VIVIAN FONSECA GONZAGA

**CÉLULAS TRONCO IMATURAS DE POLPA DENTÁRIA
HUMANA: UMA NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA
O TRATAMENTO DA APLASIA DE MEDULA ÓSSEA EM
MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo
2016

VIVIAN FONSECA GONZAGA

**CÉLULAS TRONCO IMATURAS DE POLPA DENTÁRIA
HUMANA: UMA NOVA ESTRATÉGIA TERAPÊUTICA PARA
O TRATAMENTO DA APLASIA DE MEDULA ÓSSEA EM
MODELO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Irina Kerkis

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Fonseca Gonzaga, Vivian
Células tronco imaturas de polpa dentária
humana: uma nova estratégia terapêutica para o
tratamento da aplasia de medula óssea em modelo
animal / Vivian Fonseca Gonzaga; orientadora Irina
Kerkis. -- São Paulo, 2016.
149 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Anemia aplástica. 2. Hematopoiese. 3. Radiação
ionizante. 4. Célula tronco mesenquimal. 5.
Transplante. I. Kerkis, Irina, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Vivian Fonseca Gonzaga

Título da Dissertação: Células tronco imaturas de polpa dentária humana: uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da aplasia de medula óssea em modelo animal

Orientador(a): Dr^a Irina Kerkis

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a):

Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente:

Assinatura:

Nome:

Instituição:

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Dr. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 2627-9585 - Fax: (55) (011) 2627-9505
ceuaib@butantan.gov.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Células tronco imaturas de polpa dentária: uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da aplasia de medula óssea", protocolo nº 1201/14, sob a responsabilidade de Irina Kerkis e Vivian Fonseca Gonzaga - que envolve a criação e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009 e de normas complementares, bem como está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 20/8/2014.

This is to certify that the proposal "Immature stem cells of dental pulp: a new therapeutic strategy for the bone marrow aplasia treatment", protocol nº 1201/14, under the responsibility of Irina Kerkis and Vivian Fonseca Gonzaga - which involves the breeding and/or use of animals belonging to phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings) - has been reviewed by the Institute Butantan Animal Care and Use Committee and approved in 8/20/2014. This proposal is in accordance with standards outlined by Brazilian laws for use of experimental animals, and with ethical principles adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation.

Vigência do Projeto:	Nº de animais/espécie
08/2014 - 03/2016 Laboratório de Genética	60 Camundongos C57BL/6 20-25g (F)

São Paulo, 30 de outubro de 2014

Dra. Wafar H. K. Cabrera
Coordenadora da CEUAIB

Dedico essa dissertação.

À Deus antes de tudo;

Aos meus pais Sandra e Wilson, sem eles nada na minha vida seria possível;

Ao meu irmão Lucas, pela cumplicidade e inspiração;

Ao meu noivo Seme, pelo amor e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Irina Kerkis, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Genética, por me orientar e por todo o aprendizado que me possibilitou ter;

À minha co-orientadora Dra. Cristiane Valverde Wenceslau, pela oportunidade de trabalhar com essa linha de pesquisa pela qual me apaixonei, por estar ao meu lado durante todas as etapas dessa jornada e pelas horas dedicadas a me co-orientar;

Ao Eduardo Frare, por toda a ajuda possível no desenvolvimento nesse trabalho, inclusive “bota a mão na massa” comigo na bancada. E sempre com o seu ótimo humor, tornando essa parceria muito agradável;

Aos meus colegas de laboratório Gustavo e Marcelly, por toda a ajuda na bancada e na manipulação com os animais;

Aos meus companheiros diários dessa jornada no Laboratório de Genética André (Gato), André (Zaka), Allan (Fofó), Bárbara (Oba), Celine, Damiana, Dener, Diana, Leandro (Panda), Lisley, Jéssica, Marília e Milena (acobreada), por tudo que vivemos dentro e fora do laboratório. Sem esses amigos eu não teria conseguido;

Ao pesquisador e vice-diretor do Laboratório de Genética Dr. Álvaro Prieto, por me ajudar a dar a reviravolta desse trabalho;

Ao Dr. Daniel Vieira, por abrir a porta do IPEN para esse trabalho e pela colaboração na irradiação dos animais. Sem isso não seria possível iniciar esse trabalho;

Ao Dr. Henrique Krambeck Rofatto, pela ajuda nas coletas de sangue dos animais;

Aos funcionários do Laboratório de Genética do Instituto Butantan, por toda a ajuda prestada durante esses anos. Em especial para a Fátima, por ajudar diretamente nesse trabalho sempre que foi preciso;

Ao Instituto Butantan, pela possibilidade estrutural de realizar esse trabalho;

Aos Laboratório de Fisiopatologia e ImunoGenética do Instituto Butantan, por fornecerem seus equipamentos para ajudar na execução desse trabalho;

Ao IPEN, por possibilitar a realização do procedimento de radiação dos animais;

Às agências de fomento CAPES e principalmente FAPESP (processo: 2014/02768-6), pelo auxílio financeiro durante o mestrado;

À empresa CellAvita, pelo apoio financeiro para a execução desse trabalho.

Pense, acredite, sonhe e atreva-se!

(Walt Disney)

RESUMO

GONZAGA, F. V. **Células tronco imaturas de polpa dentária humana: uma nova estratégia terapêutica para o tratamento da aplasia de medula óssea em modelo animal.** 2016. 149 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

AA é uma doença grave, e a mais frequente das síndromes de falência da MO, que dentre as diferentes causas, pode ser ocasionada pela exposição de altas doses de radiação e ou drogas. É caracterizada pela diminuição de todos os elementos celulares do sangue (pancitopenia) e hipocelularidade medular, que pode levar a morte. Em casos severos de AA, os tratamentos são restritos ao transplante alogênico de MO e/ou uso de imunossuppressores. Para esta finalidade, o sangue do doador deve ser tipado pelo HLA, para identificar suas características genéticas entre doador e beneficiário. Apesar do número de doadores de MO cadastrados no Brasil crescer a cada ano, a diversidade étnica do país acaba tornando mais difícil encontrar doadores compatíveis. Desta forma, o desenvolvimento de estratégias terapêuticas utilizando células alogênicas e não imunogênicas tem ganhado grande destaque na AA. Assim, as CTM são fontes celulares candidatas para este propósito, pois são praticamente não imunogênicas devido à sua ação parácrina de imunomodulação. Além disso, as CTM compõem naturalmente o nicho estromal da MO e possuem um importante papel na hematopoiese. Desta forma, o projeto propôs utilizar a CTIPDh, que é um tipo de CTM, em modelo experimental de AA. Para induzir AA submetemos animais ao tratamento com ciclofosfamida (n=10) e radiação ionizante a 6 Gy (n=40). Somente a radiação ocasionou a ablação da MO, sendo o modelo experimental adotado neste estudo. Após a radiação os camundongos receberam três transplantes de CTIPDh com intervalo de 15 dias via IP. A resposta clínica do transplante de CTIPDh foi monitorada através da avaliação da massa corpórea, hemograma e histopatologia da MO. O enxerto das CTIPDh na MO e o efeito do enxerto destas células na hematopoiese, também foi verificado. Também, comparamos a capacidade de derivar UFC entre os animais experimentais. Os resultados demonstraram que os animais irradiados e tratados com CTIPDh apresentaram benefícios clínicos e laboratoriais em relação aos animais não tratados como: maior taxa de sobrevivência (ausência de morte); ganho de massa corpórea; restabelecimento dos valores de eritrócitos, hematócrito e leucócitos. Apesar de observarmos baixa enxertia das CTIPDh na MO dos camundongos, houve recuperação dos componentes medulares em comparação aos animais não tratados. Ainda, o transplante com CTIPDh colaborou com a recuperação da hematopoiese, dado que é demonstrado pelo aumento da expressão dos marcadores murinos de CTH e progenitores (Sca1, c-kit, CD34, CD44 e CD45), endoteliais (nestina e CD105) e estromais (CD90) em relação ao grupo não tratado. A ação antiapoptótica foi outra ação das CTIPDh demonstrada neste estudo; os animais tratados com CTIPDh tiveram um menor número de células apoptóticas comparado ao grupo não tratado. Os resultados indicam que o transplante das CTIPDh são uma fonte terapêutica em potencial para a AA.

Palavras-chave: Anemia aplástica. Hematopoiese. Radiação ionizante. Células tronco mesenquimais. Transplante.

ABSTRACT

GONZAGA, F. V. **Immature stem cells from human dental pulp: a new therapeutic strategy for the treatment of bone marrow suppression in an animal model.** 2016. 149 p. Dissertation (Master in Biotechnology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Aplastic anemia (AA) is the most frequent bone marrow (BM) failure syndrome, which may be caused by the exposure of high doses of radiation or drugs. AA is characterized by peripheral pancytopenia and bone marrow hypoplasia, which can lead to death. In severe cases of AA, treatments are limited to allogeneic BM transplant and/or immunosuppressants administration. For this purpose, the donor blood must be typed to identify their HLA, which should be compatible with recipient blood. Although the number of BM donors registered in Brazil grows every year, due to the ethnic diversity became more difficult to match compatible donors. Thus, the development of stem cell-based therapeutic strategy that employs allogeneic cells of low immunogenicity may be a promising tool for AA treatment. Thereby, mesenchymal stem cells (MSCs) are appropriate candidates for therapeutic use, because they present low immunogenicity and provide immunomodulation effect in tissue repair. Furthermore, MSCs comprise the BM stromal niche and have important role in supporting hematopoiesis. Therefore, we proposed human dental pulp stem cells (hDPSC), which is a type of MSC, to be tested as an experimental treatment in AA experimental model. AA was induced using chemical drug (cyclophosphamide) (n = 10) and 6Gy ionizing radiation (n = 40). Radiation exposure caused BM ablation in mice while cyclophosphamide did not provide sufficient ablation, thus ionizing radiation of AA model was selected. After radiation, the mice received three equal doses of hDPSC each 15-day via intraperitoneal injection. Clinical response was monitored by body mass, blood cells counting and histopathology of BM. The influence of hDPSC infusion on hematopoiesis and engraftment capacity of this cell was investigated. Additionally, we verified the ability of BM derived cells to form colonies using unity colony formation (CFU-f) assay before and after cell transplantation. Our data show the hDPSC transplantation in irradiated mice improves clinical and laboratory conditions demonstrating high survival rate (no death); body mass gain; improvement values of erythrocytes, hematocrit and leukocytes. Although transplant intraperitoneal showed low hDPSC grafting in BM, the recovery of medullary components was significantly. Moreover, the transplantation of hDPSC contributed with the recovery of medullary components since it was demonstrated an increase of expression of murine hematopoietic stem cell (HSCs) and stem cell progenitors (Sca1, c-kit, CD34, CD44 and CD45), endothelial cells (nestin and CD105) and stromal (CD90) markers when compared to untreated group. Furthermore, mice treated with hDPSC present lower number of apoptotic cells compared to the untreated group. The results indicate that hDPSC transplantation is a potential tool for AA cell-based therapeutics, thus opening new perspectives in the application of hDPSC in regenerative medicine.

Keywords: Aplastic anemia. Hematopoiesis. Ionizing radiation. Mesenchymal stem cells. Transplant.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fluxograma da indução do modelo de AA com ciclofosfamida	38
Figura 2 - Posicionamento na fonte panorâmica de radiação e contenção dos animais.....	40
Figura 3 - Fluxograma da terapia celular	41
Figura 4 - Imunocitofluorescência de CTIPDh para os anticorpos CD90, Fibronectina, Nestina e Vimentina	52
Figura 5 - Gráfico para avaliação dos eritrócitos do grupo induzido por ciclofosfamida.....	54
Figura 6 - Esfregaço sanguíneo do grupo induzido por ciclofosfamida corado por kit panótico.....	55
Figura 7 - Esfregaço medular do grupo induzido por ciclofosfamida corado por kit panótico.....	56
Figura 8 - Cortes histológicos da MO do grupo induzido por ciclofosfamida corados por H&E.....	57
Figura 9 - Gráfico de avaliação da massa corpórea do grupo induzido por ciclofosfamida.....	58
Figura 10 - Curva de Kaplan-Meier para o estudo de sobrevivência dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	59
Figura 11 - Gráficos de evolução da massa corpórea dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	61
Figura 12 - Gráfico de avaliação comparativa da massa corpórea entre os grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	62
Figura 13 - Gráficos de avaliação dos valores de eritrócitos dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	63
Figura 14 - Gráficos de comparação dos valores de eritrócitos entre os grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	64

Figura 15 - Gráficos de avaliação dos valores de hematócrito dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	65
Figura 16 - Gráficos de comparação dos valores de hematócrito entre os grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	66
Figura 17 - Gráficos de avaliação dos valores de leucócitos dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	68
Figura 18 - Gráficos de comparação dos valores de leucócitos entre os grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	69
Figura 19 - Cortes histológicos da MO dos grupos controle, ciclofosfamida e irradiado corados por H&E	71
Figura 20 - Cortes histológicos da MO dos grupos tratado e não tratado com CTPDh corados por H&E	73
Figura 21 - Esfregaço de MO dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh corado com kit panótico	75
Figura 22 - Ensaio de UFC derivadas do “ <i>flushing</i> ” medular do grupo tratado com CTPDh.....	77
Figura 23 - Ensaio de UFC derivadas do “ <i>flushing</i> ” medular do grupo não tratado com CTPDh.....	78
Figura 24 - Gráfico do número de UFC em comparação entre os grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratado e não tratado com CTIPDh	79
Figura 25 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo p53 dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratados e não tratados com CTIPDh.....	81
Figura 26 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo Fibronectina dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratado e não tratado com CTIPDh.....	83
Figura 27 - Imunocitofluorescência, imunocitoquímica e imunohisquímica do aspirado de MO dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh para fibronectina ...	85
Figura 28 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo Nestina dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratado e não tratado com CTIPDh.....	87

Figura 29 - Imunocitofluorescência, imunocitoquímica e imunohisquímica do aspirado de MO dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh para nestina	88
Figura 30 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD105 dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratado e não tratado com CTIPDh.....	90
Figura 31 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo Sca-1 dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratados e não tratados com CTIPDh.....	93
Figura 32 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo C-kit dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratados e não tratados com CTIPDh.....	94
Figura 33 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD34 dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratados e não tratados com CTIPDh.....	95
Figura 34 - Imunocitofluorescência, imunocitoquímica e imunohisquímica do aspirado de MO dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh para Sca-1	96
Figura 35 - Imunocitofluorescência, imunocitoquímica e imunohisquímica do aspirado de MO dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh para C-kit	98
Figura 36 - Imunocitofluorescência, imunocitoquímica e imunohisquímica do aspirado de MO dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh para CD34	100
Figura 37 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD45 dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratados e não tratados com CTIPDh.....	102
Figura 38 - Imunocitofluorescência, imunocitoquímica e imunohisquímica do aspirado de MO dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh para CD45	103
Figura 39 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD44 dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratados e não tratados com CTIPDh.....	105
Figura 40 - Imunocitofluorescência, imunocitoquímica e imunohisquímica do aspirado de MO dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh para CD44	106

Figura 41 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD90 dos grupos controle, 48 horas após a irradiação, tratados e não tratados com CTIPDh.....	109
Figura 42 - Imunocitofluorescência, imunocitoquímica e imunohisquímica do aspirado de MO dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh para CD90	110
Figura 43 - Imunohistoquímica do anticorpo anti-nucleo humano para avaliar enxertia das CTIPDh na MO	112
Figura 44 - Imunohistoquímica do anticorpo anti-nucleo humano para avaliar enxertia das CTIPDh no baço	113
Figura 45 - Cortes histológicos do baço dos grupos controle, 48 horas após irradiação, tratado e não tratado com CTIPDh corados por H&E	114
Figura 46 - Gráficos de avaliação de eritrócitos, hematócrito e leucócitos dos grupos tratado com CTIPDh (D62), tratado com CTIPDh (6 meses). não tratado com CTIPDh (D62) e não tratado com CTIPDh (6 meses).	116
Figura 47 - Cortes de MO do grupo tratado e não tratado com CTIPDh a longo prazo (6 meses) corados com H&E.....	117
Figura 48 - Gráficos citometria de fluxo para p53, Fibronectina, Nestina, CD105, Sca-1, C-kit, CD34, CD44, CD45 e CD90 dos grupos tratado com CTIPDh (D62), tratado com CTIPDh (6 meses), não tratado com CTIPDh (D62) e não tratado com CTIPDh (6 meses).....	119
Figura 49 - Efeito da radiação nos camundongos dos grupos tratado e não tratado com CTIPDh.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de referência de hemograma completo para a espécie de camundongos.....	44
Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados neste trabalho.....	135
Tabela 3 - Anticorpos secundários utilizados neste trabalho	136
Tabela 4 - Valores dos índices hematimétricos encontrados no hemograma completo dos 3 grupos experimentais realizados neste trabalho	137

LISTA DE ABREVIATURAS DE SIGLAS

AA - “Anemia aplástica”

ANOVA - Análise de variância estatística

Anti-Núcleo - Humano Anticorpo destinado à detecção de núcleo humano

B7-1 - Molécula co-estimulatória de linfócito T tipo 1

B7-2 - Molécula co-estimulatória de linfócito tipo 2

Baso - Basófilo

BSA - do inglês “*bovine serum albumin*” (albumina bovina)

C57BL6 - Linhagem de camundongo C57 *black* 6

CD105 - Glicoproteína de membrana expressa em células tronco hematopoiéticas e progenitores endoteliais (Endogлина)

CD11b - Integrina envolvida na adesão leucocitária e na imunidade inata

CD13 - Antígeno precursor de células mielóides

CD14 - Co-receptor para lipopolisacarídeos bacterianos (LPS)

CD19 - Antígeno de linfócito B

CD31 - Molécula de adesão celular endotelial plaquetária

CD34 - Glicoproteína de membrana expressa em células tronco hematopoiéticas e progenitoras

CD40 - Proteína co-estimulatória envolvida na estimulação de células do sistema imune

CD40-L - Glicoproteína de membrana e antígeno de diferenciação expresso na superfície de células T que se liga a antígeno CD40 em linfócitos B

CD44 - Glicoproteína de superfície celular envolvido na migração, adesão celular e na manutenção de precursores hematopoiéticos;

CD45 - Proteína receptora de tirosina fosfatase expresso em todos os leucócitos (antígeno linfocitário comum)

CD73 - Proteína de membrana com ação enzimática e de adesão

CD79 - Proteína transmembrana expressa em linfócitos B

CD90 - Glicoproteína de superfície expresso em células tronco mesenquimais

C-kit - Receptor de fator de crescimento de célula tronco

CO₂ - Dióxido de carbono

CONCEA - “Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal”

CT - “Célula tronco”

CTA - “Célula tronco adulta”

CTCN - “Célula tronco da crista neural”

CTE - “Célula tronco embrionária”

CTH - “Célula tronco hematpoiética”

CTIPDh - “Célula tronco imatura de polpa de dente humana”

CTM - “Célula tronco mesenquimal”

DAPI - “4',6-Diamidino-2-phenylindol”

DMEM-L - “*Dulbecco's Modified Eagle Medium Low Glucose*” (meio de cultura)

EDTA - do inglês “*ethylenediamine tetraacetic acid*”

EDTA K2 - do inglês “*ethylenediamine tetraacetic acid K2*” (pulverizado)

Eosin - “Eosinófilo”

Fibronectina - Fator natural de aderência celular expresso em matriz extracelular

FITC - do inglês “*fluorescein isothiocyanate*”

Gran - “Granulócito”

Gy - Unidade de radiação do inglês “*Gray*”

HGB - do inglês “*hemoglobina*” (dosagem de hemoglobina)

HLA - do inglês “*human leucocyte antigen*” (antígeno leucocitário humano)

HLA-DR - O mesmo que MHC de classe II

HTC - do inglês “*hematocrit*” (contagem de hematócritos)

IL - “Interleucina”

IP - “Intraperitoneal”

Kaplan-Meier - Curva de análise de sobrevivência

Linf - “Linfócito”

MCHC - do inglês “*mean corpuscular hemoglobin concentration*” (concentração de hemoglobina corpuscular média)

MHC - do inglês “*mean corpuscular hemoglobina*” (*hemoglobina corpuscular média*)

MHC II - “Molécula de histocompatibilidade de classe II”

MO - “Medula óssea”

Mon - “Monócito”

Nanog - Fator de transcrição fator chave de pluripotência

Nestina - Proteína de filamento intermediário presente em progenitores neurais

Oct-4 - Fator de transcrição de octâmero 4

P4/5 - “Passagem 4 e 5” da cultura celular

p53 - Proteína citoplasmática que regula o ciclo celular

PBS - do inglês “*phosphate buffer solution*” (solução tampão de fosfato)

PLT - do inglês “*platelet*” (Plaqueta)

PVC - “Cloreto de Polivinila”

RBC - do inglês "*red blood cell*" (contagem global de eritrócitos)

RPM - "Rotações por minuto"

Sca-1 - do inglês "*Stem cell antigen-1*" Proteína de superfície celular de ativação de célula tronco

SH2 - Proteína de domínio presente em células tronco embrionárias hematopoiéticas e mesenquimais

SH3 - Proteína de domínio presente em células tronco embrionárias hematopoiéticas e mesenquimais

SH4 - Proteína de domínio presente em células tronco embrionárias, hematopoiéticas e mesenquimais

SSEA-3e4 - Antígeno embrionário estágio específico

TBI - do inglês "*Total Body Irradiation*"

TRA-1-60 - Antígeno de reconhecimento tumoral

TRA-1-81 - Antígeno de reconhecimento tumoral

UFC - "Unidade formadora de colônia"

Vimentina – Proteína de filamento intermediário expressa em célula tronco mesenquimal

WBC - do inglês "*white blood cell*" (contagem global de leucócitos)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVO	25
2.1 Objetivos Específicos	25
3 REVISÃO DA LITERATURA	26
3.1 Células Tronco	26
3.1.1 Células Tronco Mesenquimais	27
3.1.2 Células Tronco Imaturas de Polpa Dentária Humana	28
3.1.3 Ação Terapêutica das Células Tronco Mesenquimais	29
3.1.4 Uso clínico das células tronco mesenquimais	30
3.2 Anemia Aplástica e sua Etiopatogenia	31
3.3 Indução de anemia aplástica em modelo animal	33
3.3.1 Mecanismo dos neoplásicos bussulfano e ciclofosfamida na anemia aplástica	34
3.3.2 Mecanismo da radiação iônica na anemia aplástica	35
3.4 Células Tronco Mesenquimais na terapêutica da Anemia Aplástica	36
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Modelo experimental	38
4.2 Terapia Celular	40
4.3 Célula tronco (CTIPDh)	43
4.4 Hemograma	43
4.5 Coleta do Aspirado Medular	44
4.6 Ensaio Unidade Formadora de Colônia (UFC)	45
4.7 Citometria de Fluxo	45
4.8 Coleta do tecido medular e baço	46
4.8.1 Descalcificação	46
4.8.2 Histoquímica	46
4.8.3 Imunohistoquímica	47

4.9 Imunocitofluorescência.....	48
4.10 Centrifugação para citologia (Citospin).....	49
4.10.1 Imunocitoquímica	50
4.11 Análise dos resultados	50
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1 Caracterização imunofenotípica das CTIPDh.....	51
5.2 Indução química da anemia aplástica com ciclofosfamida	53
5.3 Indução da aplasia utilizando radiação ionizante	59
5.3.1 Curva de Sobrevivência	59
5.3.2 Massa corpórea.....	60
5.3.3 Índices Hematimétricos	62
5.3.3.1 Eritrócitos	63
5.3.3.2 Hematócrito.....	65
5.3.3.3 Leucócitos	67
5.3.4 Características morfológicas da medula óssea de camundongos irradiados (6 Gy)	70
5.3.5 Esfregaço de Medula Óssea	74
5.3.6 Ensaio de unidade formadora de colônia	76
5.3.7 Avaliação da contribuição funcional das CTIPDh na função hematopoiética e estromal da medula óssea	80
5.3.7.1 Ação anti-apoptótica das CTIPDh na ablação da medula óssea por irradiação	80
5.3.7.2 Ação das CTIPDh na matriz extracelular da medula óssea	82
5.3.7.3 Ação das CTIPDh no nicho vascular	86
5.3.7.4 Ação das CTIPDh no nicho hematopoético	91
5.3.7.5 Ação das CTIPDh no nicho estromal medula óssea	108
5.3.8 Biodistribuição e enxertia das CTIPDh.....	111
5.3.9 Características morfológicas do Baço de camundongos irradiados (6 Gy)	113

5.3.10 Ação das CTIPDh na aplasia de medula óssea induziada por radiação a longo prazo (6 meses)	115
5.3.11 Outros benefícios do transplante de CTIPDh em camundongos irradiados funcional das CTIPDh.....	119
6 CONCLUSÃO	121
REFERÊNCIAS.....	123
APÊNDICE	135
APÊNDICE A - Anticorpos Primários.....	135
APÊNDICE B - Anticorpos Secundários.....	136
APÊNDICE C - Hemograma Completo	137

1 INTRODUÇÃO

AA é uma doença rara, caracterizada por pancitopenia moderada a grave no sangue periférico e hipocelularidade acentuada na MO, sendo a mais frequente das síndromes de falência medular (MARSH et al., 2009). É ocasionada por uma agressão à CTH pluripotente, levando a sua diminuição e até mesmo ausência na MO. Essa falência medular pode ser integral ou parcial, com substituição gordurosa dos elementos e sem nenhum sinal de transformação maligna ou mielodisplásica (BACIGALUPO, 2009; MALUF, 2002; SCHEINBERG, 2012; TELES et al., 2002).

