 9 - Hemograma dos animais que receberam de 5×10^5 e 1×10^6 células isoladas de pacientes com LNH.

Hemograma							
Grupos	N	Leucócitos	Hemácias $10^6 / \text{mm}^3$	Hemoglobina g / dL	Hematócrito %	Plaquetas	Linfócito %
Controle	7	3,10 (0,10 - 6,30)	7,10 (0,46 - 8,68)	13,20 (0,60 - 14,00)	36,40 (23,00 - 46,00)	62,30 (35,00 - 77,10)	95,70 (90,40 - 96,60)
$0,5 \times 10^5$	3	2,20 (2,20 - 3,90)	8,33 (7,80 - 8,44)	14,00 (13,40 - 14,20)	42,70 (39,80 - 44,60)	60,10 (53,00 - 62,80)	97,20 (96,80 - 97,40)
1×10^6	8	3,30 (2,60 - 4,00)	8,00 (7,39 - 8,47)	13,50 (13,25 - 14,18)	40,80 (37,55 - 43,58)	69,80 (66,33 - 74,48)	97,00 (94,98 - 99,58)

5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo comprovar a presença de CTT em células isoladas de biópsias de linfonodo e de medula óssea de pacientes LNH. Para obtenção das amostras de linfonodo, foram selecionados pacientes que possuíam a suspeita de LNH, enquanto que, para aquisição das medulas ósseas, foram escolhidos pacientes que possuíam o diagnóstico de LNH. Desta maneira, o trabalho foi segmentando em duas partes: **Fase I)** isolamento e caracterização das células procedentes das biópsias de linfonodo; **Fase II)** isolamento e caracterização das células procedentes da medula óssea, bem como a inoculação em animais imunodeprimidos.

Na fase I deste estudo, a observação das células isoladas nas culturas primárias das biópsias de linfonodo, através da técnica de explante, foi de grande importância para o estabelecimento das condições ideais para a utilização dessas células. A princípio, foi observado um grande número de células em suspensão na primeira semana de cultivo e pouquíssimas células aderidas em ambos os meios de cultura utilizados (α -MEM e DMEM F12).

A partir de então, as células foram expandidas para alcançarem o número necessário para dar continuidade aos experimentos seguintes deste trabalho, porém, após atingirem a 4^o passagem, foi constatada uma diminuição das taxas de viabilidade e proliferação celular, com o aumento de restos celulares. Pode-se sugerir que devido à média da idade dos pacientes, que foi de 65 anos, o crescimento dessas células foi mais lento, conforme demonstrado por alguns estudos onde células mesenquimais isoladas de pacientes idosos apresentaram uma taxa proliferativa menor em relação aos pacientes jovens (Bruder *et al.*; 1997; Roobrouck *et al.*, 2008). Além disso,

diversas pesquisas sugerem que o número elevado de passagens podem ocasionar processos de diferenciação em diversos tipos celulares (Fauza *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Desta maneira, para evitar eventuais complicações ocasionadas por possíveis alterações nas células, foi estabelecido que as células entre a segunda e quarta passagens seriam as ditas como ideais para a utilização nos experimentos.

Outro aspecto estudado foi o tempo de dobramento das nossas células cultivadas em ambos os meios (α -MEM e DMEM F12), sendo constatado um tempo de duplicação de 35,2 horas, tempo este que se assemelha com os estudos realizados pelo grupo de Roubelakis. Este grupo fez um estudo comparativo com diferentes linhagens de células mesenquimais e constataram um tempo de dobramento de 30 horas em suas células (Roubelakis *et al.*, 2007).

As células aderidas ao plástico apresentaram características morfológicas fibroblastóides, expressão positiva para os marcadores de superfície de origem mesenquimal (CD44, CD90 e CD105) e ausência da expressão de marcadores de linhagens hematopoiéticas (CD14, CD34, CD45, CD86 e CD117) e de CTT (133). O CD44, além de ser utilizado como um dos marcadores para células-tronco, também já está bem caracterizado em CTT em tumores sólidos, tais como: mama (Al-Hajj *et al.*, 2003) ovário (Zhang *et al.*, 2008), próstata (Collins *et al.*, 2005), cabeça e pescoço (Prince *et al.*, 2007).

Até o presente momento, não se tem relato de nenhum trabalho na literatura que tenha conseguido isolar as células-tronco tumorais de biópsias de linfonodos. No entanto, partindo-se do princípio de que esse tipo de célula já foi isolado de diferentes tipos de tumores sólidos, tais como, em neoplasias de

cérebro (Hemmati *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2003), câncer de colón (Ricci-Vitaiin *et al.*, 2007), próstata (Collins *et al.*, 2005) pulmão (Eramo *et al.*, 2008) e fígado (Ma *et al.*, 2007), uma das perguntas desse trabalho foi saber se seria possível isolar células CD133 positivas de biópsias de linfonodo de pacientes LNH. O fato de ter trabalhado com um volume pequeno de amostra pode ser justificado pelo fato de não termos conseguido um grande número de eventos do CD133. A possibilidade de adquirir e analisar todo o material, ou seja, sem a necessidade de dividir com a patologia, proporcionaria uma maior possibilidade de encontrar o centro germinativo do tumor e não somente a camada mais superficial do tumor.