A maior parte dos casos (em torno de 80%) é idiopática porque sua primeira etiologia é desconhecida (MARSH et al., 2009). Desde o início dos estudos, a AA tem sido fortemente associada às exposições a agentes químicos, drogas e altas doses de radiação iônica, dando a essa doença um impacto desproporcional em sua incidência (YOUNG, 2002). A associação dessas causas distintas tem levado a comunidade científica acreditar que são numerosos e diferentes os mecanismos dessa doença, aumentando a complexidade do diagnóstico etiológico e a incerteza de seu tratamento (LIU, 2015; YOUNG, 2002).

A forma de tratamento depende do paciente e suas particularidades clínicas, com o objetivo de optar pelo mais apropriado no momento ideal e de acordo com seus recursos disponíveis, sendo indicado para os casos moderados somente transfusões de concentrado de hemácias e plaquetas e tratamento suporte com antibiótico em casos de infecções (MEDEIROS, 2010). Para os casos graves, as principais intervenções são os transplantes de CTH e terapias imunossupressoras (DEZERN, 2011; MARSH et al., 2009).

No entanto, o transplante com CTH é limitado, pois só pode ser realizado em pacientes com o HLA idêntico e, além disso, o número de CTH residentes na MO e sangue periférico reduz gradativamente com o avançar da idade, o que restringe ainda mais os doadores aptos (SCHEINBERG, 2012). Além disso, muitas vezes esse transplante é associado a drogas imunossupressoras por longos períodos. Estas drogas apresentam vários efeitos colaterais, deixando o paciente mais debilitado, sendo que muitas vezes não respondem adequadamente às terapias imunossupressoras (PASQUINI, 2000; SANDOZ, 1998; YOUNG, 2002).

Desta forma, a busca por novas alternativas terapêuticas para as doenças hematológicas vêm crescendo continuamente, sendo comum a utilização de transplante de CTM, seja de forma alógena ou autóloga para prevenir e tratar a doença enxerto *versus* hospedeiro em seres humanos após o transplante de CTH ou MO (SCHEINBERG, 2012). Esses benefícios são atribuídos principalmente pelo efeito autócrino e parácrino que agem através da ação regenerativa (diferenciação celular); supressão de células imunes intrínsecas (ação imunomoduladora); anti-inflamatória; antiapoptótica; angiônica; quimiotática; e estimulam a proliferação das CT intrínsecas, levando assim a regeneração dos tecidos (GARCIA-CASTRO et al., 2008; PAREKKADAN, 2010). Além disso, as CTM possuem a capacidade de estimular a produção e diferenciação em contribuição a hematopoiese, tornando-as candidatas ainda mais excelentes para aplicações clínicas na hematologia (BUENO et al., 2014).

Durante anos o foco de terapia celular foi a MO como fonte de CTM. Porém o número de CTM é baixo, correspondendo apenas 0,1% das células nucleadas em aspirados quando comparada com outras fontes de CTM que foram posteriormente descobertas. (BAJADA et al., 2008; DEUS et al., 2012; PAREKKADAN, 2010). Exemplos destas fontes são o tecido adiposo e a polpa de dente (HEISSIG et al., 2005; KERKIS et al., 2006). A polpa de dente é facilmente obtida, não causa dor ao doador, contém uma grande população de CTM e apresentam alta eficiência *in vitro* quanto à formação de colônias e à sua proliferação celular, comparada às CTM isoladas da MO (KERKIS et al., 2006). Em especial, as CTIPDh expressam o marcador CD13 que é um precursor de células mielóides o que as torna uma célula atrativa para o tratamento de doenças hematológicas (LIZIER et al., 2012).

Assim, partindo do conhecimento prévio da capacidade promissora autócrina e parácrina da CTM, é possível afirmar que a CTM possui um papel fundamental no auxílio da hematopoiese, e por isso apresenta grande potencial para tratar a AA, sem manifestar os efeitos indesejáveis apresentados com o uso das CTH (doença do enxerto hospedeiro) e drogas imunossupressoras. Também, até o presente não foi demonstrado o uso de CTM de polpa de dente heteróloga e criopreservadas para o tratamento da AA. Desta forma, esse trabalho trouxe a proposta de utilização de CTM derivada de polpa de dente humana para o tratamento da AA em modelo animal induzido.

2 OBJETIVO

O projeto tem como objetivo avaliar benefícios clínicos e biológicos das CTIPDh (ação autócrina e parácrina) em camundongos aplásicos induzidos.

2.1 Objetivos Específicos

- Estabelecer um modelo animal de AA;
- Analisar a sobrevivência dos animais irradiados que receberam ou não xenotransplante das CTIPDh;
- Investigar se as CTIPDh são capazes de recuperar os índices hematimétricos no sangue periférico;
- Investigar a enxertia das CTIPDh através de imunolocalização no nicho estromal na MO do camundongo;
- Avaliar o restabelecimento da hematopoiese em camundongos tratados e não tratados com CTIPDh com uso de anticorpos de CTH, e seus progenitores, de progenitores endoteliais e CTM;
- Avaliar o efeito conservador das células da MO promovido pelas CTIPDh.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Para a realização do presente trabalho fez-se necessária inicialmente a aquisição do conhecimento, acumulada a partir do estudo da literatura previamente descrita nos assuntos que envolvem as áreas da AA e possível terapia celular com CTM.

3.1 Células Tronco

As CT são definidas como células indiferenciadas e não especializadas com grande capacidade de autorrenovação. São capazes de multiplicar-se e originar uma grande população de células semelhantes mantendo-se indiferenciadas e quando necessário podem diferenciar-se em células especializadas (BYDLOWSKI, 2009; LEMISCHKA, 2005). Existem duas categorias principais de CT: as embrionárias e as adultas (SOUZA et al., 2010).

As CTE são derivadas do zigoto, classificadas como totipotentes, ou seja, capazes de diferenciarem-se em células dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma), e ainda podem originar os tecidos extraembrionários. As CT da massa celular interna do blastócito são classificadas como pluripotentes, que podem diferenciar-se em células dos três folhetos embrionários, porém não são capazes de originar tecidos extraembrionários (DONOVAN, 2001).

Em contra partida, CTA são classificadas como multipotentes, e aparentemente possuem capacidade limitada por gerar células predispostas a especializarem-se de acordo com o seu nicho (SOUZA et al., 2010; SYLVESTER; LONGAKER, 2004). Porém, as CTA podem ser encontradas como reservas na maior parte dos tecidos adultos, sendo capazes de autorrenovação, ou seja, capazes de multiplicarem-se, mantendo seu estado indiferenciado; e, mais interessante ainda, sua capacidade de diferenciar-se em diversos tipos celulares (BAJADA et al., 2008; SYLVESTER; LONGAKER, 2004).

3.1.1 Células Tronco Mesenquimais

As CTM são um protótipo de CTA que exibem características fibroblastóides, com capacidade de autorrenovação e diferenciação, com uma ampla distribuição entre diversos tecidos e órgãos. Essas células são responsáveis pela manutenção dos nichos de CT de cada tecido, promovendo a homeostase necessária de cada órgão (BYDLOWSKI, 2009; WILLIAMS; HARE, 2011).

Com isso, as CTM são consideradas importante ferramenta para aplicação clínica por sua fácil obtenção através de diversos tecidos adultos, por seu fácil isolamento *in vitro*, alta capacidade de expansão *in vitro* e por serem imunogênicas, isto é, não causam rejeição quando transplantadas, o que possibilita transplantes alógenos (CAPLAN; DENNIS, 2006).

De acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular e Células Tronco Mesenquimais, existem três requerimentos mínimos para que uma população celular seja considerada CTM. Primeiramente, essas células deverão ter a capacidade de aderência ao plástico quando submetidas às condições básicas de cultura, terão que expressar os marcadores CD105, CD73 e CD90, e que em CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. E finalmente, que essas células deverão possuir a capacidade de diferenciar-se em osso, cartilagem e gordura (SOUZA et al., 2010).

A MO foi a primeira fonte descoberta de CTM, e durante anos pensava-se ser a única. Porém, atualmente sabe-se que essas células estão presentes em quase todos os tecidos e órgãos de um indivíduo adulto (HEISSIG et al., 2005; PAREKKADAN, 2010). Essas células já possuem uma predisposição em diferenciar-se em determinada linhagem de seu tecido específico. Em contrapartida, sabe-se hoje que as CTM quando isoladas e cultivadas sob condições e meios específicos poderão diferenciar-se em outras linhagens celulares (GIROLAMO et al., 2013; SOUZA et al., 2010). Esse processo é denominado transdiferenciação, onde uma célula já comprometida com uma linhagem celular pode se alterar de forma que origine uma linhagem celular distinta (HERZOG et al., 2003).

Assim, as CTM são capazes de diferenciar-se em uma variedade de linhagem, sendo os principais: osteogênica, condrogênica, adipogênica, neurogênica, e cardiogênica (BAJADA et al., 2008; BYDLOWSKI, 2009).

3.1.2 Células Tronco Imaturas de Polpa Dentária Humana

Desde a primeira descrição das CTM, a fonte principal sempre foi a MO, porém nos últimos anos foram relatados fontes alternativas de tais células. Essas fontes são marcadas principalmente por serem tecidos descartados, como gordura de lipoaspiração, cordão umbilical e dentes decíduos (GIROLAMO et al., 2013).

Dentre essas fontes, atualmente, as CTM na odontologia humana está sendo muito utilizada, devido sua facilidade de coleta, associada à baixa morbidade. A extração de CT do tecido pulpar é eficiente, tornando-as ideais para uma reconstrução tecidual (KERKIS; CAPLAN, 2012). Após estudos aprofundados verificou-se que essas células possuem elevado potencial proliferativo, capacidade de autorrenovação e poder de diferenciação em diversas linhagens celulares (CHADIPIRALLA et al., 2010; GOVINDASAMY et al., 2011; KERKIS et al., 2006; SAKAI et al., 2010). Com isso, pode-se afirmar que essas CT podem servir como modelo para o estudo da diferenciação das CTA *in vitro* e regeneração de tecidos *in vivo* (KERKIS; CAPLAN, 2012).

A polpa de dente é derivada a partir da crista neural, estrutura embrionária transitória, ecto-mesodermal, originada após a migração das CTCN. Constituem uma população de células pluripotentes e migratórias, que exibem um potencial de desenvolvimento similar ao das CTE (LE DOUARIN; DUPIN, 2003, 2004). Apesar da pluripotência da CTCN se tornar mais restrita com o desenvolvimento, a célula homóloga pós-natal mantém a capacidade de autorrenovação (LE DOUARIN; DUPIN, 2008). Assim, a polpa de dente pode ser considerada uma fonte alternativa com características semelhantes às CTCN, já que as CTE possuem um número limitado que podem ser isoladas do embrião (KERKIS; CAPLAN, 2012).

Partindo desse conhecimento, Kerkis et al. em 2006, isolaram CT de dentes decíduos de crianças, com a técnica “explante” do tecido pulpar, em condições similares às usadas no isolamento de CTE. Dessa forma, a partir da polpa de dente humana obtiveram células multipotentes correspondentes a um tipo celular intermediário entre CTE e CTA (JIANG et al., 2002). Essa população foi denominada de Célula Tronco Imatura de Polpa Dentária.

As CTIPDh expressam marcadores de CTE humanas, que são: *Oct-4*, *Nanog*, *SSEA-3 e 4*, *TRA-1-60*, *TRA-1-81* e também expressam marcadores de CTM: *SH2*,

SH3, *SH4*, *CD31* e *CD13*, observados em aproximadamente 97% das células (KERKIS et al., 2008; KERKIS; CAPLAN, 2012).

A descoberta das CTIPDh e sua eficiência é muito importante, pois abrem novas oportunidades para o isolamento de CT com alto potencial de diferenciação. Os dentes decíduos possuem uma vantajosa fonte de fácil acesso, retiradas sem o mínimo de desconforto para o paciente. Por isso, essas células tornaram-se uma fonte atrativa para a medicina regenerativa (KERKIS; CAPLAN, 2012).

3.1.3 Ação Terapêutica das Células Tronco Mesenquimais

No início o conhecimento relacionado ao poder de terapia das CTM baseava-se apenas em seu potencial de regeneração através da autorrenovação celular e sua plasticidade. Porém, atualmente sabe-se que essas células possuem um potencial terapêutico mais amplo (CAPLAN; DENNIS, 2006). Grande parte está atribuída aos efeitos parácrino e autócrino, através da secreção de diversas moléculas bioativas que compreendem uma variedade de citocinas e fatores de crescimento (GNECCHI et al., 2008).

Biologicamente, as CTM secretam citocinas e fatores de crescimento que dão suporte a diferenciação das CTH, baseado na interação entre essas células presentes no estroma medular e CTH através de vias de sinalização, tais como Notch, Tie2 e o eixo CXCL12-CXCR4 (DUNCAN et al., 2005; ZHANG et al., 2003).

Ao secretarem esses fatores de crescimento as CTM fazem com que as células no nicho do próprio tecido (intrínsecas) sejam estimuladas a diferenciar-se ou secretar fatores que estimularão outros nichos celulares. Além disso, essas moléculas bioativas possuem efeitos que caracterizam a ação terapêutica das CTM através de efeitos antiapoptóticos nas células tecido-específico, efeitos imunomodulatórios nas células do sistema imune, efeito anti-inflamatório, realizam o aumento da angiogênese e possuem capacidade quimiotática e de migração para o sítio de inflamação ou lesão tecidual (LINERO; CHAPARRO, 2014; PAREKKADAN, 2010).

Uma das principais características descritas das CTM é a sua capacidade imunomoduladora, marcada pela ausência de expressão da MHC II e moléculas coestimulatórias (B7-1, B7-2, CD40 e CD40-ligante). Dessa forma, essas células não

poderão atuar como apresentadoras de antígenos, e assim, incapazes de ativar o sistema imunológico de hospedeiro (LOTFINEJAD et al., 2014). Uma importante consideração é que sua capacidade imunomodulatória facilita terapias alogênicas devido a ausência da necessidade HLA compatível entre doador e receptor (SALEM; THIERMERMANN, 2010).

O crescente estudo de métodos utilizando CTM vem sendo aprimorado, e o conhecimento existente em relação à sua eficiência e sua facilidade de isolamento e expansão *in vitro* permite o interesse de seu uso em estudos pré-clínicos e clínicos relacionados à medicina regenerativa (KIM et al., 2012). Dessa forma, as CTM tornaram-se uma importante ferramenta terapêutica da medicina regenerativa, garantindo sua atuação no interior de um hospedeiro sem causar rejeição (LOTFINEJAD et al., 2014).

3.1.4 Uso clínico das células tronco mesenquimais

O potencial terapêutico das CTM têm sido descrito ao longo dos anos por sua capacidade de regeneração tecidual, imunomodulatório e anti-inflamatório (GNECCHI et al., 2008). Com isso, existem vários trabalhos em fase de ensaios clínicos que utilizam as CTM como ferramenta para o tratamento de diversas doenças.

A privilegiada propriedade imunomodulatória trouxe para as CTM uma importante ferramenta que pode ser usada nas doenças inflamatórias e autoimunes que foi descrito em diversos grupos ao redor do mundo (GARCIA-CASTRO et al., 2008; SALEM; THIERMERMANN, 2010). Na Universidade de Teerã (Irã) as CTM foram utilizadas para o tratamento de cirrose descompensada e para nefropatia crônica no Hospital General Fuzhou (China) (RODRÍGUEZ et al., 2012; SALEM; THIERMERMANN, 2010).

Outra aplicação das CTM foi como agente imunoprotetor, para evitar a rejeição depois de transplante de órgãos. Foi realizado o co-transplante de CTM juntamente com ilhotas pancreáticas em pacientes diabéticos tipo 1, a fim de proteger as ilhotas transplantadas de danos inflamatórios das células de defesa do próprio paciente (SALEM; THIERMERMANN, 2010). Outra aplicação de CTM foi em

pacientes transplantados renais, a fim de suprimir a rejeição imune do enxerto (RODRÍGUEZ et al., 2012).

As CTM têm sido amplamente utilizadas em associação a transplante alogênico de CTH, devido sua capacidade imunoregulatória em ensaios clínicos para o tratamento da doença do enxerto *versus* hospedeiro (LE BLANK et al., 2008). Até o momento, a doença do enxerto *versus* hospedeiro é a mais propensa a ser tratada pelas CTM, atualmente comercializada para o tratamento dessa doença (ENGLISH et al., 2014; KEBRIAEI, 2011).

Além disso, as CTM foram utilizadas em ensaios clínicos de esclerose múltipla, na Universidade de Cambridge (Inglaterra), e de nefrite lúpica, no Instituto de Transplante de Órgãos (China) (LE BLANK, 2007).

Em 2003 foi descrito o uso de transplante alogênico de CTM em um único paciente com AA severa para contribuição da regeneração do estroma medular (FOUILLARD et al., 2003). E em 2005 foi descrito o uso de CTM para promover a imunossupressão de linfócitos T em pacientes com AA (BACIGALUPO et al., 2005). Porém até o presente não foi realizado ensaio clínico para o tratamento da AA. Esses estudos clínicos reforçam o potencial terapêutico das CTM em vários âmbitos.

3.2 Anemia Aplástica e sua Etiopatogenia

AA é uma doença caracterizada por um quadro de falência medular integral ou parcial, com substituição gordurosa dos elementos celulares e sem nenhum sinal de transformação maligna ou mielodisplásica (BACIGALUPO, 2009; TELES et al., 2002). Ocasionalmente por uma agressão à CTH pluripotente, a AA leva a uma hipocelularidade acentuada na MO, e consequentemente uma pancitopenia de moderada a grave no sangue periférico (MARSH et al., 2009; SCHEINBERG, 2012).

O primeiro estudo sobre a AA foi relatado segundo Paul Ehrlich¹ (1988 apud YOUNG; ALTER, 1994), observando em sua paciente gestante que veio a óbito, uma hipocelularidade na MO com regiões gordurosas, o que caracterizou como AA. Nesta época, a maioria dos pacientes vinha a óbito decorrente de infecções e complicações hemorrágicas em um intervalo de 1 a 2 anos após o diagnóstico.¹ Atualmente a maior

¹ PAUL EHRLICH, (1988 apud YOUNG; ALTER, 1994)

parte dos pacientes aumentam a expectativa de vida após serem precocemente diagnosticados e tratados (MEDEIROS, 2010; SCHEINBERG, 2012).

A incidência é de 2 a 4 pessoas por 1 milhão de habitantes ao ano. Não possui diferença estatística entre os sexos e há maior incidência no Oriente, além disso a maior parte dos casos são adquiridos, alcançando 80%, enquanto a sua forma congênita totaliza apenas 20% (MALUF et al., 2002; MARSH et al., 2009). A maior parte dos casos, cerca de 80%, idiopática porque sua primeira etiologia é desconhecida (MARSH et al., 2009). Historicamente, AA tem sido fortemente associada a exposições a agentes químicos e drogas, dando a essa doença um impacto desproporcional em sua incidência (YOUNG, 2002).

Essa consequência pode ser devido o uso de algumas drogas e agentes químicos (agentes citotóxicos, cloranfenicol, anti-inflamatórios não esteroidais, antiepiléticos, sais de ouro, benzeno), exposições a pesticidas, infecções virais ativas (Epstein Barr, vírus da hepatite, parvovírus, vírus da imunodeficiência humana), neoplasias hematológicas, invasões medulares de neoplasias não hematológicas, doenças sistêmicas, doenças autoimunes e exposições à radiação (GAMAN et al., 2009; PASQUINI, 2000; TELES et al., 2002).

Muitos casos de AA adquirida podem ser fisiopatologicamente caracterizados como uma resposta autoimune mediada por linfócitos T, responsáveis pela destruição órgão específica de células hematopoiéticas da MO (BACIGALUPO et al., 2005; YOUNG, 1997). A associação a diversas possibilidades de causas distintas tem levado a comunidade científica acreditar que são numerosos e diferentes os mecanismos dessa doença (YOUNG, 2002).

A AA leva a fadiga, dispneia e síndromes cardíacas, trombocitopenia e sangramento das mucosas, além de neutropenia que torna o indivíduo mais suscetível a infecções gerais (YOUNG, 2002). A forma de tratamento depende do quadro clínico do paciente, sendo indicado para os casos moderados somente transfusões de concentrado de hemácias e plaquetas e tratamento suporte com antibiótico em casos de infecções (MEDEIROS, 2010). Porém, quando os pacientes são tratados com transfusões e antibióticos apenas, as taxas de sobrevivência são baixas e podendo desencadear uma pancitopenia grave (YOUNG, 2002).

Para os casos graves, as principais intervenções até então são os transplantes de CTH e terapias imunossupressoras, indicada para pacientes mais velhos e que não possuem um doador compatível (DEZERN, 2011; MARSH et al., 2009). Esses pacientes recebem uma combinação de Globulina anti-timócito seguido por Ciclosporina A (GAMAN et al., 2009; SCHEINBERG et al., 2012). Estas drogas apresentam vários efeitos colaterais como: hipertensão; hiperplasia gengival; tremor; nefrotoxicidade, sendo que muitos pacientes não respondem adequadamente as terapias imunossupressoras (PASQUINI, 2000; SANDOZ, 1998).

Já o sucesso do transplante de CTH varia de acordo com os fatores de risco, como o período entre o diagnóstico inicial e o transplante e a presença de infecções, deixando essa opção restrita apenas para pacientes jovens e com HLA compatível com o doador (GAMAN et al., 2009; MEDEIROS, 2010; OLNES et al., 2012).

Ademais, o transplante de CTH ou MO pode desencadear complicações tardias, como rejeição do enxerto e recaída causada por ataque autoimune ressurgente, e mais frequentemente, o desenvolvimento da doença do enxerto *versus* hospedeiro e infecção. Também, o uso prolongado de imunossupressores deixa o paciente mais debilitado e suscetível ao retorno da pancitopenia ou até o desenvolvimento de outras doenças hematológicas (PASQUINI, 2000; YOUNG, 2002). Por isso, as diferentes causas da AA aumentam a complexidade de um diagnóstico etiológico e a incerteza de seu tratamento (LIU, 2015).

3.3 Indução de anemia aplástica em modelo animal

A falência medular é uma síndrome caracterizada pelo drástico declínio funcional da MO, comprometendo sua capacidade de produzir células sanguíneas maduras. Um paradigma da falência medular é a doença AA, a qual os pacientes possuem a MO completamente vazia nos casos severos, neutropenia e trombocitopenia (YOUNG, 2002).

Durante o último século, descobriu-se que os casos de AA e falência medular foram secundários à exposições de produtos químicos tóxicos, drogas, radiação ou infecções virais. De toda forma, a maior parte dos casos são considerados

idiopáticos, o que significa que a causa da doença não pode se identificada (YOUNG, 2005).

Com isso, nos últimos anos experimentos utilizando modelos animais de falência medular adquirida têm ajudado a compreender os mecanismos da causa dessa síndrome, podendo auxiliar no estudo e desenvolvimento de possíveis tratamentos para tais doenças (CHEN, 2005).

3.3.1 Mecanismo dos anti-neoplásicos bussulfano e ciclofosfamida na anemia aplástica

A radioterapia e quimioterapia são modalidades terapêuticas comumente utilizadas no tratamento do câncer. Infelizmente, essas terapias não são tumor-específicas. Por isso, tecidos saudáveis, particularmente a MO estão extremamente vulneráveis à citotoxicidade causada por essas terapias (MAUCH et al., 1995).

Para a realização da quimioterapia são utilizadas drogas anti-neoplásicas. Essas drogas possuem alta toxicidade celular, tornando-as nocivas tanto para as células cancerígenas (células alvo do tratamento), quanto para as células saudáveis do organismo (POLOVICH, 2016).

Alguns anti-neoplásios também podem ser utilizados no condicionamento de transplantes de MO alogênicos, como o bussulfano e a ciclofosfamida (SOCIÉ et al., 2001). Porém, essas drogas são hematotóxicas e podem causar danos a MO quando utilizadas de forma inadequada (CHEN, 2005).

Como forma alternativa, a ciclofosfamida pode ser utilizada como droga imunossupressora no tratamento prévio de pacientes com AA. Porém, existe considerável controvérsia no uso dessa droga, pois apesar de inicialmente melhorar o quadro do paciente com AA, altas doses de ciclofosfamida está relacionada ao surgimento de neutropenias e infecções fúngicas severas (SCHEINBERG et al, 2014).

A mielossupressão é o efeito mais comum da radioterapia e quimioterapia, responsáveis por comprometer a proliferação de progenitores hematopoiéticos e

danificar seus precursores mais maduros. Contudo, a persistência da mielossupressão ou a falência da MO é uma indicação da injúria de CTH, que é relativamente sensível à radiação e a alguns agentes quimioterápicos como bussulfano e ciclofosfamida (MORRISON et al., 1995). Porém, os mecanismos celulares envolvidos na ação dessas drogas que afetam às CTH ainda não foram bem estabelecidas (MENG et al., 2003).

Existe uma evidência indireta que sugere que agentes quimioterápicos podem danificar as CTH pela apoptose. Essas drogas são potentes indutores da apoptose numa grande variedade celular, incluindo células hematopoiéticas normais e malignas (HARMS-RINGDAHL et al., 1996). Ainda, foi relatado que a incubação de células mielóides e linfóides de paciente leucêmico, com bussulfano provocou a indução de apoptose dessas células (HASSAN et al., 2001).

O dano da MO não deve estar limitado apenas a indução da apoptose causada pelos agentes quimioterápicos. Pois, a exposição tanto à radiação quanto às drogas neoplásicas pode causar deleção clonogênica nas células por indução de senescência prematura (SERRANO; BLASCO, 2001). Com isso, tanto a indução da apoptose quanto a senescência prematura pode resultar na inibição da função hematopoiética da MO (MENG et al., 2003).

3.3.2 Mecanismo da radiação iônica na anemia aplástica

A exposição à radiação iônica afeta órgãos e múltiplos sistemas, principalmente a MO (DAINIAK et al., 2002). Por serem altamente sensíveis à radiação as células formadoras de sangue ao serem expostas poderão ter alto dano, causando efeito destrutivo no sangue periférico (GRAMMATICOS et al., 2012; METTLER et al., 2002; ZHANG et al., 2015).

Dependendo do nível de radiação exposta, severa hipoplasia ou aplasia medular pode ser adquirida através da interrupção do ciclo celular das células hematopoiéticas, que sempre estão em alta taxa de divisão celular, pela necessidade constante da produção de células no sangue periférico (SOCIÉ et al., 2001). A radiação também induz a mielossupressão através do aumento da

apoptose dos elementos hematopoiéticos, gerando uma regressão celular da MO (KOPP et al., 2005).

Tendo em vista os danos causados na MO, trabalhos utilizam com frequência a radiação como forma de indução de mielossupressão, para ensaios em modelos animais. Grande parte dos trabalhos descritos irradiaram animais a 4 Gy, dose considerada moderada, pois doses a partir de 7 Gy foram consideradas letais, impedindo a continuidade dos estudos (KOPP et al., 2005; VIEIRA, 2007; YE et al., 2010; ZHANG et al., 2015).

Além da pesquisa, o processo de irradiação também é usado comumente como fonte de destruição medular antes da realização de transplantes medulares em doenças hematológicas, tornando-se uma importante ferramenta na ablação da MO antes de transplantes (ISHIDA et al., 2015).

3.4 Células Tronco Mesenquimais na terapêutica da Anemia Aplástica

Atualmente uma das formas de tratamento da AA nos casos mais severos é através do transplante de CTH, sendo essa até então a opção terapêutica mais eficiente. Porém, apesar dessa eficiência, a terapia com CTH necessita de diversos requisitos, como a necessidade de compatibilidade entre o doador e receptor, a idade do receptor, ou seja, o transplante é indicado apenas para pacientes jovens. No caso de pacientes mais velhos, a única opção de tratamento é via administração de imunossupressores, acompanhada por fatores de manutenção da através de transfusões e controle de infecções em geral. Além da questão da idade, a opção de transplante só poderá ser aceita quando houver um doador com o HLA compatível (GAMAN et al., 2009; SCHEINBERG, 2012).

As CTH são responsáveis pela produção de todas as células sanguíneas. Essas células são precursoras da hematopoiese, que é o processo de produção e maturação de glóbulos brancos e vermelhos. Além disso, na MO há a presença de CTM, que é a célula responsável pela formação do estroma medular e pela produção de vários fatores de crescimento indispensáveis para hematopoese. (BYDLOWSKI, 2009; OLNES et al., 2012; SCHEINBERG, 2012).

O ambiente hematopoiético da MO é responsável pela homeostase da hematopoiese pela produção e secreção de citocinas e moléculas responsáveis pela produção de células sanguíneas. Dentre esses componentes essenciais estão as CTM, que fornecem suporte no estroma medular para o crescimento e diferenciação das CTH em contribuição para a hematopoiese (BYDLOWSKI, 2009; SCHEINBERG, 2012).

Com base nesse conhecimento, é possível afirmar que a CTM possui um papel fundamental no auxílio da hematopoiese. E assim, pode-se dizer que a ausência de CTH e do estroma medular causada pela AA pode ser suprida através da terapia regenerativa com CTM, a fim de promover estímulos dessas células em CTH para o funcionamento adequado da hematopoiese de pacientes com AA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan. Processo número 01201/14.

4.1 Modelo experimental

Para indução da AA crônica primeiramente foi adotado um método químico, utilizando ciclofosfamida (Genuxal®) Baxter® (Baxter Oncology GmbH., Halle, Westfalen, Alemanha) (Grupo A). A metodologia consistiu na aplicação de oito doses de 5 mg/kg de ciclofosfamida durante 23 dias (cada 3 dias) via intraperitoneal (GIBSON et al., 2003). Foram utilizados um total de 10 camundongos isogênicos fêmeas da linhagem C57 black/6 de 4 semanas.

Figura 1- Fluxograma da indução do modelo de AA com ciclofosfamida [5 mg/kg]. Em um período de 23 dias os animais receberam a ciclofosfamida para a indução da aplasia medular. A partir do 112º dia esperou-se que os camundongos apresentassem a MO deprimida (aplásica). Para o acompanhamento do quadro evolutivo da doença foram realizadas coletas sanguíneas e análise dos eritrócitos tanto antes da aplicação de ciclofosfamida, quanto em 23, 112 e 130 dias após a administração. Em 130 dias após a administração da ciclofosfamida foi realizada a eutanásia e coleta da MO. Legenda: Período: 0 – 130 dias. I-G=Indução de Genuxal ®; SG=Coleta de Sangue; AA=Anemia Aplástica Crônica; E+CT=Eutanásia seguida de coleta de tecido medular.

O procedimento foi repetido em dois grupos de 5 animais cada, onde foram realizados hemogramas antes, durante e depois período de indução por

ciclofosfamida. Para confirmação da aplasia da MO, também foram realizadas histologia da MO e esfregaço medular.

Em adição aos quimioterápicos bussulfano e ciclofosfamida como alternativa de indução química de AA em modelo animal, a irradiação pode também causar destruição em células tronco hematopoiéticas e seus progenitores (COHEN-JONATHAN et al., 1999). Com base no trabalho de Vieira (2007) e sua colaboração nesse projeto em parceria com o Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN/CNEN-SP), foi determinado um novo protocolo para a criação do modelo crônico de AA através da irradiação.

Assim, foram utilizados 46 camundongos isogênicos fêmeas da linhagem C57 black/6, com 4 semanas de idade que receberam irradiação de corpo inteiro, realizados numa fonte panorâmica de radiação contendo Cobalto 60, com taxa média 11,60 Kg y/h e a 40 cm de distância da fonte. A dose utilizada foi de 6 Gy, pois é considerada entre moderada a severa. O tempo de exposição dos animais na câmara de irradiação foi de 31 minutos.

Para a realização deste protocolo experimental foi necessária a imobilização individual de cada camundongo. Para isto, os camundongos foram contidos em mini-câmaras ventiladas de PVC.

As cápsulas foram construídas a partir de tubos para condução de água fria em instalações hidráulicas domésticas com dimensões de 6 cm de comprimento e 1/2 polegada de diâmetro com orifícios para possibilitar a respiração dos animais durante a irradiação. Os tubos foram fechados com tampas apropriadas adquiridas comercialmente (VIEIRA, 2007). Após o período de 48 horas os animais apresentaram a MO deprimida e a partir deste período realizamos o transplante das CTIPDh.

Figura 2 - Fotografia do posicionamento dos animais na fonte panorâmica de radiação (IPEN) para a irradiação e mini-câmaras ventiladas de PVC para a contenção dos animais.

Em cada gaiola foram acondicionado três animais, sendo comida e água servida *ad libitum*. A temperatura foi mantida a 19–22 °C com ciclos claros e luz de 12 horas.

4.2 Terapia Celular

Observação: Para o transplante celular foram utilizados somente os animais induzidos ao protocolo de irradiação, pois o uso de ciclofosfamida não foi eficaz na indução de AA nas condições utilizadas neste estudo.

Os camundongos irradiados (Grupo B) após 48 horas da irradiação foram divididos em 2 grupos:

- Grupo tratado com CTIPDh: Animais irradiados + transplante com as CTIPDh via intraperitoneal utilizando 1×10^6 células. N= 20 animais;

- Grupo não tratado com CTIPDh: Animais irradiados + solução de PBS.
N= 20 animais.

Os animais receberam o primeiro transplante de 1×10^6 CTIPDh após 48 horas do processo de irradiação, o segundo foi realizado 15 dias após o primeiro transplante e o terceiro 15 dias após o segundo transplante, totalizando 3 transplantes celulares (figura 3).

Figura 3 – Fluxograma da terapia celular proposta neste estudo. A ordem cronológica da terapia celular desse estudo é proposto por: Pré-irradiação (D0) seguido do processo de irradiação, 48 horas após a irradiação os animais receberam o primeiro transplante com CTIPDh, o segundo foi realizado 15 dias após o primeiro transplante (D17), o terceiro 15 dias após o segundo transplante (D32) e a eutanásia em 30 dias após o último transplante (D62). As coletas de sangue foram realizadas em D0, D2, D17, D32 e D62. Em D62 (eutanásia) também foram coletados o baço e a MO para análise.

Foi determinado o transplante via IP, tendo em vista que grande parte dos ensaios clínicos com modelos animais utilizam apenas a via endovenosa para a aplicação de células. Porém, ao mesmo tempo existe o interesse do transplante via IP, que foi previamente demonstrado que CTM foram capazes de alcançar pulmões após a injeção via IP (BAZHANOV et al., 2016; GAO et al., 2001).

A injeção via IP ocasiona uma rápida agregação celular e o agregado alcança o mesentério, omento e outros sítios da cavidade peritoneal. Essa agregação celular pode limitar o acesso ao sistema circulatório, tornando número de células capazes de atingir a circulação limitada (BAZHANOV et al., 2016).

Porém, uma grande vantagem da utilização da via IP se dá pela possibilidade de administração de um grande número de células, o que pode recuperar a limitação

celular da agregação. Além disso, o peritônio é capaz de alta absorção devido sua alta vascularização (BAZHANOV et al., 2016).

Para o transplante IP, 1×10^6 CTIPDh foram ressuspensas em 100 μ L de solução fisiológica e posteriormente injetadas na cavidade abdominal inferior (com auxílio de uma seringa de insulina). Os animais foram acompanhados por 30 dias após a data do último transplante celular. Nesta data os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ para coleta dos ossos longos (fêmur e úmero) e do baço.

Os hemogramas foram realizados nos seguintes momentos: antes da irradiação (D0), após a irradiação (D2) e 15 dias após cada transplante celular (D17), (D32) e 30 dias após o último transplante (D62) (figura 3).

O controle da massa corpórea dos animais foi realizado no mesmo intervalo cronológico.

Além disso, foram separados 6 animais que não sofreram irradiação para o controle do estudo, e mais 6 animais que sofreram irradiação e foram eutanasiados 48 horas após a irradiação a fim de comprovação da eficiência da radiação como modelo de indução de AA.

- Grupo Controle: Animais não irradiados (normais) N= 6 animais;
- Grupo Irradiado: Animais irradiados e eutanasiados 48h após a irradiação, N= 6 animais.

Também, foi realizado o estudo com um grupo a longo prazo (*“long time”*). Nesse grupo, uma parcela de animais experimentais (n=10) foram eutanasiados após o período proposto neste estudo (D62). Esses animais permaneceram um período de 6 meses após D62.

- Grupo 6 meses pós-D62 Tratado (irradiado+tratado com CTIPDh+6 meses), N = 5 animais;
- Grupo 6 meses pós-D62 Não Tratado (irradiado+ sem tratamento+6 meses), N = 5 animais.

4.3 Células tronco (CTIPDh)

As CTIPDh utilizadas neste estudo foram previamente estabelecidas pelo grupo da Dra. Irina Kerkis e armazenadas a -196 °C no Banco de Células Tronco do Laboratório de Genética do Instituto Butantan (KERKIS et al., 2006; LIZIER et al., 2012). Essas células foram isoladas de dentes decíduos de crianças entre 6 e 12 anos e cultivadas até a passagem 5, seguindo o protocolo de expressão de marcadores de CT bem como o potencial de diferenciação *in vitro* determinado pela Sociedade Internacional de Terapia Celular e Células Tronco Mesenquimais (DOMINICI et al., 2006). Seguindo este protocolo as células foram criopreservadas na concentração de 1×10^6 , para posterior realização do transplante celular, por um período de 3-6 meses até o seu uso.

Para a terapia celular os criotubos contendo CTIPDh foram descongelados em banho-maria a 37 °C e ressuspensas em meio de cultivo basal composto por 15% de soro fetal bovino (HyClone, Logan, UT – USA) e 82% de DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagles Medium – Gibco, Grand Island – NY – USA), suplementado com 1% de penicilina e estreptomicina (Gibco), 1% de L-glutamina 200mM (Gibco) e 1% de aminoácidos não essenciais (ANE – Gibco), seguido de centrifugação a 2000 RPM por 5 minutos. Descartando o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 4 mL solução PBS pré-aquecido a 37 °C (este procedimento foi repetido duas vezes). Após a lavagem as células foram ressuspensas em 100 µL de solução fisiológica, e assim, foram transfundidas nos animais.

4.4 Hemograma

Foi realizada a coleta de sangue utilizando o tubo BD Vacutainer® (BD Diagnostics, São Paulo, SP., Brasil) 250-500 µL com EDTA K2 para preservar a morfologia celular. Após a coleta foi realizada a contagem dos elementos celulares utilizando o analisador hematológico automatizado mindray BC-2800Vet®, fornecido pelo Laboratório de Fisiopatologia do Instituto Butantan.

Foram realizadas análises morfológicas através de esfregaços sanguíneos corados com o corante Panótico Instant Prov NewProv® (NewProv – Produtos para Laboratório, Pinhais, PR., Brasil) e também utilizando o microscópio Nikon DS-Ri1 fornecido pelo Laboratório de Genética do Instituto Butantan. Além disso, foi realizada a avaliação do quadro clínico dos animais durante todo o experimento, somando e complementando os dados obtidos pelo contador automático.

Tabela 1 - Valores de referência estabelecidos de hemograma completo (série vermelha, branca e plaquetária) para a espécie de camundongos de todas as linhagens (WEISS; WARDROP, 2010).

<u>Valores de Referência Hemograma (Camundongo)</u>	
Série Vermelha	Eosin – 0-7%
RCB – 7-11 X10 ⁶ /μL	Baso – 0-1%
HCT – 40—50%	Série Plaquetária
HGB – 10-17 g/dL	PLT – 900-1600 X10 ³ /μL
MCV – 45-55 fL	
MCH – 13-17 pg	
MCHC – 30-38 g/dL	
Série Branca	
WBC – 2-10 X10 ³ /μL	
Linf – 70-80%	
Gran – 20-30%	
Mon – 0-2%	

4.5 Coleta do Aspirado Medular

O aspirado medular foi coletado dos ossos fêmur e úmero após a eutanásia dos animais. Para realizar esse procedimento o osso foi dissecado e as epífises proximais removidas, e com auxílio de seringa (1 mL) e agulha (13x4,5 – 26G ½ BD®), o conteúdo medular foi coletado. Após a coleta do aspirado medular, foi realizada contagem absoluta das células em câmara de Newbauer, e alíquotas das

amostras da MO foram utilizadas para os ensaios de UFC, citometria de fluxo e esfregaço da MO, de acordo com cada protocolo.

4.6 Ensaio Unidade Formadora de Colônia (UFC)

As células derivadas do aspirado da MO dos animais foram submetidas ao ensaio de UFC a fim de comparar a capacidade de clonogenicidade das células de MO dos camundongos do grupo tratado com CTIPDh e do grupo não tratado. As células foram contadas em câmara de Neubauer e aquelas viáveis foram plaqueadas em triplicata na quantidade 4×10^5 em placa de cultivo celular de 33 mm de diâmetro TPP® (Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Suíça) com meio de cultura DMEM-Low Glucose Gibco™ (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA) contendo 10% de Soro Fetal Bovino 1% de aminoácidos não essenciais, 1% de L-Glutamina e 1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) Invitrogen™ (Invitrogen Corporation Carlsbad, Califórnia, EUA), mantidos em ambiente umificado a 37 °C em 5% de CO₂. As células foram mantidas por 21 dias com o meio de cultivo trocado a cada três dias. Após 21 dias, as células foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% por 24 horas. Em seguida as células foram desidratadas em uma bateria de álcoois 100%, 95%, 80% e 50% durante 3 minutos cada, lavadas com água destilada e em seguida, coradas com cristal de violeta 1% Merck® (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) por 10 minutos para contagem das colônias formadas.

4.7 Citometria de Fluxo

A técnica foi utilizada para quantificar as populações celulares da MO entre os grupos experimentais do presente projeto. Foram dedicadas alíquotas de 1×10^6 de células do aspirado de MO previamente fixadas a 0,1% de paraformaldeído por 20 minutos para cada anticorpo, que foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos. A seguir foi adicionado Triton X-100 a 0,1% Sigma® (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA) por 20 minutos nas alíquotas que necessitavam de

permeabilização celular. As células foram novamente centrifugadas com PBS por 5 minutos a 2000 RPM. Em seguida, as células foram incubadas com solução de BSA a 5% (Sigma[®]) para bloquear ligações inespecíficas (por 30 minutos). Posteriormente, as células foram lavadas 1x com PBS por 5 minutos e incubadas com os anticorpos primários descritos na tabela 2 (apêndice A) *overnight*. Depois, as células foram lavadas 1x com PBS por 5 minutos para a retirada do anticorpo primário, e incubadas com os anticorpos secundários descritos na tabela 3 (apêndice B) por 1 hora. Por fim, as amostras foram lavadas mais uma vez por 5 minutos. O Sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 100 µL de PBS e as células foram lidas e analisadas pelo aparelho BD Accuri[®] c6 Flow Cytometer fornecido pelo Laboratório de Genética do Instituto Butantan. Em seguida, o resultado obtido foi analisado pelo *software* FlowJo V.10.1 (TREESTAR; FLOWJO, 2015).

4.8 Coleta do tecido medular e baço

Após a eutanásia dos animais foram realizadas as coletas do tecido medular e do baço para realizar as análises histológicas e de imunohistoquímicas, para isto as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 10% (Sigma[®]).

4.8.1 Descalcificação

Depois de fixados, os ossos foram descalcificados utilizando a solução adotada por Junqueira e Carneiro (2004), pois possui ação mais lenta e com isso agride menos o tecido. A fórmula contém 5,5 g de EDTA (Sigma[®]), 10 mL de Formol (Sigma[®]) e 90 mL de água destilada. O material foi coberto com a solução em no mínimo 40 vezes seu volume com trocas a cada 3 dias, durante 2 semanas.

4.8.2 Histoquímica

As lâminas de histologia convencional foram coradas pelo método da hematoxilina-eosina (Merck[®]) para avaliar os danos dos tecidos medular e do baço.

Para a realização da técnica de hematoxilina-eosina, as amostras foram previamente lavadas em água corrente, processadas e incluídas em parafina (Sigma®), em seguida foram realizados cortes histológicos de 4 micrômetros em lâminas sinalizadas. As lâminas passaram então pelo processo de desparafinização com Xilol I por 20 minutos e Xilol II por 20 minutos a temperatura ambiente. Depois foi realizada a etapa de hidratação, que consiste na utilização inicialmente de álcool absoluto por 2 minutos e de álcool etílico nas concentrações 95%, 80% e 70% durante 2 minutos cada. Em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada, e então submersas em Hematoxilina de Harris (Merck®) durante 2 minutos procedendo a lavagem em água corrente por 15 segundos e lavagem em água destilada. As lâminas então sofreram um processo de desidratação com álcool etílico nas concentrações de 50%, 80%, 95% durante 2 minutos cada. Logo após foram submersas na eosina por 30 segundos, seguidas de álcool I 95% e álcool II 95% por 2 minutos cada, e pela bateria de álcoois absoluto I, II e III. Após, as lâminas foram diafanizadas com Xilol I, II e III por 2 minutos cada. Para a finalização, as lâminas foram seladas com Permount *Mounting Medium* (VWR Laboratories, Radnor, Pensilvânia, EUA) e visualizadas com auxílio do microscópio óptico Nikon DS-Ri1 fornecido pelo Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

4.8.3 Imunohistoquímica

A técnica foi utilizada para avaliar os nichos estromais e hematopoiéticos através da análise da população celular da MO e rastrear as CTIPDh em cortes histológicos da MO e do baço.

Para a realização da técnica de imunohistoquímica, as amostras fixadas em paraformaldeído a 10% foram previamente lavadas em água corrente, processadas e incluídas em parafina, em seguida foram realizados cortes histológicos em lâminas silanizadas. As lâminas passaram então pelo processo de desparafinização com Xilol I por 20 minutos e Xilol II por 20 minutos a temperatura ambiente. Depois foi realizada a etapa de hidratação, que consiste na utilização de álcool etílico nas concentrações 100% e 95% durante 4 minutos cada.

Em seguida, as lâminas foram então submersas em Hidróxido de Amônia (10% em álcool etílico 95%) por 10 minutos, seguidas de quatro lavagens com água destilada por 5 minutos. As lâminas foram submetidas à recuperação antigênica em tampão citrato por 5 minutos a 95 °C em panela de pressão, seguidas de 3 lavagens em água destilada por 5 minutos. Foram realizados dois banhos de 10 minutos cada em peróxido de hidrogênio 6% metanol na proporção 1:1, para o bloqueio da peroxidase endógena, seguido de duas lavagens de água destilada por 5 minutos.

Após essa etapa as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários descritos na tabela 2 (apêndice A), em câmara úmida *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos. Então, os anticorpos secundários descritos na tabela 3 (apêndice B) foram incubados por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Após, foram realizadas duas lavagens com PBS por 5 minutos para a retirada do anticorpo secundário e foi pipetado 100 µL de cromógeno (DAB Kit) Zymed® (Zymed Laboratories, São Francisco, Califórnia, EUA) nos cortes de 3 a 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos. Foram então submersas em Hematoxilina de Mayer (Merck®) durante 1 minuto e procedeu a lavagem em água corrente por 15 segundos e lavagem em água destilada por 5 minutos. As lâminas então sofreram um processo de desidratação em bateria ascendente de álcool etílico nas concentrações de 50%, 80%, 95% durante 2 minutos cada, e 100% durante 6 minutos. Após, as lâminas foram diafanizadas com Xilol I, II e III por 2 minutos cada. Para a finalização, as lâminas foram seladas com Permount *Mounting Medium* e visualizadas com auxílio do microscópio óptico Nikon DS-Ri1 do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

4.9 Imunocitofluorescência

A técnica foi utilizada para avaliar os nichos estromais e hematopoiéticos através da análise da população celular da MO pela técnica de imunocitofluorescência.