Já a expressão de genes típicos de células indiferenciadas, tais como, Oct4 e Nanog, também não foram possíveis detectá-los nas células isoladas desses pacientes do presente estudo. Entretanto, Wen K e colaboradores recentemente demonstraram a expressão do gene Oct4 em CTT isolados de câncer do colo, enquanto, Santaliz e colaboradores relataram que a uma falha do Nanog está intimamente ligada ao desenvolvimento de tumorigênese (Wen *et al.*, 2011; Santaliz *et al.*, 2013).

Após a confirmação da presença do marcador de CD44 nas nossas amostras, independentemente da presença do CD133, Oct e Nanog, foi dado continuidade aos experimentos *in vivo*, uma vez que seria necessário comprovar o poder tumorigênico nas células isoladas de biópsias de linfonodo.

Rasheed e colaboradores, em um estudo publicado no ano de 2010, relataram que em uma determinada população heterogênea de células isoladas de neoplasias de pâncreas, as CTT, estariam presentes em número pequeno, e mesmo em quantidades tão ínfimas seriam capazes de desenvolver tumores

em camundongos imunodeprimidos. Mas quando as células isoladas das biopsias de linfonodo foram inoculadas no dorso dos nossos camundongos, não foi possível observar resultados semelhantes.

Desta maneira, as características morfológicas fusiformes, aderência ao plástico, imunofenotipagem compatível com células de origem mesenquimal e a falta de expressão dos genes de indiferenciação, bem com a ausência de capacidade de formar tumores em animais imunodeprimidos, nos permitem sugerir que as células isoladas da biópsia de linfonodo se tratavam de fibroblastos.

A existência de CTT foi proposta pela primeira vez há mais de 40 anos (Bruce, W.R. & Van Der Gaag, 1963), proporcionando uma explicação para a heterogeneidade encontrada dentro de tumores sólidos. No entanto, para provar tal teoria, teve que ser aguardado o desenvolvimento de ferramentas de investigação modernas para investigar o comportamento das populações de células. A melhor evidência que apoia a existência de CTT chegou a partir do estudo de doenças malignas hematológicas realizado por Jean C.Y. Wang e John E. Dick em 2005.

Em 1997, Bonnet e Dijk foram os primeiros a isolar CTT em amostras de leucemia mielóide aguda. Em seu trabalho, eles especularam que a leucemia mielóide foi originada pela mutação de uma célula-tronco normal.

Partindo, então, dos estudos pioneiros realizados por Bonnet e Dijk, o presente estudo também decidiu utilizar amostras de medula óssea de pacientes que já possuíam o diagnóstico positivo de LNH, para comprovar se seria possível encontrar subpopulações de células que se encaixassem nos critérios estabelecidos de uma CTT no meio das CTM.

Com a realização do processamento e separação das células de interesse, através da técnica de gradiente de densidade, as células da camada mononucleada foram colocadas em cultura e, após 10 dias, foram observadas as primeiras células fibroblastóides aderidas ao plástico. Do mesmo modo como realizamos com as células de linfonodo, as células de medula óssea foram expandidas ao máximo para a realização dos experimentos seguintes.

A idade média dos nossos pacientes que cederam amostras de medula óssea foi também de 65 anos, e esse foi um fator determinante no número de células obtidas para a realização dos experimentos. Conforme já relatado anteriormente, células de pacientes idosos apresentam menores taxas proliferativas, menor passagem celular e, morfológicamente, as células são mais achatadas e largas (Baksh *et al.*, 2004, Stolzing *et al.*, 2008). Por estas características citadas acima, foi padronizado que as células de medula óssea seriam usadas entre a segunda e quarta passagem nos experimentos deste trabalho.

O tempo de dobramento das células isoladas da medula óssea foi de 34,3 horas, tempo este que se assemelha com os resultados obtidos nos estudos de Roubelakis e colaboradores, realizados em 2007.

As células fibroblastóides apresentaram aderência ao plástico e, quando submetidas ao teste de citometria de fluxo, apresentaram população de células negativa para os marcadores hematopoiéticos (CD14, CD34, CD38, CD45, CD86 e CD117). No entanto, ao analisar os marcadores que caracterizam CTM (CD29, CD44, CD90 e CD105), foi constatada uma alta positividade na expressão desses marcadores de superfície. Além disso, de acordo com a explicação referida acima, a verificação do marcador de CD133 foi importante

para determinar a quantidade de CTT entre as CTM da medula óssea. Sendo assim, uma pequena subpopulação expressando CD133 foi observada nessas células analisadas.

Com o intuito de verificar a quantidade de células isoladas após cultivo da subpopulação de CTT, foi realizada a análise por citometria de fluxo no material a fresco, ou seja, pré-cultivo celular e outra análise após o período de cultivo da mesma amostra. Com isso, foi observado, após o período de cultivo, um número superior de células em relação ao pré-cultivo, indicando a possibilidade de isolar e proliferar a CTT.

A determinação da presença dos genes Oct-4 e Nanog em populações de células indiferenciadas é uma das características relacionada diretamente às CT. Diversos grupos relataram a presença desses mesmos genes em populações de CTT (Phuc *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Wen K *et al.*, 2013). De acordo com esses estudos, nossos achados foram similares ao utilizar as células isoladas da medula óssea. Além de expressar positividade para os marcadores de CTM, comprovando que estamos diante de uma população de células indiferenciadas.

Baseando-se nos estudos publicados pelo grupo de Wen em 2013, onde isolaram as CTT que apresentavam a expressão positiva para os marcadores CD44 e CD133 e realizaram experimentos *in vivo*, para aferir se estas células possuíam o poder de tumorigênese. Observaram que após 42 dias os animais que receberam alíquotas de 1×10^3 e 1×10^4 células subcutaneamente no flanco anterior desenvolveram tumor.

Outro grupo de Quan e colaboradores em 2013, também demonstraram o potencial tumorigênico das células CTT, através da utilização de uma seleção

magnética por citometria de fluxo, isolaram uma população positiva de células para o marcador de membrana CD133 em neoplasia de fígado, onde constataram o poder tumorigênico dessas células através da utilização de camundongos imunodeprimidos que receberam 1×10^4 células subcutaneamente, os quais desenvolveram tumor após 28 dias.

Todos os estudos mencionados anteriormente abordam o aparecimento do tumor com diversos tipos celulares. Neste cenário, nosso trabalho representa o primeiro estudo a demonstrar a presença de células positivas para o CD133 isoladas de pacientes LNH. Por ser o primeiro trabalho, mostrou-se necessária a realização de uma curva padrão para determinar a quantidade ideal e necessária para formar o tumor. Desta forma, realizamos uma curva com 3 pontos, observamos que os camundongos que receberam 5×10^5 e 1×10^6 de células de pacientes que possuíam a forma de LNH agressivos apresentaram formação de tumor com 10 dias após inoculação. Os animais que receberam $0,25 \times 10^5$ células também de pacientes com LNH agressivos apresentaram alteração cutânea, porém, não observamos a formação de tumor. Interessantemente, constatamos uma regressão da massa tumoral após 30 dias, uma hipótese a ser considerada é a possibilidade de que as CT, juntamente com a subpopulação de CTT inoculadas subcutaneamente, tenham migrado para outras regiões do corpo dos camundongos, como já relatado por Sun S e Qiu XS em seus estudos realizados em 2013 a respeito da capacidade de migração das CTT.

Para comprovar se ocorreu a migração dessas células, utilizamos o sistema de imagem IVSIS Spectrum, que nos permitiu observar, após 24 horas do início do experimento, as células agrupadas na região abdominal dos

animais, assim como demonstrado por Botella e colaboradores em 2011, que, utilizando o mesmo equipamento, também demonstraram essa técnica de fluorescência em células cancerígenas.

Além disso, avaliamos possíveis alterações no perfil hematológico, porém, não observamos diferenças. No entanto, esse dado sugere que o procedimento realizado após 40 dias do inóculo não foi capaz de gerar um processo inflamatório devido à regressão do tumor. Contudo, se o sangue fosse colhido nos primeiros dez dias, quando observamos a formação do tumor, poderíamos ter encontrado alteração no perfil hematológico, diante de um processo inflamatório agudo, tendo em vista que esses camundongos nude são imunodeficientes.

Como transcorrido, as células isoladas da medula óssea dos pacientes com LNH apresentaram morfologia fibroblástoide, aderência ao plástico, marcadores de membrana compatível com células mesenquimais e células-tronco tumorais, além da presença dos genes de indiferenciação e capacidade de formar tumor em camundongos imunodeprimidos. Desta maneira, sugerimos que essas células são CTM com subpopulação de CTT, sendo estas dotadas de um fator de tumorigênese.

Diante dos dados observados, entre as metodologias empregas e o tipo de amostras utilizadas para encontrar as CTT em pacientes com LNH, faz-se necessário que haja mais estudos para melhor caracterizar esse tipo de célula, tanto em LNH quanto nos outros tipos de câncer.

Uma alternativa não utilizada neste presente estudo seria a realização por seleção magnética através da técnica de citometria de fluxo. Uma vez que o presente estudo demonstrou que mesmo com uma baixa porcentagem da

população CTT isolada durante o cultivo celular foi suficiente para proporcionar a formação de uma massa tumoral. Enquanto que a separação específica de uma dupla marcação de CD44⁺ e CD133⁺ proporcionariam uma melhor maneira de avaliar a propagação e manutenção de tumores em camundongos imunodeprimidos.

Assim, com essa população celular bem caracterizada, poderiam ser avaliados, em um estudo futuro, os mecanismos de ação dos diferentes quimioterápicos ou, até mesmo, o desenvolvimento de novos fármacos que possam agir diretamente sobre as CTT, impedindo assim a formação, manutenção e proliferação do câncer.

6. CONCLUSÃO

Com resultados obtidos no estudo, conclui-se que:

1. A partir das amostras de biópsia de linfonodo de pacientes com LNH foi possível isolar células com características fibroblastóide. Entretanto, nestas células isoladas não foi possível encontrar subpopulações de CTT, ou seja, células que apresentassem positividade para o marcador de membrana CD133.
2. Com relação às amostras de medula óssea de pacientes com LNH, foi possível isolar células-tronco mesenquimais e, além disso, foi constatada a presença de subpopulações CTT, ou seja, células positivas para os marcadores CD133 e CD44.
3. A inoculação das células isoladas derivada do linfonodo não apresentou nenhuma formação tumorigênica. Por outro lado, a inoculação das células isoladas derivadas da medula óssea de pacientes com LNH agressivos proporcionou uma formação de tumor e alteração cutânea.