As células da MO cresceram sob lamínulas de vidro na concentração de 2×10^4 e após atingirem a confluência de 50-60% foram fixadas em solução de paraformaldeído a 4% (Sigma®). Para retirar o paraformaldeído as células foram lavadas 2 vezes com solução PBS por 5 minutos, seguida da adição de Triton 0,1% (Sigma®) por 20 minutos, para permeabilizar a membrana celular. Depois, as células foram lavadas 2 vezes com solução de PBS por 5 minutos e adicionado BSA a 5% (Sigma®) por 40 minutos. Com isso, foram adicionados anticorpos primários descritos na tabela 2 (apêndice A), os quais foram incubados a 4 °C *overnight*.

Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com solução PBS por 5 minutos para a retirada de anticorpos primários. Depois, foram adicionados os anticorpos secundários descritos na tabela 3 (apêndice B) por uma hora a temperatura ambiente. As lamínulas foram retiradas das placas de cultivo e lavadas com kit *vectashield* com DAPI Vector® (Vector Laboratories, Ltd., Burlingame, Califórnia, EUA) para a análise no microscópio de fluorescência NIKON DS-Ri1 (com luz de excitação a lâmpada HBO para o fluorocromo DAPI, laser de excitação 488 nm para FITC) do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

4.10 Centrifugação para citologia (Cytospin)

Foram separadas alíquotas de aspirado medular na concentração de 5×10^4 de células. As amostras foram fixadas a 4% de paraformaldeído (Sigma®) por 24 horas. Depois, foram lavadas 1x com PBS e centrifugadas a 2000 RPM por 5 minutos. Em seguida foram descartados os sobrenadantes e o *pellet* das amostras foi ressuspendido em 300 µL de BSA 5% (Sigma®).

Posteriormente, foram montadas lâminas silanizadas no aparelho de cytospin e pipetados 300 µL de amostra. Então, foram centrifugadas a 2000 RPM por 5 minutos na centrífuga especializada Thermo Shandon Cytospin® 4 do Laboratório de ImunoGenética do Instituto Butantan.

4.10.1 Imunocitoquímica

A técnica foi utilizada para avaliar os nichos estromais e hematopoiéticos através da análise da população celular da MO pela técnica de imunocitoquímica.

As lâminas na concentração de 5×10^4 de células da MO (concentradas previamente através da técnica de citospin) foram lavadas duas vezes com PBS por 5 minutos. A seguir foi adicionado Triton X-100 a 0,1% (Sigma[®]) por 20 minutos nas alíquotas que necessitavam de permeabilização celular. As células foram novamente lavadas com PBS por 5 minutos. Após, as células foram incubadas com solução de BSA a 5% (Sigma[®]) para bloquear ligações inespecíficas (por 40 minutos). Em seguida, as amostras foram lavadas 1x com PBS por 5 minutos e incubadas com os anticorpos primários descritos na tabela 2 (apêndice A), *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em PBS por 5 minutos. Então, os anticorpos secundários descritos na tabela 3 (apêndice B) foram incubados por 1 hora em câmara úmida e temperatura ambiente. Após, foram realizadas duas lavagens com PBS por 5 minutos para a retirada do anticorpo secundário e foi pipetado 100 µL de cromógeno (DAB Kit, Zymed Laboratories[®]) nas lâminas de 3 a 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos. Foram então submersas em Hematoxilina de Mayer (Merck[®]) durante 1 minuto e procedeu a lavagem em água corrente por 15 segundos e lavagem em água destilada por 5 minutos. Para a finalização, as lâminas foram fechadas com meio de montagem aquoso Abcam[®] (Abcam Plc., Cambridge, Reino Unido) e esmalte, e visualizadas com auxílio do microscópio óptico Nikon DS-Ri1 do Laboratório de Genética do Instituto Butantan.

4.11 Análise dos resultados

Após a realização dos experimentos foi realizada a análise estatística dos resultados pelos testes *one way* (ANOVA), *two way* (ANOVA) e Kaplan-Meier (curva de sobrevivência), com auxílio do *software* GraphPad Prism 5.0 (GRAPHPAD; PRISM, 2007) para a confecção dos gráficos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi estabelecido a descrição dos resultados e a discussão de forma conjunta.

5.1 Caracterização imunofenotípica das CTIPDh

Para o desenvolvimento deste projeto utilizamos CTIPDh do banco de células do Laboratório de Genética do Instituto Butantan nas passagens P4 e P5. Para confirmar as características imunofenotípicas previamente descritas (KERKIS et al., 2006; LIZIER et al., 2012), antes de iniciar o estudo foi verificado se as CTIPDh preservaram a expressão dos principais marcadores de CT.

Para isto foi realizado o ensaio de imunocitofluorescência com os anticorpos de CTMs: o anticorpo de superfície de membrana celular CD90 (característico para CTM) e os anticorpos de filamento intermediário Fibronectina (marcador de estroma celular), Nestina (marcador de células progenitoras neurais) e Vimentina (marcador de células mesenquimais e fibroblastos).

Todos os marcadores utilizados foram imunopositivos nas CTIPDh. A imunolocalização do anticorpo CD90 ocorreu na membrana celular marcado em verde por FITC (seta branca), (figura 4 A). Enquanto que imunopositividade para os anticorpos de filamento intermediários: fibronectina, nestina e vimentina foi evidenciada no citoplasma da célula (seta branca), e também foram marcadas em verde por FITC (figura 4 B-D).

Figura 4 - Fotomicrografia de imunocitofluorescência de CTIPDh para os anticorpos CD90, Fibronectina, Nestina e Vimentina. Demonstra-se imunopositividade para os anticorpos CD90 (A), Fibronectina (B), Nestina (C) e Vimentina (D), respectivamente. Além disso, as figuras de A-D possuem morfologia semelhante a fibroblastos. Seta branca= Regiões imunopositivas. Núcleo corado com DAPI (azul). Anticorpo secundário conjugado com FITC (verde).

Essa caracterização imunofenotípica das CTIPDh realizada nesse estudo demonstrou a semelhança já estabelecida na literatura para tais células (KERKIS et al., 2006; LIZIER et al., 2012). Determinando o lote apto para a terapia celular utilizada nos animais do estudo em questão.

5.2 Indução química da anemia aplástica com ciclofosfamida (Grupo A)

Para a indução da AA com ciclofosfamida, foi utilizado o protocolo previamente estabelecido (GIBSON et al. 2003). Segundo esse protocolo no 112º dia (D112), após a oitava dose de ciclofosfamida os animais tratados apresentavam sinais hematimétricos e histopatológicos da AA. Neste caso, os camundongos deveriam apresentar sinais laboratoriais compatíveis com a AA, que são a redução dos índices hematimétricos e hipoplasia/aplasia dos componentes medulares observada na biopsia medular (MARSH et al., 2009; SCHEINBERG, 2012). No entanto, ao utilizar este protocolo não obtivemos estes resultados.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que os dados hematológicos não exibiram redução significativa nos valores de eritrócitos desde o início da indução com a ciclofosfamida, até 130º dia após o término da administração da droga. Todos os camundongos que receberam a ciclofosfamida demonstraram valores de eritrócitos acima de $10 \times 10^6/\mu\text{L}$ (figura 3), que está dentro do valor de referência de camundongos normais (7 a $11 \times 10^6/\mu\text{L}$) (tabela 1) (WEISS; WARDROP, 2010). Além disso, a contagem de hemácias no sangue periférico até o momento de eutanásia estava dentro do valor de referência da espécie (7 a $11 \times 10^6/\mu\text{L}$) (figura 5) (WEISS; WARDROP, 2010).

Dados esses que foram diferentes aos apresentados no trabalho descrito (GIBSON et al. 2003). Os autores demonstraram que 91 e 112 após a administração de ciclofosfamida houve depressão de eritrócitos, leucócitos, plaquetas e reticulócitos no sangue periférico significativa, além de redução de celularidade na MO.

Avaliação Eritrócitos – Grupo Ciclofosfamida

Figura 5 -Gráfico de avaliação de eritrócitos do grupo ciclofosfamida ($\times 10^6 \mu\text{L}$) em função dos dias de indução (D0, D23, D112 e D130). Analisado pelo *software* GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007). Significância $P < 0.05$. Demonstramos ausência na diferença nos valores de eritrócitos do dia 0 ao 130º dia, mantendo-se valores de referência (7 a $11 \times 10^6 \mu\text{L}$) (tabela 1).

Realizamos as análises das lâminas de esfregaço sanguíneo dos camundongos após o tratamento com ciclofosfamida, que encontraram-se normais e sem variação na morfologia das células e semelhantes aos camundongos normais. Pode-se observar em todas as lâminas a presença de glóbulos brancos variados e glóbulos vermelhos (figura 6). Foi possível visualizar as células nos maiores aumentos (1000 x), sem alterações morfológicas. Os achados morfológicos obtidos neste projeto indicam que não houve redução na linhagem eritrócítica, granulócítica e megacariocítica após o tratamento com a droga ciclofosfamida.

Figura 6 -Fotomicrografia do esfregaço sanguíneo do grupo A antes e após a indução com a ciclofosfamida, representados por D0 (pré-ciclofosfamida, D23 (23 dias pós-ciclofosfamida, D112 (112 dias pós-ciclofosfamida) e o D130 (130 dias pós-ciclofosfamida). As figuras demonstram ausência de redução periférica de hemácias e leucócitos até o momento da eutanásia (D130 – 130 dias após a última dose administrada de ciclofosfamida).

Para somar aos achados hematimétricos foi investigada a celularidade da MO através do esfregaço medular e histologia. Os esfregaços da MO demonstraram uma celularidade medular concentrada, com precursores hematopoiéticos, presença de megacariócitos e morfologia padrão em alta concentração (figura 7). Corroborando o esfregaço medular aos resultados hematimétricos encontrados no sangue periférico.

A análise histológica mostrou discreta degeneração do tecido medular, porém não foi encontrada permutação de adipócitos. Com isso, não podemos afirmar um quadro de AA, caracterizada pela substituição gordurosa do tecido, que impede a repopulação da MO.

Figura 7 - Fotomicrografias dos esfregaços medular dos camundongos após 130 dias de indução com ciclofosfamida, coradas com kit panótico rápido. As setas pretas apontam megacariócitos e asteriscos (*) precursores mielóides em b e c. As imagens também indicam presença de leucócitos e linfócitos em variados graus de maturação (setas vermelhas). A=200 x , B=400 x, C=1000 x.

Os cortes histológicos da MO demonstraram uma discreta redução na celularidade (figura 8), que não é compatível com o quadro de AA. Os achados característicos da AA como falta de elementos hematopoiéticos, com substituição de tecido adiposo (MO amarela) e a infiltração de hemácias (YOUNG, 2002), não foi encontrado nos animais do grupo tratado com ciclofosfamida neste estudo.

Figura 8 - Fotomicrografias da MO dos camundongos tratados com ciclofosfamida após eutanásia. Coloração de hematoxilina e eosina. Cortes aumentos nos aumentos 40x (A), 100 x (B), 200 x (C) e 100 x (D). Demonstramos o pequeno decréscimo na população celular e a presença de celularidade como leucócitos (seta preta) e megariócitos (seta vermelha).

Outro parâmetro avaliado foi a massa corpórea dos animais durante o tratamento com ciclofosfamida. Os animais foram avaliados quinzenalmente desde a primeira administração da ciclofosfamida até o momento da eutanásia (130º dia), totalizando 8 pesagens. A análise estatística demonstrou que a massa corpórea dos animais tratados com ciclofosfamida foi estável durante o período de estudo (figura 9).

Avaliação da Massa Corpórea do Grupo A

Figura 9 - Gráfico de avaliação da massa corpórea dos animais tratados com ciclofosfamida em gramas (grupo A) em função do tempo de indução (pesados a cada 15 dias). O gráfico demonstrou ausência de variação da massa corpórea durante o estudo. Gráfico gerado pelo *software* GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

A ciclofosfamida, por ser agente citotóxico, pode afetar a MO devido sua divisão celular constante resultando em um quadro de AA (SOCIÉ et al., 2001).

Porém, a ciclofosfamida não foi competente em induzir a AA no modelo testado. Uma vez que existe uma contradição no uso dessa droga, pois ela pode ser utilizada para o próprio tratamento da AA, como uma alternativa imunossupressora em casos de AA severo (DE LATOUR, 2014).

Além disso, faz-se necessário a combinação de outras droga imunossupressoras no tratamento de AA, como por exemplo a Ciclosporina A (DE LATOUR, 2014). Logo, a ciclofosfamida utilizada sozinha pode não ser capaz de realizar a imunossupressão necessária no tratamento de AA. A partir dessa informação pode-se possivelmente explicar o motivo da incapacidade de indução de AA em modelo animal por essa via química apesar de relatada por outros grupos.

5.3 Indução da aplasia utilizando radiação ionizante (Grupo B)

Desta forma, fez-se necessária uma nova alternativa para obtenção do modelo animal para o estudo proposto neste projeto.

5.3.1 Curva de Sobrevivência

Todos os animais foram acompanhados desde o momento em que receberam a irradiação (6 Gy), até a eutanásia (por 62 dias). Após a irradiação um animal do grupo não tratado (irradiação + solução salina) veio a óbito, enquanto que nenhum óbito foi reportado nos animais do grupo tratado com CTIPDh (irradiação + transplante com CTIPDh). A análise estatística demonstrou que a sobrevida dos animais tratados com CTIPDh foi de 100% enquanto que os animais do grupo não tratado foi de 97,059% (figura 10).

Figura 10 - Curva de Kaplan-Meier para o estudo dos dados de sobrevivência dos animais submetidos a irradiação tratados ou não com CTIPDh expressos em porcentagem ao longo do período (62 dias). Os animais tratados com CTIPDh tiveram 100% de sobrevivência enquanto os animais não tratados com CTIPDh tiveram uma sobrevivência de 97,059%. Grafico gerado pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Este resultado demonstra que a CTIPDh promoveu o aumento da porcentagem de sobreviv

iventes em relação aos animais somente irradiados. A ação das CTM como um efeito na sobrevivência de animais irradiados foi previamente demonstrado por Hu et al. (2010). Os autores utilizaram uma dose mais alta (8 Gy) do que utilizado no nosso estudo, sendo que todos os animais não tratados com CTM vieram a óbito enquanto que 30% dos animais tratados com CTM sobreviveram. Um dos principais mecanismos de ação das CTM, que pode beneficiar os animais irradiados é sua ação imunomoduladora (SALEM; THIEMERMANN, 2010). Por apresentar este mecanismo, as CTM podem reduzir e/ou prevenir infecções secundárias decorrentes da redução dos números totais de leucócitos (HU et al., 2010), e com isso aumentar a taxa de sobrevivência dos animais.

5.3.2 *Massa corpórea*

A massa corpórea dos animais foi avaliada: antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2) e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62/eutanásia).

Os camundongos de ambos os grupos experimentais não apresentaram queda significativa da massa corpórea 48 horas após a irradiação (6 Gy) (D2). No entanto, os animais que receberam o 2º transplante com CTIPDh (D32), tiveram um significativo ganho de massa corpórea ($P < 0.05$) em relação a D2 (48 horas após a irradiação). Sendo este ganho, foi mais significativo depois do terceiro transplante (D62) ($P < 0.001$). Enquanto, que os animais do grupo não tratado (irradiação + solução salina) não apresentaram mudança significativa em sua massa corpórea durante o tratamento (figura 11).

Figura 11 - Gráficos de evolução da massa corpórea do grupo tratado com CTIPDh (a) e não tratado com CTIPDh (b) em função do tempo em dias, discriminados como : antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2); e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62). Em A o gráfico demonstra aumento significativo da massa corpórea em D32 (*) que é intensificado em D62 (***). Enquanto que o gráfico B não demonstra diferença significativa durante o período de estudo. Asteriscos indicam significância estatística (ANOVA) entre a irradiação e o tratamento com CTIPDh $P < 0.05$ (*) e $P < 0.001$ (***). Gráficos gerados pelo *software* GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Ao realizar a análise comparativa entre os grupos experimentais, observamos uma diferença significativa no ganho de massa corpórea entre eles, em D32 e D62 ($P < 0.05$). Os animais que foram tratados com CTIPDh tiveram sua massa corpórea significativamente mais alta em D32 e D62, quando comparado com o grupo sem tratamento com CTIPDh (figura 12).

Figura 12- Gráfico de avaliação comparativa da massa corpórea entre os grupos em função do tempo em dias, discriminados como: antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2); e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62). O gráfico demonstra que em D32 e D62 o grupo tratado com CTIPDh apresenta a massa corpórea significativamente maior (*) em relação ao grupo não tratado. Asterisco indica significância estatística (ANOVA) entre os grupos experimentais $P < 0.05$ (*). Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Os resultados indicam que, apesar da irradiação não ter afetado completamente a redução da massa corpórea dos animais (figura 12), as CTIPDh podem promover maior proteção contra este efeito colateral da irradiação a longo prazo, uma vez que os camundongos tratados apresentaram massa corpórea significativamente maior até o fim desse estudo.

5.3.3 Índices Hematimétricos

Para o acompanhamento clínico foram avaliados eritrócitos, hematócrito e leucócitos do sangue periférico dos animais.

5.3.3.1 Eritrócitos

O hemograma revelou uma queda significativa no número de eritrócitos após a irradiação (D2) em ambos os grupos experimentais (tratado com CTIPDh e não tratado) ($P < 0.01$), os quais atingiram valores abaixo da referência de camundongos normais ($>11 \times 10^6/\mu\text{L}$) (tabela 1) (WEISS; WARDROP, 2010). Estes dados evidenciam a eficácia da irradiação na dose de 6 Gy. Vale ressaltar que ocorreu uma queda mais acentuada dos valores de eritrócitos em D17 ($P < 0.001$), em ambos os grupos experimentais (tratados com CTIPDh e não tratados) (figura 13). Contudo, em D32 os animais tratados com CTIPDh apresentaram um aumento significativo ($P < 0.05$) nos números absolutos de eritrócitos em relação à queda indicada em D17 (representado por ##), atingindo os valores normais de referência (WEISS; WARDROP, 2010). Este perfil foi observado até o final do período de estudo (D62). Enquanto que o número absoluto de eritrócitos dos animais do grupo não tratado manteve-se abaixo dos valores de referência até D62 ($P < 0.01$) (figura 13).

Figura 13- Gráficos de avaliação dos valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) do grupo tratado com CTIPDh (a) e não tratado com CTIPDh (b) em função do tempo em dias, discriminados como: antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2); e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62). O gráfico a mostra queda significativa em D2 (**) e em D17 (***), respectivamente, com recuperação significativa (##) em D32, atingindo os níveis normais do valor de eritrócitos ($>11 \times 10^6/\mu\text{L}$), até D62. O gráfico b indica quedas consecutivas nos

níveis de eritrócitos até o momento da eutanásia (D62). Asterisco indica significância estatística (ANOVA) na redução dos níveis de eritrócitos experimentais o $P < 0.01$ (**) e $P < 0.001$ (***). E o # indica significância estatística no aumento dos níveis de eritrócitos $P < 0.01$ (##). Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

A comparação entre os grupos mostra os animais que receberam tratamento com CTIPDh tiveram os níveis de eritrócitos maiores do que o grupo que não recebeu o tratamento, que inclusive não foi capaz de atingir os valores normais de referência ($>11 \times 10^6/\mu\text{L}$) até o fim do estudo (WEISS; WARDROP, 2010) (figura 14). Não existem diversas avaliações de eritrócitos relatados na literatura, apenas o grupo de Ye et al. (2010) demonstrou queda modesta de eritrócitos após a irradiação (4 Gy) e o aumento com a aplicação de fatores de crescimento derivados de plaqueta.

Figura 14 - Gráficos de comparação dos valores de eritrócitos ($\times 10^6/\mu\text{L}$) entre os grupos tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh em função do tempo em dias, discriminados como: antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2); e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62). O gráfico mostra que o grupo tratado com CTIPDh possui valores maiores de eritrócitos quando comparados com o grupo não tratado. Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Estes resultados demonstram que as CTIPDh foram capazes de normalizar os níveis de eritrócitos nos animais tratados.

5.3.3.2 Hematócrito

Os resultados demonstraram uma queda significativa dos valores de hematócrito em ambos os grupos experimentais logo após a irradiação (D2) ($P < 0.01$). Essa queda continuou em D17 ($P < 0.001$) em relação a D0, atingindo valores abaixo de 50%, considerado inferior ao nível normal de referência para camundongos (WEISS; WARDROP, 2010) (figura 15). Porém, em D32 o grupo que recebeu o tratamento com CTIPDh apresentou aumento significativo no percentual de hematócrito ($P < 0.01$) (representado por ##) em relação a D17, recuperando os valores normais para a espécie (tabela 1), que se manteve até D62. Enquanto que o grupo não tratado com CTIPDh não recuperou os níveis normais de hematócrito até D62 ($P < 0.01$) (figura 15).

Figura 15 - Gráficos de avaliação dos valores de hematócrito (%) do grupo tratado com CTIPDh (a) e não tratado com CTIPDh (b) em função do tempo em dias, discriminados como: antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2); e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62). O gráfico a indica uma queda significativa do hematócrito em D2 (**) e em D17 (***), respectivamente, com uma recuperação significativa (##) em D32,

atingindo os níveis normais do valor de hematócrito (>50%) que manteve-se até D62. O gráfico b indica uma queda significativa após a irradiação (D2) (**), e outras quedas consecutivas, sendo que seu pico de queda foi em D17 (***), com contínua queda até o fim do estudo D62 (**). Asterisco indica significância estatística (ANOVA) na redução dos níveis de eritrócitos $P < 0.01$ (**) e $P < 0.001$ (***) e o # indica significância estatística no aumento dos níveis de eritrócitos $P < 0.01$ (##). Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Ao realizar a comparação dos valores de hematócrito entre o grupo tratado com CTIPDh e não tratado, foi possível observar que os animais que receberam o tratamento conseguiram normalizar os níveis de hematócrito após o segundo transplante (D32), e tiveram o percentual de hematócrito maior que os animais sem tratamento, os quais não recuperaram o valor normal de hematócrito de acordo com a referência até o fim deste estudo (>50%) (WEISS; WARDROP, 2010) (figura 16).

Figura 16- Gráficos de comparação dos valores de hematócrito (%) entre os grupos tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh (c) em função do tempo em dias, discriminados como: antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2); e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62). O gráfico mostra que o grupo tratado com CTIPDh possui tendência de maior percentual de hematócrito quando comparado com o grupo não tratado. Gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Nosso estudo, diferentemente dos resultados apresentados por Zhang et al. (2015), não demonstrou a recuperação gradual das células do sangue periférico dos animais do grupo controle (sem tratamento com CTM). Isso pode estar associado com a dose de irradiação utilizada pelos autores (4 Gy) que é considerada moderada (VIEIRA, 2007). Neste caso, demonstrado por Zhang et al. (2015) sugere que as próprias CT intrínsecas da MO, do animal irradiado, pôde promover a recuperação da MO.

5.3.3.3 Leucócitos

Os valores absolutos de leucócitos em ambos os grupos experimentais (tratado com CTIPDh e não tratado) tiveram uma queda significativa após a irradiação (D2) ($P < 0.001$). A queda dos valores absolutos de leucócitos manteve-se em todos os pontos analisados, até o fim do estudo (D17, D32 e D62) em ambos os grupos experimentais ($P < 0.001$). Estes resultados demonstram que os níveis de leucócitos tiveram maior queda comparados com os níveis de eritrócitos e hematócrito. Isto pode estar explicado, pois o sistema imunológico responde rapidamente, e é muito sensível à irradiação de corpo todo, em grande parte por causa da tendência dos linfócitos sofrerem apoptose. De fato, a taxa de decréscimo no número de linfócitos no sangue periférico ocorre nos primeiros dias depois da exposição à radiação (WILLIAMS et al., 2010). Outro fator importante a ser considerado é que o sangue periférico possui alto número de linfócitos circulantes, por isso uma redução em número desta linhagem é mais significativa. Além disso, o sistema hematopoiético é extremamente sensível à radiação ionizante (LIU et al., 2015).

Contudo, apenas o grupo tratado com CTIPDh apresentou uma pequena recuperação nos níveis de leucócitos totais após o segundo transplante celular (D32) ($P < 0.001$) (representado por ###), em relação a D2. Já os animais não tratados, não demonstraram variação significativa nos valores absolutos de leucócitos em D17, D32 e D62 (figura 17).

Figura 17 - Gráficos de avaliação dos valores de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) do grupo tratado com CTIPDh (a) e não tratado com CTIPDh (b) em função do tempo em dias, discriminados como: antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2); e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62). O gráfico a demonstra uma queda significativa nos valores absolutos de leucócitos em D2 (***), D17, (***), D32 (**) e D62 (**), respectivamente. Enquanto que há recuperação significativa nos valores de leucócitos (###) após o segundo transplante (D32). O gráfico b também demonstra uma queda significativa após a irradiação (***), que se manteve até o fim do estudo (D62) (***). Asterisco indica significância estatística (ANOVA) na redução dos níveis de leucócitos no grupos experimentais $P < 0.01$ (**) e $P < 0.001$ (***) e ### indica significância estatística no aumento dos níveis de leucócitos $P < 0.001$ (###). Gráficos gerados pelo *software* GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Os leucócitos apesar de demonstrar queda significativa durante o período de estudo em ambos os grupos experimentais até o final do estudo (D62) houve um aumento nos níveis de leucócitos no grupo tratado com CTIPDh, apesar de não ter atingido os níveis normais para a espécie, enquanto que isso não foi possível observar nos animais sem tratamento.

Ao comparar os valores totais de leucócitos entre os grupos experimentais, observa um maior índice de leucócitos após o primeiro transplante com CTIPDh, que é significativo após o segundo transplante celular ($P < 0.05$) (figura 18). A recuperação dos valores de leucócitos também foi demonstrada em outro estudo

utilizando camundongos irradiados na dose de 5.5 Gy e tratados com altas doses de CTM ($2,5 \times 10^7$) de MO (HU et al., 2010).

Figura 18 - Gráficos de comparação dos valores de leucócitos ($\times 10^3/\mu\text{L}$) entre os grupos tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh (c) em função do tempo em dias, discriminados como: antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2); e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62). O gráfico demonstra que o grupo tratado com CTIPDh possui maiores níveis de leucócitos quando comparado com o grupo não tratado, sendo que após o segundo transplante (D32) (*) esse valor de leucócitos é significativo em comparação com o grupo não tratado. Asterisco indica significância estatística (ANOVA) entre os grupos experimentais em D32 $P < 0.05$ (*). Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Estes dados podem sugerir que a recuperação dos níveis dos leucócitos pode ocorrer após o transplante com CTIPDh. Agentes radioprotetores que são alternativas terapêuticas podem afetar a taxa e a extensão da perda de linfócitos nos primeiros dias, mas alguns agentes (como por exemplo, o transplante celular) estão mais predispostos a influenciarem primeiramente a fase de recuperação, especialmente se o agente é entregue ao paciente acometido no dia ou dois após a exposição (LIU et al., 2006).

5.3.4 *Características morfológicas da medula óssea de camundongos irradiados (6 Gy)*

A MO após a irradiação (48 horas) apresentou destruição tecidual, com lesão disseminada ao longo do tecido medular e redução da celularidade (hipoplasia/aplasia medular), em comparação a MO de um animal normal (sem irradiação). Identificamos poucos elementos hematopoiéticos, ausência de megacariócitos, infiltrado de hemácias e maior quantidade de estroma medular, com substituição de elementos gordurosos em algumas regiões da MO (figura 19 E-F). Estes achados histológicos são semelhantes aos descritos na literatura para modelos experimentais de mielossupressão ou mieloablação com radiação ionizante com doses a partir de 4 Gy (KOPP et al., 2005; YE et al., 2010; ZHANG et al., 2015). Estas alterações morfológicas são consequências do impacto ocasionado pela radiação aos tecidos, resultando uma injúria tecidual pelo estresse oxidativo e inflamação, que alteram o microambiente celular e, principalmente, os nichos de células hematopoiéticas que são mais sensíveis aos danos da radiação (GLOBUS et al., 2012).

GRUPO CONTROLE

GRUPO CICLOFOSFAMIDA

GRUPO IRRADIAÇÃO

Figura 19 - Fotomicrografia dos cortes de MO corados com hematoxilina e eosina nos aumentos de 40 x e 200 x. Em A e B MO normal (sem irradiação). As figuras A

e B mostram o canal medular preenchido por elementos hematopoiéticos. Em C e D lâminas de MO do grupo induzido por ciclofosfamida semelhante ao animal normal. Em C indica a diminuição de celularidade da MO, porém o maior aumento em D demonstra que ainda há grande celularidade medular. Em E e F MO do grupo irradiado (48 horas), que mostra grande diminuição de celularidade e maior região de estroma medular indicado pelas setas, e hemácias infiltradas indicadas pelo asterisco (*).

A celularidade da MO dos animais do grupo tratado com CTIPDh estava semelhante ao grupo sem irradiação, com uma MO populosa e heterogênea, e ausência de células adiposas (figura 20 A-B). Estes resultados sugerem que as CTIPDh são capazes de regenerar o dano ocasionado pela irradiação a MO. Resultados diferentes foram observados nos animais do grupo não tratado com CTIPDh. Neste grupo a MO dos animais irradiados ainda apresentaram uma mieloablação parcial ou total, com redução dos elementos celulares em geral e algumas regiões marcadas pela substituição de células adiposas (figura 20 C-D), e em alguns casos chegando há uma escassez celular (figura 20 E-F), o que é um achado patológico que corresponde ser incompatível com a vida (DOLBERG, 2014).

Figura 20 - Fotomicrografia dos cortes de MO corados com hematoxilina e eosina nos aumentos de 40 x e 200 x. Em A e B MO do grupo tratado com CTIPDh. Em A e B o aumento de 40 x mostra a visão geral do canal medular preenchido por elementos medulares. Em C, D, E, e F a MO do grupo não tratado com CTIPDh. O quadro de hipoplasia medular é indicado pelas figuras C e D pela diminuição de celularidade e substituição adiposa. Em E e F mostra o quadro de aplasia medular com a ausência de células e apenas estroma medular indicado pela seta vermelha, presença de gordura indicado pelas setas pretas e hemácias infiltradas indicadas pela asterisco (*).

5.3.5 Esfregaço de Medula Óssea

Os resultados do esfregaço medular corroboram com os resultados histológicos apresentados anteriormente. Em D62 (eutanásia) os camundongos tratados com CTIPDh apresentaram maior celularidade, com presença de precursores hematopoiéticos e células nucleadas em diversos graus de maturação, como megacariócitos (figura 21 A1-C1). Enquanto o esfregaço medular do grupo não tratado possuía baixa celularidade, marcada pela presença em grande quantidade de adipócitos, e ausência de precursores hematopoiéticos e megacariócitos (Figura 21 B2-C2).

Não foi possível realizar a contagem de plaquetas dos camundongos utilizados nesse estudo, devido à punção do plexo venoso retro-orbital na coleta de amostras sanguíneas, a qual altera a agregação plaquetária pelo tempo que se leva esse tipo de coleta, tornando os valores encontrados de plaquetas inconclusivos.

Porém, sabe-se que a plaquetopenia é um dos mais importantes índices hematimétricos a indicarem a AA, tornando os pacientes que possuem essa doença expostos à hemorragias. Além disso, a deficiência plaquetária também pode ocasionar equimoses, que são infiltrações de sangue (hemácias) na malha medular por ruptura de capilares (SCHEINBERG, 2011). Esses infiltrados de hemácias foram encontrados na MO após a irradiação (figura 19 E-F), e também na MO dos animais não tratados com CTIPDh (figura 20 E-F).

Logo, apesar de não ter sido possível realizar a contagem de plaquetas, pode-se observar a ausência de megacariócitos na MO dos camundongos após a irradiação e sem tratamento com CTIPDh, assim como em pacientes com AA (SCHEINBERG, 2011). Enquanto que, nos camundongos tratados com CTPDh foi possível visualizar a presença de megacariócitos. Portanto, é possível afirmar que o tratamento com CTIPDh pode ter promovido melhoria na função plaquetária da AA.

Figura 21 - Fotomicrografia do esfregaço de MO corado com kit panótico nos aumentos de 200x, 400x e 1000x. Em A1, B1 e C1 esfregaço de MO do grupo tratado com CTIPDh com a presença de elementos hematopoiéticos. Em A1, B1 e C1 mostram precursores hematopoiéticos e presença de megacariócito indicado pelas setas vermelhas. Em A2, B2 e C2 esfregaços de MO do grupo não tratado com CTIPDh, marcadas pela expressiva diminuição dos elementos hematopoiéticos. As figuras B2 e C2 mostram células adiposas que substituíram os elementos hematopoiéticos, indicadas pelas setas pretas.

Estes resultados em conjunto (esfregaço e histologia da MO), demonstraram a efetividade da CTIPDh na recuperação dos componentes celulares da MO dos camundongos irradiados. Dados semelhantes foi previamente desmontrado por Zhang et al. (2015), que também demonstraram o efeito protetor das CTM derivada de gordura na MO em animais irradiados.

5.3.6 Ensaio de unidade formadora de colônia (UFC)

É de conhecimento que a radiação na dose de 10 Gy reduz a capacidade proliferativa (formação de colônias) das células da MO, sendo assim também avaliamos se as CTM transplantadas preservam a capacidade proliferativa das CTM da MO dos camundongos irradiados (ANDRADE et al., 2014). Para isto coletamos o aspirado medular da MO dos camundongos e realizamos o ensaio de UFC, uma maior capacidade de formar UFC foi observada no grupo tratado com CTIPDh.

No 11º dia do plaqueamento observamos a formação das primeiras colônias de células fibroblastóides nas amostras do grupo tratado com CTIPDh, enquanto que no grupo não tratado não foi observado a formação de UFC. O crescimento das colônias derivadas do aspirado do grupo tratado com CTIPDh foi contínuo até o vigésimo primeiro dia. As colônias eram do diâmetro variado, com densidade celular superior a 50 células, compostas por células, semelhantes a fibroblastos (CTM) (figura 22 a, a1-a3).

No grupo não tratado foram observadas poucas células aderidas apenas 15 dias após o plaqueamento, não sendo consideradas colônias, pois apresentaram baixa densidade celular (inferior a 50 células por colônia). Aos 21 dias, poucas colônias com mais de 50 células foram observadas neste grupo experimental. Estas células apresentaram morfologia arredondada, com citoplasma grande sugerindo células já diferenciadas (figura 23 b, b1-b3).

Após 21 dias de cultura, as colônias foram coradas com cristal de violeta, e podemos observar em maior aumento (400 x) que as células do grupo tratado possuíam uma tendência de formação de malha de sustentação (estroma) a partir de células fibroblastóides, que permitiram a aderência de células da linhagem hematopoiética e precursoras por cima dessas células semelhantes a fibroblastos (CTM), consideradas estromais (figura 22 a4-a5). Esta característica morfológica é semelhante ao que ocorre fisiologicamente *in vivo* na MO, onde as células estromais (CTM) dão sustentação ao restante do tecido hematopoiético, permitindo e estimulando a produção de CTH e suas precursoras. Entretanto, não ocorreu esta formação nas culturas celulares derivadas do grupo não tratado com CTIPDh (figura 23 b4-b5).

Figura 22 - Fotomicrografia do ensaio de unidade formadora de colônias derivadas do “flushing” medular dos animais tratados com CTIPDh (a-a5). Observa-se a significativa diferença no número e densidade celular entre grupo tratado e não tratado. a= placa de cultivo de 6 poços após 21 dias de plaqueamento coradas com cristal de violeta.

Figura 23 - Fotomicrografia do ensaio de unidade formadora de colônias derivadas do “flushing” medular dos animais não tratados com CTIPDh (b-b5). Observa-se a significativa diferença no número e densidade celular entre grupo tratado e não tratado. b= placa de cultivo de 6 poços após 21 dias de plaqueamento coradas com cristal de violeta.

A análise estatística do número de colônias formadas foi realizada a fim de comprovar a eficiência das CTIPDh na formação de UFC. Foi possível observar diminuição significativa ($P < 0.001$) do número de colônias dos animais após a irradiação (48 horas) em relação aos animais sem irradiação. Essa redução da capacidade clonogênica das células estromais da MO também foi significativa ($P < 0.001$) nos animais não tratados com CTIPDh em relação ao controle (animais sem irradiação). Enquanto que nos animais que receberam tratamento com CTIPDh

não houve diminuição significativa no número de UFC em relação ao controle (figura 24). Além disso, foi observada diferença significativa ($P < 0.05$) (representado por ##) entre os grupos experimentais, onde os animais que receberam as CTIPDh tiveram um maior número de UFC quando comparado ao grupo sem tratamento (figura 23). Dados semelhantes quanto ao efeito proteção da capacidade proliferativa das células estromais da MO, foi demonstrado por HU et al. (2010) em animais tratados com CTM após a irradiação (5 Gy).

Figura 24- Gráfico de comparação entre os grupos Controle, 48 horas após a irradiação, tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh em função de número de UFC. O gráfico demonstra que a irradiação afetou significativamente a eficiência em gerar unidades formadoras de colônias 48 horas após a irradiação(***), que não foi possível de recuperar no grupo não tratado (***). Enquanto que a eficiência em gerar UFC foi significativamente maior no grupo tratado com CTIPDh (##). Asterisco indica significância estatística (ANOVA) na redução dos níveis de UFC entre os grupos experimentais $P < 0.001$ (***) e o $P < 0.01$ (##) indica significância estatística no aumento do número de UFC. Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

O ensaio de UFC é um dos métodos utilizados rotineiramente para caracterizar as CTM da MO. Estas células possuem morfologia fibroblastóide, capacidade de aderir ao plástico e capacidade de formar colônias quando plaqueadas em baixa densidade (POCHAMPALLY, 2008). Desta forma, utilizamos o ensaio de UFC para verificar se o transplante de CTPDh é capaz de atenuar os danos ocasionados pela irradiação nesta população celular da MO. Frente aos resultados obtidos, podemos concluir que a irradiação na dose de 6 Gy afeta a formação de

UFC assim como demonstrado por Andrade et al. (2014), e que o transplante de CTIPDh protege as CTM da MO após a irradiação, não afetando esta importante característica das CTM da MO. Isto é um resultado importante, pois as células estromais da MO possuem um papel fundamental no suporte na hematopoiese.

5.3.7 Avaliação da contribuição funcional das CTIPDh na função hematopoiética e estromal da medula óssea

Para a avaliação dos diferentes nichos celulares presentes na MO foi realizada a imunofenotipagem de precursores hematopoiéticos e de CTM através dos ensaios de citometria de fluxo, imunocitoquímica, imunohistoquímica *in vivo* e o ensaio de imunocitofluorescência das células da MO derivadas *in vitro*. Os resultados desta avaliação encontram-se descritos abaixo.

5.3.7.1 Ação anti-apoptótica das CTIPDh na ablação da medula óssea por irradiação

Apoptose é considerada a principal causa de injúria na MO por irradiação (PENG et al., 1999). A ocorrência da apoptose está relacionada com o oncogene e anti-oncogene de regulação. Desta forma, a proteína citoplasmática p53 é um importante biomarcador para este tipo de análise. Esta proteína controla a mudança da fase G1 para S no ciclo celular, sendo assim, p53 determina se as células irão entrar na fase S (do ciclo celular) e/ou seguir para apoptose celular (DESIMONE et al., 2003). As células hematopoiéticas são altamente sensíveis aos danos provocados pela radiação, e até a exposição aos níveis relativamente baixos pode resultar na falência medular (WILLIAMS et al., 2010), sendo a irradiação um importante modelo experimental para uso em doença hematológicas. Nossos resultados demonstraram que a irradiação na dose de 6 Gy resultou na morte celular das células da MO por apoptose. As análises de citometria de fluxo demonstraram que após a irradiação (48 horas), quase 50% das células da MO estavam apoptóticas (média de 43.8% de células p53+). Enquanto que somente 4,46% das células do grupo controle (sem radiação) eram p53+ ($P < 0.05$) (figura 25).

Até o fim desse estudo (D62) a expressão de p53 reduziu em ambos os grupos experimentais. Sendo que, neste mesmo período o grupo tratado com CTIPDh apresentou menor expressão para p53 (média de 17,75% de células positivas), em comparação com o grupo não tratado (média de 31,35% de células positivas) (figura 24). Desta forma, podemos dizer que as CTIPDh apresentaram um efeito anti-apoptótico.

Figura 25 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo p53 dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (A) em porcentagem de células p53 (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico A indica aumento significativa (*) 48 horas após a irradiação em relação ao controle. E queda de ambos grupos experimentais, sendo que o grupo tratado com CTIPDh apresentou menor média de expressão do que o grupo não tratado. Asteriscos indicam significância estatística (ANOVA) entre 48 horas após a irradiação e o controle $P < 0.05$ (*). Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

A falência medular causada pela radiação é complexa. Envolve mais do que a perda de células da MO; outros fatores como a alteração do tráfico celular, bloqueio da maturação celular, alteração na diferenciação celular e em sua função, a perda da capacidade de reposição do sistema imune e o dano aos nichos celular também são consideradas como possíveis mecanismos de contribuição dessa falência (WILLIAMS et al., 2010).

No entanto, apesar de um grande número de pesquisas ter sido realizadas a fim de avaliar os efeitos deletérios da radiação na hematopoiese, há uma carência de terapias efetivas para melhorar a sobrevivência celular da MO em indivíduos acidentalmente e/ou terapeuticamente expostos a radiação. Por isso, é necessária a investigação de novas terapias com o objetivo de diminuir/proteger os danos da irradiação ocasionados ao sistema hematopoiético (MACVITTIE et al., 2005; SCHUENING et al., 1989).

Com base nos resultados obtidos neste projeto, podemos dizer que as CTIPDh possuem um importante efeito protetor contra a irradiação nas células da MO, sendo uma importante ferramenta terapêutica para as síndromes de radiação aguda.

5.3.7.2 Ação das CTIPDh na matriz extracelular da medula óssea

O nicho hematopoiético é um sistema complexo composto por diferentes tipos celulares, como CTH, precursores mielóides e linfóides, células endoteliais, e até mesmo a matriz extracelular. A matriz extracelular é composta por CTM, células adiposas, osteócitos e células reticulares (LO CELSO; SCADDEN, 2011), e também por diversas proteínas, como por exemplo, a fibronectina. A fibronectina, que é produzida pelas CTM, este componente da matriz extracelular tem papel crucial na função e estrutura dos tecidos, na interação entre as CT e participam ativamente da diferenciação celular (LAI et al., 2010; WHETTON; GRAHAM, 1999). Partindo deste conhecimento prévio, realizamos ensaios de quantificação da expressão deste filamento intermediário por citometria de fluxo, somada às análises de imunohistoquímica, imunocitofluorescência e imunocitoquímica.

Após a irradiação na dose de 6 Gy, foi observada a redução de fibronectina ($P < 0.05$) (média de 11,7% células positivas) em comparação aos animais do grupo controle (média de 52,63% de células positivas) (figura 26). O efeito deletério da radiação na matriz extracelular já foi previamente reportada em encéfalo fetal após a irradiação na dose de 1 Gy (MEZNARICH et al., 1993). No entanto, não observamos benefício terapêutico significativo após o transplante com CTIPDh na matriz extracelular (figura 26).

Figura 26- Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo Fibronectina dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (B) em percentagem de células Fibronectina+ (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico B indica queda significativa (*) 48 horas após a irradiação em relação ao controle. E aumento de ambos grupos experimentais, sendo que o tratado com CTIPDh foi maior que não tratado. Asteriscos indicam significância estatística (ANOVA) entre a irradiação e o controle $P < 0.05$ (*). Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

As análises de imunocitoquímica e imunohistoquímica corroboram com os dados de imunocitofluorescência e demonstraram que os animais tratados com CTIPDh (média de 30,93% de células positivas) e os animais não tratado com CTIPDh (média de 33,56% de células positivas) foram imunopositivos no estroma medular para o filamento intermediário fibronectina nas (figura 27 B1, B3, B4 e B6). Na imunofluorescência, foi possível visualizar que as células isoladas do aspirado medular do grupo tratado com CTIPDh e não tratado foram imunopositivas para fibronectina. Porém, é notado que as células derivadas do aspirado medular do grupo CTIPDh apresentaram uma morfologia fibroblastoíde homogênea semelhante as CTM (figura 27 B2 e B5).

FIBRONECTINA

Figura 27- Fotomicrografia das análises de imunocitofluorescência (b2-B5), imunocitoquímica (B1-B4) e imunohisquímica (B3-B6) do aspirado de MO do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh para o filamento intermediário fibronectina. Demonstramos a imunopositividade do anticorpo fibronectina na citoplasma das células do aspirado medular do grupo tratado (B1), não tratado (B4), e nas células do aspirado medular cultivadas *in vitro* (B2, B5) e na matriz extracelular da MO (B3, B6). Seta Branca= Célula com

marcação em verde (FITC) no filamento intermediário para Fibronectina+ com morfologia fibroblastóide (B2).

Todavia, mediante a estes resultados, ensaios futuros precisam ser realizados a fim de comprovar, definitivamente, se as CTIPDh não são capazes de estimular a matriz extracelular, utilizando até mesmo outras proteínas expressas neste componente da MO.

5.3.7.3 Ação das CTIPDh no nicho vascular

O nicho vascular é outro componente da MO, que é composto por células endoteliais, progenitores endoteliais e CTM. Nestina, é um filamento intermediário presente em progenitores neurais (LEND AHL et al., 1990), que também é expresso em progenitores endoteliais proliferativos (KLEIN et al., 2014), possuindo um papel fundamental na angiogênese. Desta forma, nestina pode ser utilizado como um biomarcador do nicho vascular (progenitores endoteliais). Além disso, este anticorpo também é amplamente expresso em células perivasculares, CTM e nas CTIPDh, por serem células derivadas da crista neural (KERKIS et al., 2006; KERKIS;CAPLAN, 2012).

Os resultados obtidos pelas análises de citometria de fluxo, demonstraram que a radiação provocou queda significativa do número de células nestina positivas ($P<0.05$) (média de 16,6% de células positivas) em relação ao grupo Controle (animais que não foram irradiados) (média de 50,53% de células positivas) (figura 28). A queda de precursores endoteliais, também foi observado em pacientes com AA que possuem vasos endoteliais comprometidos devido à doença (FÜREDER et al., 2006). Após o transplante com CTIPDh (D62) foi possível observar que o número de células nestina+ aumentou significativamente ($P<0.05$) no grupo tratado com CTIPDh (média de 41,6% de células positivas), em relação a radiação. Interessantemente, o grupo que não recebeu tratamento permaneceu com queda significativa ($P<0.05^{**}$) (média de 16,4% de células positivas) até o término do estudo (figura 28).

Figura 28- Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo Nestina dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (C) em percentagem de células Nestina+ (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico C indica queda significativa (*) 48 horas após a irradiação e do grupo não tratado com CTIPDh (**) em relação ao controle. E aumento do grupo tratado com CTIPDh (#) em relação à irradiação. Asteriscos indicam significância estatística (ANOVA) entre os grupos $P < 0.05$ (*) e $P < 0.01$ (**). E o # indica significância estatística no aumento da expressão de Nestina+ $P < 0.05$ (#). Gráficos gerados pelo *software* GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Além disso, também foi possível observar a elevada expressão de Nestina+ nos demais ensaios realizados, com destaque da imunohistoquímica, que é possível observar a marcação de Nestina+ no endotélio dos vasos sinusóides do tecido do grupo tratado com CTIPDh. Enquanto que não existe essa marcação, além da diminuição de vasos sinusóides da área estudada do grupo sem tratamento (figura 28 C3 e C6).

NESTINA

TRATADO COM CTIPDH

NÃO TRATADO COM CTIPDH

Figura 29- Fotomicrografia das análises de imunocitofluorescência (C1-C4), imunocitoquímica (C2-C5) e imunohisquímica do aspirado de MO (C3-C6) do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh para o filamento intermediário nestina. Demonstra-se a imunopositividade do anticorpo nestina no citoplasma das células do aspirado medular do grupo tratado (C1), não tratado (C4), e nas células do aspirado medular cultivadas *in vitro* (C2,C5) e no endotélio vascular (seta preta) (C3).

Esse resultado foi complementado com o estudo do anticorpo CD105 que outro anticorpo expresso em progenitores e células endoteliais (NASSIRI et al., 2011).

Semelhante aos resultados obtidos ao utilizar o anticorpo nestina. A irradiação (48 horas) provocou queda significativamente expressiva de CD105 ($P<0.01$) (média de 21,5% de células positivas) em relação ao grupo controle (média de 47,07% de células positivas). Estes resultados corroboraram os relatados em pacientes com AA que possuem vasos endoteliais comprometidos devido à doença (WOLFGANG et al., 2006). O tratamento com CTIPDh foi capaz de recuperar a expressão de CD105+ ($P<0.05$) (média de 38,7% de células positivas) em relação ao grupo irradiado. Enquanto que o grupo não tratado permaneceu com a queda significativa ($P<0.05$) (média de 31,9% de células positivas) ocasionada pela radiação, em relação ao grupo controle até o término do estudo (figura 30).