7. ANEXOS

7.1. Termo de consentimento

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE:

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA Caracterização de células-tronco tumorais isoladas de linfoma não - Hodgking.

PESQUISADOR : Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

CARGO/FUNÇÃO: Médico INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 28342

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Genética e Hematologia Molecular - LIM 31

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO X

RISCO MÉDIO ☐

RISCO BAIXO ☐

RISCO MAIOR ☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 3 anos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

- 1 – Estamos realizando um estudo para verificar a possível presença células-tronco no tumor que senhor (a) possui. Sua participação voluntária nos permitirá confirmar se a origem desse tumor teve início com as células-tronco tumorais. Esta informação poderá no futuro, ajudar no desenvolvimento de novas formas de tratamento;
- 2 – O senhor (a) será submetido a um procedimento cirúrgico (biópsia) necessário para obtenção de amostra para realização de um exame. Nenhum risco a mais será adicionado, iremos utilizar o excedente do material destinado ao exame;
- 3 – Após o procedimento cirúrgico para obtenção do material necessário para realização da biópsia o excedente será destinado a essa pesquisa;
- 4 – Estamos pedindo sua permissão para, ao invés de descartá-lo, utilizá-lo para retirar células do mesmo e estudá-las;
- 5 – Não haverá benefício direto para o senhor (a), uma vez que trata-se de um estudo experimental para confirmar a presença de células-tronco formadoras de tumores;
- 6 – O senhor (a) pode optar por não participar do estudo, então o material coletado será descartado;
- 7 – Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa, para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, que pode ser encontrado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Laboratório de Investigação Médica 31, rua Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, 1º. Andar, Prédio dos Ambulatórios, sala 43 tel: (11) 3082-2398. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: (11) 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br;
- 8 – O senhor (a) tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento, deixando de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento neste serviço;
- 09 – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente;
- 10 – O senhor (a) possui o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;
- 11 – O senhor (a) não terá nenhuma despesa pessoal para participar desse estudo, incluindo exames e consultas. Também não há haverá compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa;
- 12 - Somente utilizaremos o material excedente doado para a realização desta pesquisa e em nenhuma outra. Todo o material biológico envolvido na mesma será descartado após o seu término.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Caracterização de células-tronco tumorais isoladas de linfoma não - Hondking”.

Eu discuti com o Dr. Sérgio Paulo Bydlowski sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal

Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha

Data ____ / ____ / ____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

7.2. Aprovação CAPPesq

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0797/11

Título: CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS ISOLADAS DE LINFOMA NÃO HODGKIN

Pesquisador Responsável: Dalton de Alencar Fischer Chamone

Pesquisador Executante: André Luiz Siqueira da Silva

Co-autores: Sergio Paulo Bydlowski, Adriana de Aguiar Debes, Juliana Pereira.

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 14/12/2011, o protocolo acima.

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) a elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 16 de Dezembro de 2011

PROF. DR. LUIZ EUGÊNIO GARCEZ LEME
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.
Fone: 55 11 2661-6442 ramais 16, 17, 18 e 20 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7.3. Adendo ao projeto

Hospital das Clínicas da FMUSP
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CAPPesq

Nº Protocolo: 0797/11

Título: CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO TUMORAIS ISOLADAS DE LINFOMA NÃO HODGKIN

Pesquisador Responsável: Dalton de Alencar Fischer Chamone

Pesquisador Executante: André Luiz Siqueira da Silva

Finalidade Acadêmica: Mestrado

Departamento: CLÍNICA MÉDICA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 17/07/2013, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

•Carta datada de 03.07.13 - Adendo ao projeto e novo TCLE

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 17 de Julho de 2013

PROF. DR. ALFREDO JOSÉ MANSUR
Vice-Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

7.4. Aprovação do ICESP

INSTITUTO DO CANCER DO ESTADO DE SÃO PAULO
Octávio Frias de Oliveira
Secretaria de Estado da Saúde
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

São Paulo, 10 de outubro de 2011

Registro: NP 174/2011

Ref. Solicitação de execução de estudo: **"Caracterização de Células - Tronco Tumoriais Isoladas de Linfoma não-Hodking"**

Pesquisador responsável: **Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski / André Luiz Siqueira da Silva**
Prezado Pesquisador

CONSIDERAÇÕES

RESPONSABILIDADES DO PESQUISADOR

Trata-se de um estudo experimental, com finalidade para obtenção de mestrado. O objetivo do estudo é verificar a presença de células tronco em linfoma utilizando trinta amostras de pacientes sediados no ICESP e realizar os experimentos no Laboratório de Investigação Médica – LIM 31 sediado no HCFMUSP. O estudo envolve área temática de Genética Humana e será patrocinado pelo LIM31.