Figura 30- Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD105 dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (D) em porcentagem de células CD105+ (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico D indica queda significativa (**) 48 horas após a irradiação e do grupo não tratado com CTIPDh (*) em relação ao controle. E aumento do grupo tratado com CTIPDh (#) em relação à irradiação. Asteriscos indicam significância estatística (ANOVA) entre os grupos $P < 0.01$ (**) e $P < 0.05$ (*). E o # indica significância estatística no aumento da expressão de CD105+ $P < 0.05$ (#). Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Tendo em vista que, o microambiente medular é prejudicado na AA, inclusive a angiogênese, com a diminuição de vasos endoteliais e progenitores (WOLFGANG et al., 2006), e que Nestina e CD105 são marcadores células progenitoras endoteliais proliferativas (BURROWS et al., 1995; MILLER et al., 1999; SUZUKI et al., 2010; WIKSTROM et al., 2002). Podemos dizer que as CTIPDh possuem uma importante ação na proteção destas células, bem como uma ação na angiogênese.

5.3.7.4 Ação das CTIPDh no nicho hematopoiético

Um dos favoráveis efeitos das CTM na hematopoiese é o seu papel na secreção de diversos fatores de crescimento e citocinas que dão suporte para o crescimento e diferenciação da linhagem hematopoiética (DROUET et al., 2005; MAJUMDAR et al., 1998). Há varios estudos que demonstram que *in vivo* e *in vitro* as CTM estimulam as CTH (DROUET et al., 2005; MAJUMDAR et al., 1998; MOURCIN et al., 2005).

As CTM secretam uma grande quantidade de interleucinas que atuam diretamente na hematopoese como: IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, Flt-3 ligante e fator de células tronco (MOURCIN et al., 2005). Porém, após a irradiação ocorre uma redução significativa de CTH e de CTM na MO (FRASCA et al, 2000), que consequentemente afeta a produção de toda a linhagem sanguínea. As CTHs de camundongo expresam os principais marcadores como Sca-1, C-kit e CD34. Desta forma, a fim de verificar o mecanismo de ação das CTIPDh nas CTH e seus progenitores, utilizamos os anticorpos CD44, CD45, CD34, C-kit e Sca-1, que foram realizados ensaios de quantificação por citometria de fluxo e ensaios e imunohistoquímica e imunocitoquímica.

A radiação na dose de 6 Gy, reduziu a população celular CD34+ (26,15% de células positivas) e c-kit+ (38,5% de células positivas) em comparação aos animais normais (sem radiação) CD34 (41,5% de células positivas) e c-kit (44,26% de células positivas). Desta forma, pode-se dizer que a radiação foi responsável pela diminuição de células CD34+ e c-kit+ (figuras 31, 32 e 33). No entanto, não ocorreu a redução da população de Sca-1 positivas 48 horas após a irradiação (14,1% de células positivas) em comparação ao grupo controle (sem radiação) (12,6% de células positivas) (figuras 31, 32, e 33).

Diferenças foram observadas entre o grupo tratado com CTIPDh e grupo não tratado com CTIPDh quanto a expressão dos marcadores hematopoiéticos. Os animais tratados com CTIPDh apresentaram uma maior porcentagem de células imunopositivas para os anticorpos de CTH e de progenitores como: Sca1 (11,3% de células positivas), c-kit (33,6% de células positivas) e CD34 (53,45% de células positivas); quando comparado com os animais não tratados com CTIPDh como:

Sca1 (5,06% de células positivas), c-kit (28,9% de células positivas) CD34 (45,35% de células positivas) (figuras 31, 32 e 33).

Em nossos resultados observamos que após a irradiação ocorreu um discreto aumento do anticorpo Sca-1 (figura 31). Sca-1 tem se mostrado importante na ativação normal de CTH, e possui desempenho no papel de autorrenovação das CTH (ITO et al, 2003). Portanto, as CTH ao serem estimuladas por qualquer fator, saem do seu estado quiescente e expressam Sca-1 a fim de promover a autorrenovação (BRADFUTE et al., 2005). A partir deste conhecimento prévio, sugere-se que a radiação ocasionou desequilíbrio homeostático do nicho medular, promovendo consequentemente, forte estímulo de Sca-1 para a autorrenovação das CTH restantes no tecido, para compensar as demais células da MO que estavam comprometidas pela irradiação. Porém, a radiação foi capaz de dar continuidade ao estresse oxidativo, e consequentemente resultar na diminuição de CTH até o fim desse estudo (D2), o que explica a diminuição de expressão de Sca-1 do grupo não tratado. Porém, o grupo tratado com CTIPDh conseguiu atingir/manter o nível de expressão de Sca-1 semelhante ao controle (sem irradiação). Assim, pode-se sugerir que as CTIPDh foram capazes de estimular a proliferação e/ou protegeram essas CTH intrínsecas da MO.

O marcador C-kit apesar de ser um marcador importante das CTH, também é um marcador de precursores, progenitores multipotentes e progenitores de linhagens comprometidas (BRADFUTE et al., 2005; OKADA et al., 1992). Por possuir este amplo espectro de ação, C-kit pode ser expresso em diversos tipos celulares da MO. Em nossos resultados observamos que ocorreu uma discreta diferença entre os grupos experimentais (tratado e não tratado com CTIPDh). Porém, mesmo assim há uma maior expressão de C-kit, ainda maior no grupo tratado com CTIPDh.

Há muitas contradições relacionadas à expressão do anticorpo CD34 nas CTH de camundongos. Inicialmente era aceito que as CTH expressavam CD34, porém esse dogma foi desfeito. Recentemente estudos demonstraram que células CD34+ são encontradas em camundongos até 5 semanas de vida (OGAWA et al., 2001). Com base nestes dados, podemos explicar a imunopositividade de células CD34 nos animais sem radiação utilizados neste estudo, pois os animais do grupo

controle (sem irradiação) e recém irradiados (48 horas após a irradiação) apresentavam 4 semanas de idade. Já os animais dos grupos experimentais (tratado e não tratado), que foram eutanasiados no fim do estudo proposto (D62), ou seja, possuíam idade superior a 4 semanas, não deveriam ter células CD34 positivas segundo Ogawa (2001). No entanto, em nossos resultados foram identificadas células CD34+ em ambos os grupos experimentais. Estes resultados vão ao encontro dos resultados apresentados por Ito et al. (2000). Os autores demonstraram que na MO de camundongos adultos (superiores a 4 semanas) há uma população de células CD34 positivas (média de 20%).

Figura 31 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo Sca-1 dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (E) em porcentagem de células Sca-1+ (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico E indica aumento 48 horas após a irradiação em relação ao controle. E expressão maior do tratado com CTIPDh do que do grupo não tratado. Gráficos gerados pelo *software* GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Figura 32 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo C-kit dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (F) em percentagem de células C-kit+ (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico F indica queda 48 horas após a irradiação em relação ao controle. E aumento de ambos grupos experimentais, sendo que o tratado com CTIPDh foi maior que não tratado. Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Figura 33 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD34 dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (G) em porcentagem de células CD34+ (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico G indica queda 48 horas após a irradiação em relação ao controle. E aumento de ambos grupos experimentais, sendo que o tratado com CTIPDh foi maior que não tratado. Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Corroborando com o ensaio de citometria de fluxo, células imunopositivas para Sca-1, C-kit, e CD34 foram identificadas em maior proporção no grupo tratado do que no grupo não tratado com CTIPDh (figuras 34 E1-E6, 35 F1-F6 e 36 G1-G6).

SCA 1

TRATADO COM CTIPDH

NÃO TRATADO COM CTIPDH

Figura 34- Fotomicrografia das análises de imunocitofluorescência (E1-E4), imunocitoquímica (E2-E5) e imunohisquímica do aspirado de MO (E3-E6) do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh para o marcador de superfície Sca-1. Demonstra-se a imunopositividade do anticorpo Sca-1 na membrana das células do aspirado medular do grupo tratado (E1), não tratado (E4), e nas células do aspirado medular cultivadas *in vitro* (E2,E5) e em diversas regiões do tecido medular (E3,E6).

C-KIT**TRATADO COM CTIPDH****NÃO TRATADO COM CTIPDH**

Figura 35- Fotomicrografia das análises de imunocitofluorescência (F1-F4), imunocitoquímica (F2-F5) e imunohistoquímica do aspirado de MO (F3-F6) do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh para o marcador de superfície C-kit. Demonstra-se a imunopositividade do anticorpo C-kit na membrana das células do aspirado medular do grupo tratado (F1), não tratado (F4), e nas células do aspirado medular cultivadas *in vitro* (F2,F5) e em diversas regiões do tecido medular (F3,F6).

CD 34

TRATADO COM CTIPDH

NÃO TRATADO COM CTIPDH

Figura 36- Fotomicrografia das análises de imunocitofluorescência (G1-G4), imunocitoquímica (G2-G5) e imunohisquímica do aspirado de MO (G3-G6) do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh para o marcador de superfície CD34. Demonstra-se a imunopositividade do anticorpo CD34 na membrana das células do aspirado medular do grupo tratado (G1), não tratado (G4), e nas células do aspirado medular cultivadas *in vitro* (G2,G5) e em diversas regiões do tecido medular no grupo tratado com CTIPDh (G3) e principalmente em hemácias no grupo não tratado (G6).

A recuperação parcial das CTH e de seus precursores em camundongos irradiados após o transplante com CTIPDh, sugere que as CTIPDh apresentam um mecanismo de ação importante no estímulo da hematopoiese.

Outro anticorpo analisado neste projeto foi o CD45, que também é um marcador de superfície, expresso em todos os leucócitos, que possui uma importante função nessas células, principalmente na ativação de linfócitos T (ALTIN, 1997). Este é um marcador importante para este estudo, pois após a exposição à radiação, os leucócitos são as células mais afetadas e representativas para confirmar a AA (WILLIAMS et al., 2011). Neste sentido, após a irradiação (48 horas) ocorreu diminuição da expressão de CD45 (7,1% de células positivas) em comparação aos animais do grupo controle (23,11% de células positivas), dados que comprovam a efetividade do modelo experimental utilizado neste estudo (figura 37). Estas análises de citometria de fluxo corroboraram com os achados na contagem global de leucócitos do sangue periférico apresentados anteriormente no hemograma (figura 17).

A terapia com CTIPDh, promoveu um significativo aumento na proporção de linfócitos e seus progenitores (CD45+) (33,5% de células positivas) em relação à radiação. Além disso, a proporção de células CD45+ era maior que do grupo não tratado com CTIPDh (14,8% de células positivas) (figura 37).

Figura 37 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD45 dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (H) em percentagem de células CD45+ (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico H indica queda 48 horas após a irradiação em relação ao controle. E aumento de ambos grupos experimentais, sendo que o tratado com CTIPDh foi maior que não tratado. Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Estes dados foram reforçados pelas achos de imunocitofluorescência e imunocitoquímica para o mesmo anticorpo (figura 38 H1, H2, H4, H5). O aspirado medular e a MO demonstraram um maior número de células imunopositivas para CD45 em relação ao grupo sem tratamento com CTIPDh (figura 38 H1-H6).

Figura 38- Fotomicrografia das análises de imunocitofluorescência (H1-H4), imunocitoquímica (H2-H5) e imunohisquímica do aspirado de MO (H3-H6)

do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh para o marcador de superfície CD45. Demonstra-se a imunopositividade do anticorpo CD45 na membrana das células do aspirado medular do grupo tratado (H1), não tratado (H4), e nas células do aspirado medular cultivadas *in vitro* (H2,H5) e em diversas regiões do tecido medular (H3) do grupo tratado com CTIPDh e poucas células no grupo não tratado (H6).

E por fim, verificamos os níveis de expressão de CD44 que é um membro da família de molécula de adesão celular, fundamental na manutenção dos “*pools*” de precursores, assim como na migração de CTH (CAO et al., 2016). O anticorpo também é expresso em progenitores linfocitários e CTM. Após a irradiação ocorreu uma drástica redução nestes precursores na MO, demonstrando que células CD44+ são extremamente sensíveis aos danos ocasionados pela radiação ($P<0.05$) (média de 1,2% de células positivas) em relação ao grupo controle (46,26% de células positivas). Após o transplante com CTIPDh, ocorreu significativa recuperação de células CD44+ apenas no grupo tratado com CTIPDh ($P<0.05$) (51,9% de células positivas), enquanto que esse dado não pôde ser observado no grupo não tratado (média de 40,55% de células positivas) (figura 39).

Figura 39- Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD44 dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (I) em porcentagem de células CD44+ (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico I indica queda significativa (*) 48 horas após a irradiação em relação ao controle. E aumento de ambos grupos experimentais, sendo que o grupo tratado com CTIPDh teve aumento significativo (#) em relação à irradiação. Asteriscos indicam significância estatística (ANOVA) entre 48 horas após a irradiação e o controle $P < 0.05$ (*). E o # indica significância estatística no aumento da expressão de CD44+ $P < 0.05$ (#). Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

O aspirado medular e a MO também demonstraram um maior número de células imunopositivas para CD44 em relação ao grupo sem tratamento com CTIPDh (figura 40 H1-H6).

CD 44

TRATADO COM CTIPDH

NÃO TRATADO COM CTIPDH

Figura 40- Fotomicrografia das análises de imunocitofluorescência (I1-I4), imunocitoquímica (I2-I5) e imunohisquímica do aspirado de MO (I3-I6) do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh para o marcador de superfície CD44. Demonstra-se a imunopositividade do anticorpo CD44 na membrana das células do aspirado medular do grupo tratado (I1), não tratado (I4), e nas células do aspirado medular cultivadas *in vitro* (I2,I5) e em diversas regiões do tecido medular (I3) do grupo tratado com CTIPDh e poucas células no grupo não tratado (I6).

A hematopoiese é um processo complexo que depende de um conjunto de CTH e progenitores para manter um estado de repouso (quiescente), e de proteção frente a, insultos citotóxicos como a radiação, para adequada produção de células sanguíneas ao longo da vida (auto-renovação celular) (VAN OS et al., 2009). Estas características (quiescência e autorenovação) são duas das importantes características das CTH (BRADFUTE et al., 2005; VAN OS et al., 2009). E a partir de um estímulo CTH irão se autorenovar para manter o *pool* celular do nicho, ou irão proliferar-se e diferenciar-se em células progenitoras, que eventualmente dão origem às células diferenciadas no sangue periférico (HOLMES; STANFORD, 2007). Com base nos resultados apresentados neste projeto, podemos dizer que as CTIPDh foram responsáveis pelo fornecimento de estímulo para as células intrínsecas hematopoiéticas. Porém, mais estudos precisam ser realizados a fim de identificar a resposta destas diferentes populações de CTH e progenitores frente a exposição de radiação. Até o presente faltam os estudos que demonstram o perfil da expressão de diferentes marcadores de CTH e progenitores após a exposição de irradiação. Neste sentido, nosso estudo fornece importantes informações referentes a resposta destas células após a irradiação na dose de 6 Gy. Também, podemos observar que há uma variabilidade na sensibilidade das células da MO após a exposição da radiação na dose de 6 Gy.

5.3.7.5 Ação das CTIPDh no nicho estromal medula óssea

As CTM estão naturalmente presentes no estroma medular e apresentam diversos mecanismos de ação na hematopoiese (ZHAO; LIU, 2016). Na MO as CTM são importante na reconstituição do microambiente medular (ALMOHAMAD et al., 2003) através da secreção de vários fatores de crescimento e interleucinas como: IL-

6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, Flt-3 ligante e fator de CT. (MOURCIN et al., 2005). Adicionalmente, estudos *in vivo* também demonstraram o potencial das CTM na hematopoiese. A associação de CTM no transplante de CTH proporciona diversos benefícios para o paciente como: facilita o enxerto e recuperação da hematopoiese, o que resulta no sucesso do transplante celular para os pacientes (ANGELOPOULOU et al., 2003; WANG et al., 2004).

As CTM são células heterogêneas e expressam diferentes marcadores, como CD44, C105 e CD90. Desta forma, utilizamos esses anticorpos para verificar os efeitos da radiação nessas células, bem como verificar se há benefício terapêutico após o transplante com CTIPDh. CD90 é um marcador de superfície, altamente expresso em CTM, e nas CTIPDh (CAPLAN et al., 2006; KERKIS et al., 2006).

Os resultados de citometria demonstram que a irradiação provocou leve queda na expressão de células imunopositivas para CD90 (11,5% de células positivas) em relação ao controle (18,4% de células positivas). Após o tratamento com CTIPDh ocorreu um aumento da expressão de CD90+ no nicho estromal da MO (29,9% de células positivas) em relação ao grupo não tratado com CTIPDh (26,42% de células positivas) (figura 41).

Figura 41 - Representação esquemática dos histogramas obtidos do fenótipo CD90 dos grupos discriminados como: Controle, Irradiado (48 horas após a irradiação) e Experimental (Tratado com CTIPDh e Não Tratado com CTIPDh), respectivamente; Gráfico (J) em percentagem de células CD90+ (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Controle (verde), 48 horas após a irradiação (laranja), Tratado com CTIPDh (azul) e Não Tratado com CTIPDh (vermelho). O gráfico J indica queda 48 horas após a irradiação em relação ao controle. E aumento de ambos grupos experimentais, sendo que o tratado com CTIPDh foi maior que não tratado. Gráficos gerados pelo *software* GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Os ensaios de imunocitofluorescência e de imunocitoquímica se assemelham aos resultados de citometria de fluxo. Uma maior proporção de células imunopositivas para C90 é observada no grupo tratado com CTIPDh (figura 42 J1, J2, J4 e J5). E o ensaio de imunohistoquímica também demonstra maior região do tecido medular com células CD90+ no grupo tratado com CTIPDh (figura 42 J3 e J6).

CD 90

TRATADO COM CTIPDH

NÃO TRATADO COM CTIPDH

Figura 42- Fotomicrografia das análises de imunocitofluorescência (J1-J4), imunocitoquímica (J2-J5) e imunohistoquímica do aspirado de MO (J3-J6) do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh para o marcador de superfície CD90. Demonstra-se a imunopositividade do anticorpo CD90 na membrana das células do aspirado medular do grupo tratado (J1), poucas células positivas no grupo não tratado (J4), e nas células do aspirado medular cultivadas *in vitro* (J2,J5) e em diversas regiões do tecido medular (J3,J6).

Adicionalmente, após o tratamento com CTIPDh, houve um aumento dos marcadores CD44 e CD105, que além de serem expressos em progenitores linfocitários e em células endoteliais, respectivamente. Também são marcadores de CTM. Desta forma, as análises realizadas anteriormente também podem ser aplicadas para o nicho estromal.

5.3.8 Biodistribuição e enxertia das CTIPDh

Ao utilizar a via intraperitoneal, as CTIPDh foram capazes de migrar para a MO. Poucas células foram identificadas com auxílio do marcador núcleo humano na MO pelo ensaio de imunohistoquímica (figura 43 A1-C1). Até o presente, não há estudos que demonstrem que as CTM migraram para a MO em modelo experimental de AA e/ou da síndrome aguda da radiação em camundongos. Mais estudos precisam ser realizados para comprovar esta habilidade das CTIPDh.

Figura 43 - Fotomicrografia de Imunohistoquímica do anticorpo anti-núcleo humano para avaliar enxertia das CTIPDh na MO do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh. Demonstramos (seta) células imunopositivas para o anticorpo anti-núcleo.

Apesar do baço dos camundongos não apresentarem injúrias evidentes após a radiação, também foi possível observar enxertia de CTIPDh nos cortes histológicos do baço do grupo tratado com CTIPDh (figura 44 A). Enquanto que não foi possível observar essa enxertia no grupo não tratado (figura 44 B).

Figura 44 - Fotomicrografia de Imunohistoquímica do anticorpo anti-núcleo humano para avaliar enxertia das CTIPDh no baço do grupo tratado com CTIPDh e não tratado com CTIPDh. Não foi possível observar células imunopositivas para o anticorpo anti-núcleo nos cortes histológicos dos baços dos camundongos

5.3.9 Características morfológicas do Baço de camundongos irradiados (6 Gy)

Os achados histológicos do baço demonstraram que não houve diferença tecidual entre os grupos. A polpa vermelha e polpa branca apresentaram celularidade normal. Não foi possível identificar demais mudanças morfológicas no órgão (figura 45).

Apesar do baço também ser considerado um órgão hematopoiético, não foi possível observar diferença morfológica durante todo o estudo (D62). Portanto, os resultados demonstraram que a radiação não foi capaz de afetar o baço dos camundongos, tornando apenas a MO alvo de estudo desse trabalho.

BAÇO GRUPO CONTROLE **BAÇO GRUPO IRRADIADO (48 horas)** **BAÇO GRUPO NÃO TRATADO COM CTIPDh** **BAÇO GRUPO TRATADO COM CTIPDh**

Figura 45 - Fotomicrografia dos cortes do baço corados com hematoxilina e eosina nos aumentos de 100 x e 200 x. Em A e B baço do grupo Controle. Em C e D mostra o baço do grupo Irradiado (48 horas após a irradiação). Em E e F baço do grupo Não Tratado com CTIPDh. Em G e H baço do grupo Tratado com CTIPDh. Todas as figuras indicam celularidade nas polpas branca e vermelha.

5.3.10 *Ação das CTIPDh na aplasia de medula óssea induziada por radiação a longo prazo (6 meses)*

Para investigar se a MO foi capaz de regenerar intrínsecamente, e para verificar se a recuperação dos parâmetros sanguíneos, promovido pelos transplantes com CTIPDh (D62) não foram revertidos, um acompanhamento a longo prazo (6 meses) foi realizado em um grupo experimental. Para isto, foram realizadas análises dos índices hematimétricos, ensaios imunofenotípicos (citometria de fluxo) e investigação do tecido medular (histologia convencional), em comparação com os animais eutanasiados em D62.

Os resultados demonstraram que os índices hematimétricos (eritrócitos, hematócrito e leucócitos) avaliados no prazo de 6 meses após o terceiro transplante (Pós-D62), não apresentaram diferença significativa comparado com D62, ou seja, após o término de estudo do grupo de curta avaliação e/ou após o ciclo de 3 transplantes, em ambos os grupos experimentais (tratado e não tratado). Porém, é observada uma leve queda nestes parâmetros sanguíneos após 6 meses que não foram significativos. O que pode-se dizer que a radiação possui efeito deletério a longo prazo nestes animais, que precisa ser melhor estudado. Ainda assim, o gráfico mostra que as células do sangue periférico possuem a tendência de normalização, sugerindo apenas que as CTIPDh promovem uma capacidade de auxiliar nessa recuperação de forma mais rápida (figura 46).

Figura 46 - Gráficos de avaliação de Eritrócitos (A), Hematócrito (B) e Leucócitos (C) em relação aos grupos discriminados como: Tratado com CTIPDh (D62); Tratado com CTIPDh (6 meses); Não Tratado com CTIPDh (D62) e Não Tratado com CTIPDh (6 meses). Os gráficos demonstraram tendência de normalização das células sanguíneas em todos os índices hematimétricos avaliados, com recuperação mais lenta dos animais não tratados. Gráficos gerados pelo *software* GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

Foi realizada histologia da MO desse grupo experimental a longo prazo (6 meses), e o resultado demonstrou que a celularidade da MO do grupo tratado com CTIPDh preservou a recuperação dos componentes celulares em D62 (figura 47 b1-b2). Sendo que, a MO do grupo não tratado demonstrou a persistência de uma hipocelularidade com substituição de gordura (figura 46 a1-a2) em relação a MO do grupo tratado com CTIPDh, que demonstrou o canal medular totalmente preenchido e com alta celularidade (figura 47 b1-b2). Estes dados enfatizam o potencial regenerativo das CTIPDh no modelo experimental de AA, futuros ensaios precisam ser realizados a fim de comprovar este benefício a longo prazo.

Não Tratado com CTIPDh (6 meses)

Tratado com CTIPDh (6 meses)

Figura 47- Fotomicrografia dos cortes de MO do grupo a longo prazo (6 meses) corados com hematoxilina e eosina nos aumentos de 100x e 200x. Em a1 e a2 MO do grupo não tratado a longo prazo (6 meses). Em b1 e b2 MO do grupo tratado a longo prazo (6 meses). As figuras a1 e a2 mostram hipocelularidade medular

com substituição de gordura (seta vermelha). As figuras b1 e b2 mostra o canal medular preenchido por elementos hematopoiéticos.

Também foi analisada a morte celular neste ambiente hematopoiético a longo prazo. Os resultados revelaram que a longo prazo a exposição à irradiação ainda tem efeito na MO, devido a a maior expressão de p53 no grupo não tratado com CTIPD. (figura 48 a1). Enquanto que no grupo tratado com CTIPDh a expressão de p53 foi menor. Assim, podemos dizer que as CTIPDh foram capaz de diminuir o efeito colateral de morte celular provocado pela radiação, e que mesmo após esse período as CTIPDh ainda protegem as células da MO de sofrerem morte induzida por apoptose (figura 48 a1).

A mesma série de marcadores de CTH, de matriz extracelular e CTM e seus progenitores utilizados no grupo de curta duração (D62) foram analisados no grupo a longo prazo. Em geral, a expressões tanto de marcadores estromais, quanto hematopoiéticos diminuíram levemente no decorrer do tempo (6 meses) em ambos os grupo experimentais, porém não foi identificado diferença significativa quanto a expressão dos anticorpos entre o grupo curta duração (D62) e longa duração (6 meses). Pode-se dizer então, que as células intrínsecas da MO foram capazes de regenerarem-se após a exposição à radiação de 6 Gy a longo prazo. No mais, pode ser que seja necessário aumentar a dose de irradiação para o estudo a longo prazo, para que a ablação seja mais agressiva a tal ponto que impeça a recuperação endógena a longo prazo (figura 48 a2-a10).

Figura 48 - Gráficos em percentagem de células p53+ (a1), Fibronectina+ (a2), Nestina+ (a3), CD105+ (a4), Sca-1+ (a5), c-kit+ (a6), CD34+ (a7), CD44+ (a8), CD45+ (a9) e CD90+ (a10) (imunopositivas) em relação aos grupos discriminados como: Tratado com CTIPDh (D62); Tratado com CTIPDh (6 meses); Não Tratado com CTIPDh (D62) e Não Tratado com CTIPDh (6 meses). Os gráficos demonstram o mesmo perfil de expressão para todos os marcadores. Gráficos gerados pelo software GraphPad Prism 5 (GRAPHPAD; PRISM, 2007).

5.3.11 Outros benefícios do transplante de CTIPDh em camundongos irradiados funcional das CTIPDh

A radiação iônica afeta biologicamente todo o organismo de um ser vivo, sendo a queda de pelos e cabelo um dos primeiros danos perceptíveis. As reações agudas da radiação impactam na injúria de um tecido normal e estão relacionados ao estresse oxidativo e inflamação que altera o microambiente, o qual inclui a sensibilidade dos nichos das CT (GLOBUS et al., 2012). Além dos danos a MO, observamos que após a irradiação os animais não tratado com CTIPDh apresentaram significativa perda de pelo e inclusive das vibrissas (figura 49 II).

Enquanto que os animais que receberam o tratamento com CTPDh tiveram os pelos e vibrissas preservados até o fim do estudo (D62) (figura 49 I). Prévio estudo demonstrou que a radiação de corpo inteiro na dose de 6 Gy promove injúria na pele (em torno de 2%) e que o transplante de CTM diretamente na área lesionada regenera rapidamente a lesão promovida pela radiação (HAO et al., 2009)

Este resultado possui uma grande aplicabilidade no tratamento dos efeitos colaterais da radiação, pois a maioria dos pacientes que são expostos a doses terapêuticas de irradiação apresentam alopecia (GLOBUS et al., 2012). Desta forma, estas células podem ser utilizadas como uma futura ferramenta terapêutica para prevenir a queda de pelo e/ou cabelo.

Figura 49 - Fotomicrografia do efeito da radiação iônica nos camundongos do grupo tratado com CTIPDh (I) e grupo não tratado com CTIPDh (II). As imagens I mostram a presença de pelos (seta vermelha) e bigodes (seta branca) dos animais. As imagens II a ausência de pelos (seta vermelha) e bigodes (seta branca) dos animais.

6 CONCLUSÃO

Baseado nos dados apresentados podemos concluir que:

a) A ciclofosfamida não foi suficiente na indução da AA, pois não observamos a redução significativa nos valores de eritrócitos e hipocelularidade da MO até 130 dias após o término da administração da droga. Os valores dos eritrócitos no sangue periférico se mantiveram dentro do valor de referência para os camundongos normais (WEISS; WARDROP, 2010). Portanto, consideramos este modelo não apropriado para seguir com nosso estudo;

b) A radiação iônica com a dose de 6 Gy para induzir o modelo experimental da AA foi eficiente a curto prazo (62 dias), resultando na eritropenia e ablação medular total e/ou parcial nos camundongos, pois as células intrínsecas (dos animais não tratados) não foram capazes de promover a regeneração do tecido hematopoiético, e assim tornando este modelo importante para a validação do estudo em questão;

c) Este modelo, então, foi utilizado para realizar o xenotransplante com CTIPDh, sem o uso do protocolo de imunossupressão. Observamos que os três xenotransplantes que utilizaram o mesmo número das células (1×10^6) foram seguras e aparentemente não causaram alterações comportamentais (injeção de comida e água, defecação) relevantes;

d) A radiação iônica na dose de 6 Gy não é um bom modelo para estudos a longo prazo (6 meses), pois os animais do grupo sem tratamento apresentaram recuperação dos parâmetros hematológicos;

e) A CTIPDh beneficiou o ganho de massa corpórea dos animais após a radiação na dose de 6 Gy;

f) A CTIPDh acelerou a recuperação do sistema hematopoiético dos animais submetidos à radiação na dose de 6 Gy;

g) A CTIPDh promoveu a recuperação dos índices hematimétricos, bem como a celularidade da MO nos animais submetidos à radiação na dose de 6 Gy;

h) A CTIPDh demonstrou enxertia na MO e no baço dos camundongos, porém como a análise foi realizada 30 dias após o último transplante, e sabendo que a substituição das células hematopoiéticas ocorrem no período de aproximadamente de duas semanas, precisamos ainda refazer a análise de enxertia das CTIPDh logo após o transplante;

i) A CTIPDh estimulou e/ou protegeram as CTH, precursores e progenitores hematopoéticos, progenitores endoteliais e CTM;

j) A CTIPDh possui um efeito anti-apoptótico nas células da MO após a exposição da dose de radiação de 6 Gy

As síndromes hematopoiéticas, como por exemplo, a AA é uma das principais causas de mortalidade em consequência a exposição de radiação na dose de 1 a 10 Gy (WASELENKO et al., 2004). Desta forma, fontes alternativas que auxiliem na recuperação das células da MO são almejadas. Este estudo demonstrou que a dose 6 Gy, é um modelo para estudos de AA em camundongos a curto prazo (62 dias) e que as CTIPDh transplantadas via intraperitoneal são capazes de acelerar a hematopoiese e prevenir a morte celular (apoptose) das células da MO, e consequentemente, prevenir a morte dos animais. De uma forma geral, nossos dados reforçam a ideia para prosseguir os estudos da utilização das CTIPDh em AA, bem como em outras doenças hematológicas.

REFERÊNCIAS*

- ALMOHAMAD, K.; THIRY, A.; HUBIN, F.; BELAID, Z.; BONIVER, J.; DEFRESNE, M. P. Marrow stromal cell recovery after radiation-induced aplasia in mice. **International Journal of Radiation Biology**, v. 79, n. 4, p. 259-267, 2003.
- ALTIN, J. G.; SLOAN, E. K. The role of CD45 and CD45-associated molecules in T cell activation. **Immunology & Cell Biology**, v. 75, n. 5, 1997.
- ANDRADE, A.V. G.; RIEWALDT, J.; WEHNER, R.; SCHMITZ, M.; ODENDAHL, M.; TONN, T. Gamma irradiation preserves immunosuppressive potential and inhibits clonogenic capacity of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 18, n. 6, p. 1184-1193, 2014.
- ANGELOPOULOU, M.; NOVELLI, E.; GROVE, J. E.; RINDER, H. M.; CIVIN, C.; CHENG, L.; KRAUSE, D. S. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. **Experimental Hematology**, v. 31, n. 5, p. 413-420, 2003.
- BACIGALUPO, A.; PASSWEG, J. Diagnosis and treatment of acquired aplastic anemia. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 23, n. 2, p. 159-170, 2009.
- BAJADA, S.; MAZAKOVA, I.; RICHARDSON, J. B.; ASHAMMAKHI, N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 2, n. 4, p. 169-183, 2008.
- BAZHANOV, N.; YLOSTALO, J. H.; BATOSH, T. J.; TIBLOW, A.; MOHAMMADIPPOR, A.; FOSKETT, A.; PROCKOP, D. J. Intraperitoneally infused human mesenchymal stem cells form aggregates with mouse immune cells and attach to peritoneal organs. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 1, 2016.
- BRADFUTE, S. B.; GRAUBERT, T. A.; GOODELL, M. A. Roles of Sca-1 in hematopoietic stem/progenitor cell function. **Experimental Hematology**, v. 33, n. 7, p. 836-843, 2005.
- BUENO, C.; ROLDAN, M.; ANGUITA, E.; ROMERO-MOYA, D.; MARTÍN-ANTONIO, B.; ROSU-MYLES, M.; FUSTER, J. L. Bone marrow mesenchymal stem cells from patients with aplastic anemia maintain functional and immune properties and do not contribute to the pathogenesis of the disease. **Haematologica**, v. 99, n. 7, p. 1168-1175, 2014.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BURROWS, F. J.; DERBYSHIRE, E. J.; TAZZARI, P. L.; AMLLOT, P.; GAZDAR, A. F.; KING, S. W.; THORPE, P. E. Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: implications for diagnosis and therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 1, n. 12, p. 1623-1634, 1995.

BYDLOWSKI, Sergio P.; DEBES, A. A.; MASELLI, L. M.; JANZ, F. L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. supl 1, p. 25-35, 2009.

CAO, H.; HEAZLEWOOD, S. Y.; WILLIAMS, B.; CARDOZO, D.; NIGRO, J.; OTEIZA, A.; NILSSON, S. K. The role of CD44 in fetal and adult hematopoietic stem cell regulation. **Haematologica**, v. 101, n. 1, p. 26-37, 2016.

CAPLAN, A. I.; DENNIS, J. E. Mesenchymal stem cells as throphic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 98, n. 5, p. 1076-1084, 2006.

CELISO, C. L.; SCADDEN, D. T. The haematopoietic stem cell niche at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 21, p. 3529-3535, 2011

CHADIPIRALLA, K.; YOCHIM, J. M.; BAHULEYAN, B.; HUANG, C. Y. C.; GARCIA-GODOY, F.; MURRAY, P. E.; STELNICKI, E. J. Osteogenic differentiation of stem cells derived from human periodontal ligaments and pulp of human exfoliated deciduous teeth. **Cell and Tissue Research**, v. 340, n. 2, p. 323-333, 2010.

CHEN, J. Animal models for acquired bone marrow failure syndromes. **Clinical Medicine & Research**, v. 3, n. 2, p. 102-108, 2005.

COHEN-JONATHAN, E.; BERNHARD, E. J.; MCKENNA, W. G. How does radiation kill cells?. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 1, p. 77-83, 1999.

DAINIAK, N. Hematologic consequences of exposure to ionizing radiation. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p. 513-528, 2002.

DE LATOUR, R. P. Cyclophosphamide in severe aplastic anemia?. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2758-2760, 2014.

DESIMONE, J. N.; BENGTSSON, U.; WANG, X.; LAO, X. Y.; REDPATH, J. L.; SATANBRIDGE, E. J. Complexity of the mechanisms of initiation and maintenance of DNA damage-induced G2-phase arrest and subsequent G1-phase arrest: TP53-dependent and TP53-independent roles. **Radiation Research**, v. 159, n. 1, p. 72-85, 2003.

DEUS, G. C.; NORMANTON, M.; HAMERSCHLAK, N.; KONDO, A. T.; RIBEIRO, A. A. F.; GOLDBERG, A. C.; MARTI, L. C. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells obtained from reusable and disposable bone marrow collection filters. **Einstein**, v. 10, n. 3, p. 296-301, 2012.

DEZERN, A. E.; BRODSKY, R. A. Clinical management of aplastic anemia. **Expert Review of Hematology**, v. 4, n. 2, p. 221-230, 2011.

DOLBERG, O. J.; LEVY, Y. Idiopathic aplastic anemia: diagnosis and classification. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 4, p. 569-573, 2014.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DONOVAN, P. J.; GEARHART, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 92-97, 2001.

DROUET, M.; MOURCIN, F.; GRENIER, N.; DELAUNAY, C.; MAYOL, J. F.; LATAILLADE, J. J.; HÉRODIN, F. Mesenchymal stem cells rescue CD34⁺ cells from radiation-induced apoptosis and sustain hematopoietic reconstitution after coculture and cograftering in lethally irradiated baboons: is autologous stem cell therapy in nuclear accident settings hype or reality?. **Bone Marrow Transplantation**, v. 35, n. 12, p. 1201-1209, 2005.

DUNCAN, A. W.; RATTIS, F. M.; DIMASCIO, L. N.; CONGDON, K. L.; PAZIANOS, G.; ZHAO, C.; REYA T. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. **Nature Immunology**, v. 6, n. 3, p. 314-322, 2005.

ENGLISH, K.; MAHON, B.; WOOD, K. Mesenchymal stromal cells; role in tissue repair, drug discovery and immune modulation. **Current Drug Delivery**, v. 11, n. 5, p. 561-571, 2014.

FOUILLARD, L.; BENSIDHOUM, M.; BORIES, D.; BONTE, H.; LOPEZ, M.; MOSELEY, A. M.; GOURMELON, P. Engraftment of allogeneic mesenchymal stem cells in the bone marrow of a patient with severe idiopathic aplastic anemia improves stroma. **Leukemia**, v. 17, n. 2, p. 474-476, 2003.

FRASCA, D.; GUIDI, F.; ARBITRIO, M.; PIOLI, C.; POCCIA, F.; CICCONE, R.; DORIA, G. Hematopoietic reconstitution after lethal irradiation and bone marrow transplantation: effects of different hematopoietic cytokines on the recovery of thymus, spleen and blood cells. **Bone Marrow Transplantation**, v. 25, n. 4, 2000.

FÜREDER, W.; KRAUTH, M. T.; SPERR, W. R.; SONNECK, K.; SIMONITSCH-KLUPP, I.; MÜLLAUER, L.; VALENT, P. Evaluation of angiogenesis and vascular endothelial growth factor expression in the bone marrow of patients with aplastic anemia. **The American Journal of Pathology**, v. 168, n. 1, p. 123-130, 2006.

GAMAN, A.; GAMAN, G.; BOLD, A. Acquired aplastic anemia: correlation between etiology, pathophysiology, bone marrow histology and prognosis

factors. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 50, n. 4, p. 669-674, 2009.

GAO, J.; DENNIS, J. E.; MUZIC, R. F.; LUNDBERG, M., CAPLAN, A. I. The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. **Cells Tissues Organs**, v. 169, n. 1, p. 12-20, 2001.

GARCÍA-CASTRO, J.; TRIGUEROS, C.; MADRENAS, J.; PEREZ-SIMON, J. A.; RODRIGUEZ, R.; MENENDEZ, P. Mesenchymal stem cells and their use as cell replacement therapy and disease modelling tool. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 6b, p. 2552-2565, 2008.

GIBSON, F. M.; MICHAEL, ANDREWS, C.; DIAMANTI, P.; RIZZO, S.; MACHARIA, G.; GONDON-SMITH, E. C.; TURTON, J. A new model of busulphan-induced chronic bone marrow aplasia in the female BALB/c mouse. **International journal of experimental pathology**, v. 84, n. 1, p. 31-48, 2003

GIROLAMO, L.; LUCARELLI, E.; ALESSANDRI, G.; ANTONIETTA AVANZINI, M.; ESTER BERNARDO, M.; BIAGI, E.; LOCATELLI, F. Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A New Cells as Drugs Paradigm. Efficacy and Critical Aspects in Cell Therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 13, p. 2459-2473, 2013.

GLOBUS R. K.; CAIOZZO V. J.; ACHARYA, M; FIKE J. R.; LIMOLI, C. L. Redox regulation of stem cell compartments: The convergence of radiation-induced normal tissue damage and oxidative stress. In: SPITZ D. R.; DORNFELD K. J.; GIUS D.; KRISHNAN K. **Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice: Cancer**. Totowa: Humana Press, 2011. p.169–192.

GNECCHI, M.; ZHANG, Z.; NI, A.; DZAU, V. J. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. **Circulation Research**, v. 103, n. 11, p. 1204-1219, 2008.

GOVINDASAMY, V.; RONALD, V. S.; ABDULLAH, A. N.; NATHAN, K. G.; AZIZ, Z. A.; ABDULLAH, M.; BHONDE, R. R. Differentiation of dental pulp stem cells into islet-like aggregates. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 5, p. 646-652, 2011.

GRAMMATICOS, P.; GIANNOULA, E.; FOUNTOS, G. P. Acute radiation syndrome and chronic radiation syndrome. **Hellenic Journal of Nuclear Medicine**, v. 16, n. 1, p. 56-59, 2012.

GRAPHPAD, GraphPad Prism 5. Version 5.00 [S.I.]: GraphPad Incorporation, 2007. 1 CD-ROM.

HAO, L., WANG, J., YAN, G., DONG, S., DENG, J., CHENG, T. Transplantation of BMSCs expressing hPDGF-A/hBD2 promotes wound healing in rats with combined radiation-wound injury. **Gene Therapy**, v. 16, n. 1, p. 34-42, 2009.

HARMS-RINGDAHL, M.; NICOTERA, P.; RADFORD, I. R. Radiation induced apoptosis. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 366, n. 2, p. 171-179, 1996.

HASSAN, Z.; HASSAN, M.; HELLSTROM-LINDBERG, E. The pharmacodynamic effect of busulfan in the P39 myeloid cell line in vitro. **Leukemia**, v. 15, n. 8, p. 1240-1247, 2001.

HEISSIG, B., OHKI, Y., SATO, Y., RAFII, S., WERB, Z., HATTORI, K. A role for niches in hematopoietic cell development. **Hematology**, v. 10, n. 3, p. 247-253, 2005.

HERZOG, E. L.; CHAI, L.; KRAUSE, D. S. Plasticity of marrow-derived stem cells. **Blood**, v. 102, n. 10, p. 3483-3493, Nov. 2003.

HOLMES, C.; STANFORD, W. L. Concise review: stem cell antigen-1: expression, function, and enigma. **Stem Cells**, v. 25, n. 6, p. 1339-1347, 2007.

HU, K. X., SUN, Q. Y., GUO, M., AI, H. S. The radiation protection and therapy effects of mesenchymal stem cells in mice with acute radiation injury. **The British Journal of Radiology**, v. 83, n. 985, p. 52-58, 2010

ISHIDA, H., KATO, M., KUDO, K., TAGA, T., TOMIZAWA, D., MIYAMURA, T., OGAWA, A. Comparison of outcomes for pediatric patients with acute myeloid leukemia in remission and undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation with myeloablative conditioning regimens based on either intravenous busulfan or total-body irradiation: A report from the Japanese Society for Hematopoietic Cell Transplantation (JSHCT). **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 21, n. 12, p. 2141-2147, 2015.

ITO, C. Y., LI, C. Y., BERNSTEIN, A., DICK, J. E., STANFORD, W. L. Hematopoietic stem cell and progenitor defects in Sca-1/Ly-6A-null mice. **Blood**, v. 101, n. 2, p. 517-523, 2003.

ITO, T.; TAJIMA, F.; OGAWA, M. Developmental changes of CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. **Experimental Hematology**, v. 28, n. 11, p. 1269-1273, 2000.

JIANG Y., JAHAGIRDAR, B. N., REINHARDT, R. L., SCHWARTZ, R. E., KEENE, C. D., ORTIZ-GONZALEZ, X. R., DU, J. Verfaillie Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature** 418: 41–49. 2002.

JIN-FU, W. A. N. G., YI-FAN, W. U., JENNY, H., MCNIECE, I. K. Ex vivo expansions and transplantations of mouse bone marrow-derived hematopoietic stem/progenitor cells. **Journal of Zhejiang University Science**, v. 5, n. 2, p. 157-163, 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido Ósseo. In: JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ª Edição. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. Capítulo 8, p. 136-153.

KEBRIAIEI, P.; ROBINSON, S. Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of acute and chronic graft versus host disease. **Frontiers in Oncology**, v. 1, 2011.

KERKIS, I.; CAPLAN, A. I. Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 18, n. 2, p. 129-138, 2012.

KERKIS, I., AMBROSIO, C. E., KERKIS, A., MARTINS, D. S., ZUCCONI, E., FONSECA, S. A., VIEIRA, N. M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to Golden Retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic. **Journal of Translational Medicine**, v. 6, n. 35, p. 1-13, 2008.

KERKIS, I., KERKIS, A., DOZORTSEV, D., STUKART-PARSONS, G. C., GOMES MASSIRONI, S. M., PEREIRA, L. V., CERRUTI, H. F. Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. **Cells Tissues Organs**, v. 184, n. 3-4, p. 105-116, 2006.

KIM, E.; KIM, N.; CHO, S. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 1, p. e2, 2013.

KLEIN, D., MEISSNER, N., KLEFF, V., JASTROW, H., YAMAGUCHI, M., ERGÜN, S., JENDROSSEK, V. Nestin (+) tissue-resident multipotent stem cells contribute to tumor progression by differentiating into pericytes and smooth muscle cells resulting in blood vessel remodeling. **Frontiers in Oncology**, v. 4, 2014.

KOPP, H. G., AVECILLA, S. T., HOPPER, A. T., SHMELKOV, S. V., RAMOS, C. A., ZHANG, F., RAFII, S. Tie2 activation contributes to hemangiogenic regeneration after myelosuppression. **Blood**, v. 106, n. 2, p. 505-513, 2005.

LAI, Y., SUN, Y., SKINNER, C. M., SON, E. L., LU, Z., TUAN, R. S., CHEN, X. D. Reconstitution of marrow-derived extracellular matrix ex vivo: a robust culture system for expanding large-scale highly functional human mesenchymal stem cells. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 7, p. 1095-1107, 2010.

LE BLANC, K.; RINGDEN, O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. **Journal of Internal Medicine**, v. 262, n. 5, p. 509-525, 2007.

LE BLANC, K., FRASSONI, F., BALL, L., LOCATELLI, F., ROELOFS, H., LEWIS, I., DINI, G. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. **The Lancet**, v. 371, n. 9624, p. 1579-1586, 2008.

LE DOUARIN, N. M.; CALLONI, G. W.; DUPIN, E. The stem cells of the neural crest. **Cell Cycle**, v. 7, n. 8, p. 1013-1019, 2008.

LE DOUARIN, N. M.; CREUZET, S.; COULY, G.; DUPIN, E. Neural crest cell plasticity and its limits. **Development**, v. 131, n. 19, p. 4637-4650, 2004.

LE DOUARIN, N. M.; DUPIN, E. Multipotentiality of the neural crest. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, n. 5, p. 529-536, 2003.

LEMISCHKA, I. R. Stem cell biology: a view toward the future. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1044, n. 1, p. 132-138, 2005.

LEND AHL, U.; ZIMMERMAN, L. B.; MCKAY, R. DG. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. **Cell**, v. 60, n. 4, p. 585-595, 1990.

LINERO, I.; CHAPARRO, O. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e107001, 2014.

LIU, H. Y.; LIU, T. T. Research Progress on Pathogenesis of Aplastic Anemia. **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi/Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui= Journal of Experimental Hematology/Chinese Association of Pathophysiology**, v. 23, n. 4, p. 1216, 2015.

LIU, W. C., WANG, S. C., TSAI, M. L., CHEN, M. C., WANG, Y. C., HONG, J. H., CHIANG, C. S. Protection against radiation-induced bone marrow and intestinal injuries by Cordyceps sinensis, a Chinese herbal medicine. **Radiation Research**, v. 166, n. 6, p. 900-907, 2006.

LIZIER, N., KERKIS, A., GOMES, C. M., HEBLING, J., OLIVEIRA, C. F., CAPLAN, A. I., KERKIS, I. Scaling-up of dental pulp stem cells isolated from multiple niches. **PloS One**, v. 7, n. 6, p. e39885, 2012.

LOTFINEGAD, P., SHAMSASENJAN, K., MOVASSAGHPOUR, A., MAJIDI, J., BARADARAN, B. Immunomodulatory Nature and Site Specific Affinity of Mesenchymal Stem Cells: a Hope in Cell Therapy. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4, n. 1, p. 5, 2014.