Antes do início dos procedimentos relacionados ao estudo:

- Iniciar as atividades do estudo somente após aprovação/ciência do Comitê de Ética em Pesquisa para execução no ICESP segundo a Res. 196/96;
- Fornecer cópia da Carta de Aprovação e Relatório Semestral com ciência do CEP ao NGP- ICESP;
- Enviar Publicação dos resultados do estudo;

Informamos que sua solicitação foi DEFERIDA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Marcelo Gehm Hoff
Diretor Clínico

7.5. Aprovação do uso de animais

DIRETORIA TÉCNICA
DE APOIO AO ENSINO E PESQUISA
CENTRO DE BIOTERISMO

SOLICITAÇÃO PARA FORNECIMENTO DE ANIMAIS
Consulta para avaliação e aprovação

A DTAEP – Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, AVALIOU e APROVOU na data de 15-07-2013 o pedido para fornecimento dos animais solicitados pelo pesquisador conforme informações apresentadas como segue:

Título do projeto: **Caracterização de células-tronco tumorais isoladas de Linfoma não-Hodgkin**

Responsável: **Sérgio Paulo Bydlowski**

Executante: **André Luiz Siqueira da Silva**

Modelo Biológico: **CAMUNDONGO**

Linhagem: **SPF - Balb/c NUDE**

Sexo: **Macho**

Peso: **-**

Idade: **6 semanas**

Quantidade de animais: **10**

Frequência de retirada: **a cada 14 dias**

Total de animais: **55**

Cabe ao pesquisador apresentar ao Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP solicitação de aprovação para este projeto.

Após aprovação do CEP FMUSP o fornecimento dos animais referente a esta consulta poderá ser realizado conforme os critérios formais apresentados pela DTAEP.

São Paulo, 15 de Agosto de 2013

Documento aprovado. Não requer assinatura.

DTAEP FMUSP

Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa
Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Avenida Dr. Arnaldo, 455 – Cerqueira César – São Paulo – SP
Fone: 3061-7196

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahmad A, Govil Y, Frank BB. Gastric mucosaassociated lymphoid tissue lymphoma. *Am J Gastroenterol*;98:975–86 (2003).

Akanji AG. Estudo de marcação com iodo-131 de anticorpo monoclonal anti-CD20 usado na terapia de linfoma não-Hodgkin [Dissertação]. São Paulo: Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, (2006).

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumourigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.;100:3983-8 (2003).

Alison MR, Islam S. Attributes of adult stem cells. *J Pathol*.; 217(2):144-60. (2009).

An SK, Han JK, Kim YH, et al. Gastric mucosaassociated lymphoid tissue lymphoma: spectrum of findings at double-contrast gastrointestinal examination with pathologic correlation. *Radiographics*;21:1491–504 (2001).

Apter S, Avigdor A, Gayer G et al.,. Calcification in Lymphoma occurring before therapy: CT features and clinical correlation. *AJR Am J Roentgenol*;178:935–8. (2002).

Arai F, Hirao A, Ohmura M, Sato H, Matsuoka S, Takubo K, Ito K, Koh GY, Suda T. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell*. Jul 23;118(2):149-61 (2004).

Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization differentiation and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 8(3):301-16. (2004).

Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. Jul;3(7):730-7 (1997).

Botella P, Abasolo I, Fernández Y, Muniesa C, Miranda S, Quesada M, Ruiz J, Schwartz S Jr, Corma A. Surface-modified silica nanoparticles for tumor-targeted delivery of camptothecin and its biological evaluation. *J Control Release*. 2011 Dec 10;156(2):246-57. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.06.039. Epub (2011).

Bruce Wr, Van Der Gaag H. A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature*. Jul 6;199:79-80 (1963).

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem*. 64:278-294, (1997).

Chambers I, Smith A. Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*. 23:7150-7160 (2004).

Chattoo W et al.: The polycomb group gene Bmi1 regulates antioxidant defenses in neurons by repressing p53 pro-oxidant activity. *J Neurosci*, 29:529–542 (2009)

Cheng L et al.: OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia. *J Pathol*, 211:1–9 (2007).

Chiu C. Differential expression of telomerase activity in hematopoietic progenitors from adult human marrow. *Stem Cells* Dayton. 14:239-248. (1996)

Clarke DL. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* Washington DC. 288:1660-1663, 2000.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*;65:10946-51 (2005)

Deb KD, Sarda K. Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J Transl Med*. 6: 7. (2008).

Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*;112:4793-807. (2008).

Dvash T, Benvenisty N. Human embryonic stem cells as a model for early human development. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*.;18(6):929- 40. (2004)

Emily J. Guerard, MD, and Michael R. Bishop, MD, FACP Overview of Non Hodgkin's Lymphoma *Dis Mon*;58:208-218 (2012).

Eramo A et al.: Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*, 15:504–514. (2008).

Eve DJ, Marty PJ, McDermott RJ, Klasko SK, Sanberg PR. Stem Cell Research and Health Education. *Am J Health Educ.*;39(3):167-179 (2008).

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7: 21–33 (2006).

Ferreira, Aurélio Buarque de Holanda. Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa / Aurélio Buarque de Holanda Ferreira – 3. Ed. – Curitiba: Positivo, (2004).

Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell.* 116: 769-778 (2004).

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* Oct 1;64(19):7011-21 (2004).

Gedik R, Gedik S, Goze F, Develioglu H. Lymphoma in the infraorbital region. *JADA.* Oct; 134: 1353-5. (2003).

Gesk S, Klapper W, Martin-Subero JI et al. A chromosomal translocation in cyclin D1-negative/cyclin D2-positive mantle cell lymphoma fuses the CCND2 gene to the IGK locus. *Blood* 108(3), 1109–1110 (2006).

Gritti A, Vescovi AL, Galli R. Adult neural stem cells plasticity and developmental potential. *J. Physiol. Paris.* 96 1/2: 81-89. (2002)

Guettier C. Which stem cells for adult liver? *Ann Pathol.* 25: 33-44 (2005)

Hanada M, Delia D, Aiello A, Stadtmauer E, Reed JC Bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 82: 1820–1828 (1993).

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J et al.,. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, *Ann Oncol*;10:1419–32 (1999).

Hassler MR, Schiefer AI, Egger G Combating the epigenome: epigenetic drugs against non-Hodgkin's lymphoma. *Epigenomics.* Aug;5(4):397-415. doi: 10.2217/epi.13.39. (2013)

Health Central -
http://www.healthcentral.com//common/images/1/1129_8619_5.jpg. Acessado em setembro de 2013.

Heddleston JM et al.: Hypoxia-induced mixed-lineage leukemia 1 regulates glioma stem cell tumorigenic potential. *Cell Death Differ* 19:428–439 (2012).

Heissig B, Ohki Y, Sato Y. A role for niches in hematopoietic cell development. *Hematology*. 10: 247-253 (2005).

Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, Masterman-Smith M, Geschwind DH, Bronner-Fraser M, Kornblum HI. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 9;100(25):15178-83 (2003).

Hennessy BT, Hanrahan EO, Daly PA. Non- Hodgkin's lymphoma: an update. *Lancet Oncol*;5:341–53 (2004).

Hirao A, Arai F, Suda T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell Cycle*.. 3: 1481-1483 (2004).

Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*;136(4):509-23 (2009).

Horsman DE, Okamoto I, Ludkovski O et al. Follicular lymphoma lacking the t(14;18) (q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br. J. Haematol*. 120(3), 424–433 (2003).

Humeau L, . Phenotypic molecular and functional characterization of human peripheral blood CD34+/THY1+ cells. *Blood*. (1996).

Iacobuzio-Donahue CA Epigenetic changes in cancer. *Annu Rev Pathol* 4: 229–249 (2009).

INCA - Instituto Nacional do Câncer Estimativa da incidência de câncer - 2012
 Biblioteca virtual da saúde - http://bvsms.saude.gov.br/bvs/controle_cancer/ .
 Acessado em novembro de 2012.

INCA - Instituto Nacional do Câncer Estimativa da incidência de câncer - 2014
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24012014.pdf>. Acessado em fevereiro de 2014.

Jain NC. *Schalm's Hematology*. 4 ed. Philadelphia: Lea and Febiger (1986).

Kastrinaki MC, Andreakou I, Charbord P, Papadaki HA. Isolation of human bone marrow mesenchymal stem cells using different membrane markers:

comparison of colony/cloning efficiency, differentiation potential, and molecular profile. *Tissue Eng Part C Methods*.; 14(4):333-9 (2008).

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, . Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell*. 121: 823-835 (2005).

Kristinsson SY, Landgren O, Sjöberg J, Turesson I, Björkholm M, Goldin LR. Autoimmunity and risk for Hodgkin's lymphoma by subtype. *Haematologica*.;94:1468-9. (2009).

Kuang SQ, Bai H, Fang ZH et al.: Aberrant DNA methylation and epigenetic inactivation of Eph receptor tyrosine kinases and ephrin ligands in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 115:2412–2419 (2010).

Lanza R, Gearhart J, Hogan B. *Essentials of stem cell biology*. Elsevier (2006).
Laughlin MJ. Umbilical cord blood for allogeneic transplantation in children and adults. *N Engl J Med*. (2001).

Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. *Physiol Rev*.. 85: 1373-1416 (2005).

Levine AM. Acquired immunodeficiency syndrome-related lymphoma. *Blood*. July; 80(1): 8-20. (1992).

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. Feb 1;67(3):1030-7. (2007).

Li J, Law HK, Lau YL, Chan GC. Differential damage and recovery of human mesenchymal stem cells after exposure to chemotherapeutic agents. *Br J Haematol*. Nov;127(3):326-34 (2004).

Lian CG, Xu Y, Ceol C, Wu F, Larson A, Dresser K, Xu W, Tan L, Hu Y, Zhan Q, Lee CW, Hu D, Lian BQ, Kleffel S, Yang Y, Neiswender J, Khorasani AJ, Fang R, Lezcano C, Duncan LM, Scolyer RA, Thompson JF, Kakavand H, Houvras Y, Zon LI, Mihm MC Jr, Kaiser UB, Schatton T, Woda BA, Murphy GF, Shi YG. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma. *Cell*. Sep 14;150(6):1135-46. doi: 10.1016/j.cell.2012.07.033. (2012).

Liu ZZ, Chen P, Lu ZD, Cui SD, Dong ZM. Enrichment of breast cancer stem cells using a keratinocyte serum-free medium. *Chin Med J (Engl)*. Sep;124(18):2934-6 (2011)

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*;23:675-99. (2007)

Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin F, Ertem M, Grafakos S, Brichard B, Li X, Nagler A, Giorgiani G, Haut PR, Brochstein JA, Nugent DJ, Blatt J, Woodard P, Kurtzberg J, Rubin CM, Miniero R, Lutz P, Raja T, Roberts I, Will AM, Yaniv I, Vermylen C, Tannoia N, Garnier F, Ionescu I, Walters MC, Lubin BH, Gluckman E, Eurocord Transplant Group. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood*.101(6):2137-43. (2001).

Ma S, Chan KW, Hu L, Lee TK, Wo JY, Ng IO, Zheng BJ, Guan XY. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem / progenitor cells. *Gastroenterology*. Jun;132(7):2542-56 (2007).

Martin-Subero JI, Ibbotson R, Klapper W et al. A comprehensive genetic and histopathologic analysis identifies two subgroups of B-cell malignancies carrying a t(14;19)(q32;q13) or variant BCL3-translocation. *Leukemia* 21(7), 1532–1544 (2007).

Matsuda K , Falkenberg KJ, Woods AA, Choi YS,Morrison WA, Dilley RJ. Adipose-derived stem cells promote angiogenesis and tissue formation for in vivo tissue engineering. *Tissue Eng Part A*. Jun;19(11-12) 2013.

Mishra L, Banker T, Murray J, Byers S, Thenappan A, He AR, Shetty K, Johnson L, Reddy EP. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. Jan;49(1):318-29 (2009).

Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*;114:185-99 (2009).

Müller AMS, Ihorst G, Mertelsmann R, Engelhardt M. Epidemiology of non-Hodgkin's lymphoma (NHL): trends, geographic distribution, and etiology. *Ann Hematol*.;84:1-12 (2005).

Mutsaers AJ, Walkley CR. Cells of origin in Osteosarcoma: Mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? *Bone*. pii: S8756-3282(14)00040-4. doi: 10.1016/j.bone.2014.02.003 (2014).

Nakagawara A, Ohira M. Comprehensive genomics link-ing between neural development and cancer: neuroblastoma as a model. *Cancer Lett*; 204: 213–224. (2004).

National Institutes of Health - 2013
<http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter1.aspx> Acessado em dezembro de 2013.

Negrin RS . Favorable treatment outcome in non-Hodgkin's lymphoma patients with "poor" mobilization of peripheral blood progenitor cells. *Biol Blood Marrow Transplant.* 6(5): 506-12. (2000).

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature.*;445:106-10 (2007).

Odorico JS, Kaufmann DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* Dayton 19:193-204 (2001).

Pinto PCL, Faria CP, Gomes GA, Pinto AP. Linfoma não-Hodgkin envolvendo tonsila palatina: relato de 3 casos. *Rev Bras Otorrinolaringol.* mar/abr; 70(2): 273-6. (2004).

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, Weissman IL, Clarke MF, Ailles LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jan 16;104(3):973-8 (2007).

Project TIN-HSLPF. A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma. The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N .Engl. J. Med.* 329(14), 987–994 (1993).

Pui CH et al.; Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia*, 17:700–706. (2003).

Quan MF, Xiao LH, Liu ZH, Guo H, Ren KQ, Liu F, Cao JG, Deng XY. 8-bromo-7-methoxychrysin inhibits properties of liver cancer stem cells via downregulation of β -catenin. *World J Gastroenterol.* Nov 21;19(43):7680-95. doi: 10.3748/wjg.v19.i43.7680 (2013).

Rasheed Z, Wang Q, Matsui W. Isolation of stem cells from human pancreatic cancer xenografts. *J Vis Exp.* Sep 26;(43) (2010).

Regezi JA, Sciubba JJ. *Patologia Bucal: correlações clinicopatológicas*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; (2000).

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* Nov 1;414(6859):105-11 (2001).

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. Jan 4;445(7123):111-5 (2007).

Richards M, Tan SP, Tan JH. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells*. 22:51-64 (2004).

Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM Self renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*. 2008 Jun 10;314(9):1937-44. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.03.006 (2008).

Roubelakis MG, Pappa KI, Bitsika V, Zagoura D, Vlahou A, Papadaki HA, Antsaklis A, Anagnostou NP. Molecular and proteomic characterization of human mesenchymal stem cells derived from amniotic fluid: comparison to bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 16(6):931-52, (2007).

Santaliz-Ruiz LE, Xie X, Old M, Teknos TN, Pan Q, James AG, Solove RJ. Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. *Int J Cancer*. Dec 21. doi: 10.1002/ijc.28690. (2013).

Schipani E, Kronenberg HM. Adult mesenchymal stem cells in *Stem Book*. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; (2008).

Schmitz R, Young RM, Ceribelli M et al. Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics. *Nature* 490(7418), 116–120 (2012).

Sergio P. Bydlowski, Adriana A. Debes, Luciana M. F. Maselli, Felipe L. Janz. Biological characteristics of mesenchymal stem cells. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*;31(Supl. 1):25-35 (2009).

Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell*;138:822-9. (2009).

Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: similar and different. *Semin Cancer Biol*. Apr;20(2):85-92 (2010);

Shahrokhi S, Menaa F, Alimoghaddam K, McGuckin C, Ebtakar M. Insights and hopes in umbilical cord blood stem cell transplantations. *J Biomed Biotechnol.*;2012:572821 (2012).

- Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. Non-Hodgkin lymphoma *Lancet*. 1;380(9844):848-57. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60605-9. (2012).
- Siebert R, Rosenwald A, Staudt LM, Morris SW. Molecular features of B-cell lymphoma. *Curr. Opin. Oncol.* 13(5), 316–324 (2001).
- Silva M. Linfomas não-Hodgkin e SIDA. *Medicina Interna*. 10(4): 179-84 (2003).
- Silva R. Comparação entre as técnicas de imunofenotipagem por citometria de fluxo e reação em cadeia da polimerase no diagnóstico dos linfomas Folicular e Difuso de grande célula B [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, (2009).
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J et al.,. Identification of a cancer stem cell in human brain tumours. *Cancer Res.*;63:5821-8. (2003).
- Soares MB, Dos Santos RR. Bone marrow stem cell therapies for Chagas' disease cardiopathy and chronic hepatopathies: from the animal model to the patient *Cien Saude Colet*. Jan-Feb;13(1):17-9 (2008).
- Soares, F.A, Vassalho, J. Paes, R.P Bogiolo *Patologia*, 7ª Edição, Guanabara Koogan;. P.812. (2006).
- Soltanian S, Matin MM. Cancer stem cells and cancer therapy. *Tumour Biol*. Jun;32(3):425-40 (2011).
- Stolzing A, Jones E, Mcgonagle D, Scutt A. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mech Ageing Dev*. 129:163-173, (2008).
- Stone JM. Thomas Hodgkin: medical immortal and uncompromising idealist. *BUMC Proceedings.*;18:368-75 (2005)
- Strickland S, Smith KK, Marotti KR: Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells: generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell*, 21:347–355. (1980).
- Stupp R et al.,: Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol*, 10:459–466. (2009).

Sun S, Qiu XS. Cancer stem cells and tumor metastasis. *J Cancer Res Ther.* Nov;9 Suppl:S150-2. doi: 10.4103/0973-1482.122510 (2013).

Suzuki H, Watkins DN, Jair KW, Schuebel KE, Markowitz SD et al.,. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 36: 417–422 (2004).

Swerdlow S, Campo E, Harris N, Al E. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4th Edition). International Agency for Research on Cancer Press, Lyon, France, 214–217 (2008).

Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, Dinulescu DM, Connolly D, Foster R et al.,. Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian inhibiting substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA.*;103:11154-9. (2006).

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76. (2006).

Tarayrah L, Chen X. Epigenetic regulation in adult stem cells and cancers. *Cell Biosci.* 9;3(1):41. doi: 10.1186/2045-3701-3-41 (2013).

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell.*;102:451-61. (2000).

Thomas ED, Lochte HL Jr., Cannon JH, Sahler OD, Ferrebee JW. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest.* 38:1709-16 (1959).

Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 27:208-219 (2006).

Trowbridge JJ et al.,: Haploinsufficiency of Dnmt1 impairs leukemia stem cell function through derepression of bivalent chromatin domains. *Genes Dev*, 26:344–349. (2012).

Tumbar T, Guasch G, Greco V. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science.* 303: 359-363 (2004).

Urizar JMA, Goicouría MÁE, Del Valle AE. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida: manifestaciones em la cavidad bucal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*.; Suppl 9: 148-57 (2004).

Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem cells: hype and reality. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. :369-91 (2002).

Wang J et al.:. Novel histone demethylase LSD1 inhibitors selectively target cancer cells with pluripotent stem cell properties. *Cancer Res*, 71:7238–7249 (2011).

Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol*. Sep;15(9):494-501 (2005).

Watt FM, Hogan BLM. Out of the Eden: stem cells and their niches. *Science Washington DC*.. 287: 1427-1430 (2000).

Wen K, Fu Z, Wu X, Feng J, Chen W, Qian J. Oct-4 is required for an antiapoptotic behavior of chemoresistant colorectal cancer cells enriched for cancer stem cells: Effects associated with STAT3/Survivin. *Cancer Lett*. (2013).

Wessendorf S, Barth TF, Viardot A et al. Further delineation of chromosomal consensus regions in primary mediastinal B-cell lymphomas: an analysis of 37 tumor samples using high-resolution genomic profiling (array- CGH). *Leukemia* 21(12), 2463–2469 (2007).

Whitman SP, Hackanson B, Liyanarachchi S et al.:. DNA hypermethylation and epigenetic silencing of the tumor suppressor gene, SLC5A8, in acute myeloid leukemia with the MLL partial tandem duplication. *Blood*. 112:2013–2016 (2008).

Wright JM, Radman WP. Intrabony lymphoma simulating periradicular inflammatory disease. *JADA*; 126: 101-5 (1995).

Yang H et al.:. Tumor development is associated with decrease of TET gene expression and 5-methylcytosine hydroxylation. *Oncogene*, 32:663–669 (2013).

Yang ZF, Ho DW, Ng MN, Lau CK, Yu WC, Ngai P et al.,. Significance of CD90+ cancer stem cells in human liver cancer. *Cancer Cell*.;13:153-66 (2008).

Yoon SK. The biology of cancer stem cells and its clinical implication in hepatocellular carcinoma. *Gut Liver*. Jan;6(1):29-40 (2012).

Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.* Jun 1;68(11):4311-20 (2008).

Zhou BB, Zhang H, Damelin M, Geles KG, Grindley JC, Dirks PB. Tumourinitiating cells: challenges and opportunities for anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*;8:806-23 (2009).