MACVITTIE, T. J.; FARESE, A. M.; JACKSON III, W. Defining the full therapeutic potential of recombinant growth factors in the post radiation-accident environment: the effect of supportive care plus administration of G-CSF. **Health Physics**, v. 89, n. 5, p. 546-555, 2005.

MAJUMDAR, M. K., THIEDE, M. A., MOSCA, J. D., MOORMAN, M., GERSON, S. L. Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 176, n. 1, p. 57-66, 1998.

MALUF, E. M., PASQUINI, R., ELUF, J. N., KELLY, J., KAUFMAN, D. W. Aplastic anemia in Brazil: incidence and risk factors. **American Journal of Hematology**, v. 71, n. 4, p. 268-274, 2002.

MARSH, J. C. W., BALL, S. E., CAVENAGH, J., DARBYSHIRE, P., DOKAL, I., GORDON-SMITH, E. C., KILLICK, S. B. Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. **British Journal of Haematology**, v. 147, n. 1, p. 43-70, 2009.

MAUCH, P.; CONSTINE, L.; GREENBERGER, J.; KNOSPE, W.; SULLIVAN, J.; LIESVELD, J. L.; DEEG, H. J. Hematopoietic stem cell compartment: acute and late effects of radiation therapy and chemotherapy. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**, v. 31, n. 5, p. 1319-1339, 1995.

MEDEIROS, L. A.; PASQUINI, R. Anemia aplásica adquirida e anemia de Fanconi-Diretrizes Brasileiras em Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 1, p. 40-45, 2010.

MENG, A.; WANG, Y.; VAN ZANT, G.; ZHOU, D. Ionizing radiation and busulfan induce premature senescence in murine bone marrow hematopoietic cells. **Cancer Research**, v. 63, n. 17, p. 5414-5419, 2003.

METTLER, F. A., KOENIG, T. R., WAGNER, L. K., KELSEY, C. A. Radiation injuries after fluoroscopic procedures. **Seminars in Ultrasound, CT and MRI**. WB Saunders, v. 23, n.5, p. 428-442, 2002.

MEZNARICH, H. K., MCCOY, L. S., BALE, T. L., STIEGLER, G. L., SIKOV, M. R. Brain fibronectin expression in prenatally irradiated mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, v. 40, n. 2-3, p. 263-275, 1993.

MILLER, D. W., GRAULICH, W., KARGES, B., STAHL, S., ERNST, M., RAMASWAMY, A., ADAMKIEWICZ, J. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF- β -receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. **International Journal of Cancer**, v. 81, n. 4, p. 568-572, 1999.

MORRISON, S. J.; UCHIDA, N.; WEISSMAN, I. L. The biology of hematopoietic stem cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, n. 1, p. 35-71, 1995.

MOURCIN, F., GRENIER, N., MAYOL, J. F., LATAILLADE, J. J., SOTTO, J. J., HÉRODIN, F., DROUET, M. Mesenchymal stem cells support expansion of in vitro irradiated CD34+ cells in the presence of SCF, FLT3 ligand, TPO and IL3: potential application to autologous cell therapy in accidentally irradiated victims. **Radiation Research**, v. 164, n. 1, p. 1-9, 2005.

NASSIRI, F., CUSIMANO, M. D., SCHEITHAUER, B. W., ROTONDO, F., FAZIO, A., YOUSEF, G. M., LLOYD, R. V. Endoglin (CD105): a review of its role in angiogenesis and tumor diagnosis, progression and therapy. **Anticancer Research**, v. 31, n. 6, p. 2283-2290, 2011.

OGAWA, M., TAKIMA, F., ITO, T., SATO, T., LAVER, J., H., DEGUCHI, T. CD34 expression by murine hematopoietic stem cells. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 938, n. 1, p. 139-145, 2001.

OKADA, S., NAKAUCHI, H., NAGAYOSHI, K., NISHIKAWA, S. L., MIURA, Y., SUDA, T.. In vivo and in vitro stem cell function of c-kit-and Sca-1-positive murine hematopoietic cells. **Blood**, v. 80, n. 12, p. 3044-3050, 1992.

OLNES, Matthew J., SCHEINBERG, P., CALVO, K. R., DESMOND, R. TANG, Y., DUMITRIU, B., LOZIER, J. Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 367, n. 1, p. 11-19, 2012.

PAREKKADAN, B.; MILWID, J. M. Mesenchymal stem cells as therapeutics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, p. 87-117, 2010.

PASQUINI, R. Transplante de medula óssea em anemias aplásticas. **Medicina-Ribeirão Preto**, v. 33, p. 219-231, 2000.

PENG, R., WANG, D., WANG, B., XIA, G., LI, Y., XING, C., CUI, Y. Apoptosis of hemopoietic cells in irradiated mouse bone marrow. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of The International Society for Environmental Toxicology and Cancer**, v. 18, n. 4, p. 305-308, 1998.

POCHAMPALLY, R. Colony forming unit assays for MSCs. **Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols**, p. 83-91, 2008.

POLOVICH, M. Minimizing Occupational Exposure to Antineoplastic Agents. **Journal of Infusion Nursing**, v. 39, n. 5, p. 307-313, 2016.

RODRÍGUEZ, R., GARCÍA-CASTRO, J., TRIGUEROS, C., ARRANZ, M. G., MENÉNDEZ, P. Multipotent mesenchymal stromal cells: clinical applications and cancer modeling. In: **Stem Cell Transplantation**. Springer US, p. 187-205, 2012.

SAKAI, V. T.; ZHANG, Z.; DONG, Z.; NEIVA, K. G.; MACHADO, M. A. A. M.; SHI, S.; NÖR, J. E. SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 8, p. 791-796, 2010.

SALEM, H. K.; THIEMERMANN, C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. **Stem Cells**, v. 28, n. 3, p. 585-596, 2010.

SANDOZ – Divisão Farmacêutica. Guia do Usuário: Informações para melhor manuseio do paciente transplantado – **Sandimmun Neoral**. 1998.

SCHEINBERG, P. Aplastic anemia: therapeutic updates in immunosuppression and transplantation. **ASH Education Program Book**, v. 2012, n. 1, p. 292-300, 2012.

SCHEINBERG, P. Tratamento atual da anemia aplástica adquirida grave. **Einstein**, v. 9, n.2 (Pt 1), p.229-235, 2011.

SCHEINBERG, P., NUNEZ, O., WEINSTEIN, B., SCHEINBERG, P., WU, C. O., YOUNG, N. S. Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naive, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia. **Blood**, v. 119, n. 2, p. 345-354, 2012.

SCHEINBERG, P.; TOWNSLEY, D.; DUMITRIU, B.; WEINSTEIN, B.; DAPHTARY, M.; YOUNG N. S. Moderate-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia has significant toxicity and does not prevent relapse and clonal evolution. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2820-2823, 2014.

SCHUENING, F. G., STORB, R., GOEHLE, S., GRAHAM, T. C., APPELBAUM, F. R., HACKMAN, R., SOUZA, L. M. Effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hematopoiesis of normal dogs and on hematopoietic recovery after otherwise lethal total body irradiation. **Blood**, v. 74, n. 4, p. 1308-1313, 1989.

SOCIÉ, G., CLIFT, R. A., BLAISE, D., DEVERGIE, A., RINGDEN, O., MATIN, P. J., SULLIVAN, K. M. Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. **Blood**, v. 98, n. 13, p. 3569-3574, 2001.

SOUZA, C. F. D., NAPOLI, P. D., HAN, S. W., LIMA, V. C. D., CARVALHO, A. C. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, São Paulo, v. 18, n. 3, p. 1-8, Jul. 2010.

SUZUKI, S., NAMIKI, J., SHABATA, S., MASTUZAKI, Y., OKANO, H. The neural stem/progenitor cell marker nestin is expressed in proliferative endothelial cells, but not in mature vasculature. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 58, n. 8, p. 721-730, 2010.

SYLVESTER, K. G.; LONGAKER, M. T. Stem cells: review and update. **Archives of Surgery**, v. 139, n. 1, p. 93-99, 2004.

TELES, R. A. D. S., VERAS, D. C. D. A., SOARES, M. D. F. V., AUGUSTO, A. P. A., ALENCAR JÚNIOR, C. A. Aplastic Anemia and Pregnancy: A Case Report. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24, n. 5, p. 343-346, 2002.

TREESTAR, FlowJo, LCC. Version 10.1. [S.l.]: TreeStar Incorporation, 2015. 1 CD-ROM.

VAN OS, R; DE HAAN, G.; DYKSTRA, B. J. Hematopoietic stem cell quiescence: yet another role for p53. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 1, p. 7-8, 2009.

VIEIRA, D. P. **Avaliação dos efeitos da inibição de cadeias inflamatórias e da suplementação exógena de CXCL12 na hematopoiese de modelos experimentais expostos a doses letais ou subletais de radiação gama.** 2007. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

WASELENKO, Jamie K. et al. Medical management of the acute radiation syndrome: recommendations of the Strategic National Stockpile Radiation Working Group. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, n. 12, p. 1037-1051, 2004.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J. **Schalm's veterinary hematology.** 6ª Edição. Filadélfia e Baltimore: Wiley Black-Well, 2010. 1232 p.

WHETTON, A. D.; GRAHAM, G. J. Homing and mobilization in the stem cell niche. **Trends in Cell Biology**, v. 9, n. 6, p. 233-238, 1999.

WIKSTRÖM, P., LISSBRANT, I. F., STATIN, P., EGEVAD, L., BERGH, A. Endoglin (CD105) is expressed on immature blood vessels and is a marker for survival in prostate cancer. **The Prostate**, v. 51, n. 4, p. 268-275, 2002.

WILLIAMS, A. R.; HARE, J. M. Mesenchymal stem cells biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. **Circulation Research**, v. 109, n. 8, p. 923-940, 2011.

WILLIAMS, J. P., BROWN, S. L., GEORGES, G. E., HAUER-JENSEN, M., HILL, R. P., HUSER, A. K., MOULDER, J. E. Animal models for medical countermeasures to radiation exposure. **Radiation Research**, v. 173, n. 4, p. 557-578, 2010.

YE, J. Y., CHAN, G. C. F., QIAO, L., LIAN, Q., MENG, F. Y., LUO, X. Q., CHONG, B. H. Platelet-derived growth factor enhances platelet recovery in a murine model of radiation-induced thrombocytopenia and reduces apoptosis in megakaryocytes via its receptors and the PI3-k/Akt pathway. **Haematologica**, v. 95, n. 10, p. 1745-1753, 2010.

YOUNG, N. S. Acquired aplastic anemia. **Annals of Internal Medicine**, v. 136, n. 7, p. 534-546, 2002.

YOUNG, N. S. Aplastic anemia, myelodysplasia, and related bone marrow failure syndromes. **Harrisons Principles of Internal Medicine**, v. 16, n. 1, p. 617, 2005.

YOUNG, N. S.; KAUFMAN, D. W. The epidemiology of acquired aplastic anemia. **Haematologica**, v. 93, n. 4, p. 489-492, 2008.

YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 19, p. 1365-1372, 1997.

ZHANG, J., ZHOU, S., ZHOU, Y., FENG, F., WANG, Q., ZHU, X., HUANG, X. Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells (ADSCs) with the Potential to Ameliorate Platelet Recovery, Enhance Megakaryopoiesis and Inhibit Apoptosis of Bone Marrow Cells in a Mouse Model of Radiation-Induced Thrombocytopenia. **Cell Transplantation**, v. 25, n. 2, p. 261-273, 2016.

ZHANG, J., NIU, C., YE, L., HUANG, H., HE, X., TONG, W. G., HARRIS, S. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 836-841, 2003.

ZHAO, K.; LIU, Q. The clinical application of mesenchymal stromal cells in hematopoietic stem cell transplantation. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 9, n. 1, p. 1, 2016.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Anticorpos Primários

Tabela 2 - Anticorpos primários utilizados nos ensaios de citometria de fluxo (FACS) para caracterizar as células de aspirado da MO, imunohistoquímica (IHQ) para caracterizar o tecido medular, imunocitofluorescência (ICF) para caracterizar as células da MO *in vitro* e imunocitoquímica (ICQ) para caracterizar as células de aspirado da MO.

ANTICORPO	ESPÉCIE	MARCA	DILUIÇÃO	FACS	IHQ	ICF	ICQ
CD 34	Cabra	Santa Cruz Biotechnology®	1:100	X	X	X	X
CD 44	Rato	AbCam®	1:100	X	X	X	X
CD 45	Rato	AbCam®	1:100	X	X	X	X
CD 90	Rato	AbCam®	1:100	X	X	X	X
CD 105	Coelho	AbCam®	1:200	X			
C-kit	Coelho	Santa Cruz Biotechnology®	1:100	X	X	X	X
Fibronectina	Coelho	Dako®	1:200	X	X	X	X
Nestina	Coelho	AbCam®	1:200	X	X	X	X
Núcleo Humano	Camundongo	AbCam®	1:500		X		
p53	Coelho	AbCam®	1:200	X			
Sca-1	Rato	Abcam®	1:100	X	X	X	X
Vimentina	Cabra	Santa Cruz Biotechnology®	1:100			X	

APÊNDICE B – Anticorpos Secundários

Tabela 3- Anticorpos secundários utilizados nos ensaios de citometria de fluxo (FACS) para caracterizar as células de aspirado da MO, imunohistoquímica (IHQ) para caracterizar o tecido medular, imunocitofluorescência (ICF) para caracterizar as células da MO *in vitro* e imunocitoquímica (ICQ) para caracterizar as células de aspirado da MO.

ANTICORPO	ESPÉCIE	MARCA	DILUIÇÃO	FACS	IHQ	ICF	ICQ
Anti-Goat IgG (H+L) (Alexa Fluor® 647 conjugate)	Cabra	ThermoFisher Scientific®	1:200	X			
Anti-Goat IgG (FITC conjugate)	Cabra	Santa Cruz Biotechnology®	1:100			X	
Anti-Goat IgG (HRP conjugate)	Cabra	Dako®	1:100		X		X
Anti-Rabbit IgG (H+L) (Alexa Fluor® 633 conjugate)	Coelho	ThermoFisher Scientific®	1:200	X			
Anti-Rabbit IgG (FITC conjugate)	Coelho	Santa Cruz Biotechnology®	1:100			X	
Anti-mouse/Anti-Rabbit Envision+ Dual Link (HRP conjugate)	Camundongo/ Coelho	Dako®	-		X		X
Anti-Rat IgG (FITC conjugate)	Rato	Santa Cruz Biotechnology®	1:100	X		X	
Anti-Rat IgG (HRP conjugate)	Rato	Dako®	1:100		X		X

APÊNDICE C – Hemograma Completo

Tabela 4– Tabelas dos valores dos índices hematimétricos encontrados no hemograma completo dos 3 grupos experimentais realizados ao longo desse estudo, discriminados como: antes da irradiação (D0); 48 horas após a irradiação (D2); e 15 dias após cada transplante com CTIPDh, primeiro transplante (D17); segundo transplante (D32) e 30 dias após o terceiro transplante (D62) dos grupos: Tratado com CTIPDh (T) e Não Tratado com CTIPDh (NT).

1º Grupo Experimental

HEMOGRAMA										
	D0									
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	15.4X10 ³ /μL	15.2X10 ³ /μL	11.5X10 ³ /μL	12.0X10 ³ /μL	8.7X10 ³ /μL	7.0X10 ³ /μL	7.4X10 ³ /μL	8.6X10 ³ /μL	10.2X10 ³ /μL	8.6X10 ³ /μL
Lymph	10.7X10 ³ /μL	10.9X10 ³ /μL	8.5X10 ³ /μL	8.7X10 ³ /μL	6.4X10 ³ /μL	5.1X10 ³ /μL	5.6X10 ³ /μL	6.4X10 ³ /μL	7.7X10 ³ /μL	6.6X10 ³ /μL
Mon	0.8X10 ³ /μL	0.8X10 ³ /μL	0.7X10 ³ /μL	0.5X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL
Gran	3.9X10 ³ /μL	3.5X10 ³ /μL	2.3X10 ³ /μL	2.8X10 ³ /μL	1.9X10 ³ /μL	1.6X10 ³ /μL	1.5X10 ³ /μL	1.8X10 ³ /μL	2.1X10 ³ /μL	1.7X10 ³ /μL
Lymph %	69.5%	71.9%	74.0%	72.3%	73.8%	73.0%	75.5%	74.0%	75.6%	76.9%
Mon %	5.3%	5.4%	5.9%	4.4%	4.7%	4.0%	4.0%	4.5%	4.3%	3.3%
Gran %	25.2%	22.7%	20.1%	23.3%	21.5%	23.0%	20.5%	21.5%	20.1%	19.8%
RCB	11.41X10 ⁶ /μL	11.23X10 ⁶ /μL	11.26X10 ⁶ /μL	11.69X10 ⁶ /μL	10.94X10 ⁶ /μL	11.66X10 ⁶ /μL	10.91X10 ⁶ /μL	12.60X10 ⁶ /μL	11.53X10 ⁶ /μL	11.20X10 ⁶ /μL
HGB	16.1g/dL	15.5g/dL	15.7g/dL	16.3g/dL	15.4g/dL	16.2g/dL	15.1g/dL	17.0g/dL	15.8g/dL	15.6g/dL
HCT	54.1%	53.2%	53.2%	55.5%	52.1%	55.7%	52.1%	59.2%	54.5%	53.8%
MCV	47.5fL	47.4fL	47.3fL	47.5fL	47.7fL	47.8fL	47.8fL	47.0fL	47.3fL	48.1fL
MCH	14.1pg	13.8pg	13.9pg	13.9pg	14.0pg	13.8pg	13.8pg	13.4pg	13.7pg	13.9pg
MCHC	29.7g/dL	29.1g/dL	29.5g/dL	29.3g/dL	29.5g/dL	29.0g/dL	28.9g/dL	28.7g/dL	28.9g/dL	28.9g/dL
RDW	15.0%	15.3%	14.6%	14.7%	15.3%	15.0%	14.7%	14.6%	15.0%	15.0%
PLT	785X10 ³ /μL	932X10 ³ /μL	1164X10 ³ /μL	1021X10 ³ /μL	1218X10 ³ /μL	894X10 ³ /μL	1199X10 ³ /μL	169X10 ³ /μL	1216X10 ³ /μL	1081X10 ³ /μL
MPV	5.0fL	4.8fL	4.3fL	4.9fL	4.2fL	4.9fL	4.5fL	5.5fL	4.7fL	4.7fL
PDW	16.0	16.0	15.8	15.9	15.7	15.9	15.9	16.8	15.9	15.8
PCT	0.392%	0.447%	0.500%	0.500%	0.511%	0.438%	0.539%	0.092%	0.571%	0.508%

HEMOGRAMA										
D2										
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	4.9 X10 ³ /μL	3.1X10 ³ /μL	5.4X10 ³ /μL	8.8X10 ³ /μL	1.7X10 ³ /μL	4.0X10 ³ /μL	2.8X10 ³ /μL	3.5X10 ³ /μL	4.2X10 ³ /μL	1.3X10 ³ /μL
Lymph	2.7 X10 ³ /μL	1.4X10 ³ /μL	3.6X10 ³ /μL	5.7X10 ³ /μL	1.0X10 ³ /μL	2.5X10 ³ /μL	2.0X10 ³ /μL	1.9X10 ³ /μL	2.4X10 ³ /μL	0.5X10 ³ /μL
Mon	0.3 X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL
Gran	1.9 X10 ³ /μL	1.5X10 ³ /μL	1.6X10 ³ /μL	2.7X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	1.3X10 ³ /μL	0.7X10 ³ /μL	1.5X10 ³ /μL	1.6X10 ³ /μL	0.7X10 ³ /μL
Lymph %	55.2%	45.7%	66.0%	64.5%	57.7%	62.0%	70.3%	53.1%	57.6%	38.4%
Mon %	6.3%	5.5%	4.5%	4.8%	6.3%	5.6%	4.6%	3.3%	4.4%	4.9%
Gran %	38.5%	48.8%	29.5%	30.7%	36.0%	32.4%	25.1%	43.6%	38.0%	56.7%
RCB	10.30 X10 ⁶ /μL	10.15X10 ⁶ /μL	10.06X10 ⁶ /μL	10.15X10 ⁶ /μL	3.66X10 ⁶ /μL	6.87X10 ⁶ /μL	6.00X10 ⁶ /μL	9.34X10 ⁶ /μL	10.09X10 ⁶ /μL	6.51X10 ⁶ /μL
HGB	14.4 g/dL	13.8g/dL	13.4g/dL	14.0g/dL	4.8g/dL	9.0g/dL	8.1g/dL	12.9g/dL	14.0g/dL	8.9g/dL
HCT	50.7%	49.5%	47.8%	48.8%	17.2%	32.2%	28.0%	45.1%	48.9%	32.6%
MCV	49.3 fL	48.8fL	47.6fL	48.1fL	47.2fL	47.0fL	46.8fL	48.3fL	48.5fL	50.1fL
MCH	13.9 pg	13.5pg	13.3pg	13.7pg	13.1Pg	13.1pg	13.5pg	13.8pg	13.8pg	13.6pg
MCHC	28.4 g/dL	27.8g/dL	28.0g/dL	28.6g/dL	27.9g/dL	27.9g/dL	28.9g/dL	28.6g/dL	28.6g/dL	27.3g/dL
RDW	16.7 %	15.4%	15.3%	14.7%	15.0%	15.3%	14.3%	15.0%	15.0%	16.7%
PLT	1586 X10 ³ /μL	1436X10 ³ /μL	1336X10 ³ /μL	2085X10 ³ /μL	401X10 ³ /μL	634X10 ³ /μL	965X10 ³ /μL	1673X10 ³ /μL	1423X10 ³ /μL	925X10 ³ /μL
MPV	5.3 fL	5.3fL	5.0fL	4.9fL	4.8fL	5.6fL	5.0fL	5.0fL	5.0fL	5.4fL
PDW	16.7	16.4	16.2	16.3	16.4	17.1	16.5	16.2	16.2	16.7
PCT	.***%	.***%	%0.668	.***%	0.192%	0.355%	0.482%	.***%	.***%	0.499%

HEMOGRAMA										
D17										
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC		21.7 X10 ³ /μL	46.4 X10 ³ /μL	40.0 X10 ³ /μL	3.8 X10 ³ /μL	32.5 X10 ³ /μL	7.0 X10 ³ /μL	1.0 X10 ³ /μL	13.8 X10 ³ /μL	20.7 X10 ³ /μL
Lymph		19.7 X10 ³ /μL	39.9 X10 ³ /μL	35.5 X10 ³ /μL	3.3 X10 ³ /μL	27.7 X10 ³ /μL	5.0 X10 ³ /μL	0.8 X10 ³ /μL	12.3 X10 ³ /μL	19.0 X10 ³ /μL
Mon		0.5 X10 ³ /μL	2.0 X10 ³ /μL	1.6 X10 ³ /μL	0.1 X10 ³ /μL	1.1 X10 ³ /μL	0.2 X10 ³ /μL	0.0 X10 ³ /μL	0.3 X10 ³ /μL	0.5 X10 ³ /μL
Gran		1.5 X10 ³ /μL	4.5 X10 ³ /μL	2.9 X10 ³ /μL	0.4 X10 ³ /μL	3.7 X10 ³ /μL	1.8 X10 ³ /μL	0.2 X10 ³ /μL	1.2 X10 ³ /μL	1.2 X10 ³ /μL
Lymph %		90.5 %	85.9%	88.8%	87.8%	85.1%	70.8%	77.3%	89.1%	91.6%
Mon %		2.5 %	4.3%	3.9%	1.9%	3.5%	4.0%	3.9%	2.1%	2.5%
Gran %		7.0 %	9.8%	7.3%	10.3%	11.4%	25.2%	18.8%	8.8%	5.9%
RCB		4.86 X10 ⁶ /μL	5.15 X10 ⁶ /μL	5.34 X10 ⁶ /μL	2.86 X10 ⁶ /μL	4.35X10 ⁶ /μL	8.30X10 ⁶ /μL	2.21 X10 ⁶ /μL	5.90 X10 ⁶ /μL	6.57 X10 ⁶ /μL
HGB		7.3 g/dL	8.3 g/dL	8.0 g/dL	3.9 g/dL	6.5 g/dL	12.1 g/dL	2.8 g/dL	8.8 g/dL	9.8 g/dL
HCT		27.6 %	31.7 %	31.2 %	14.2%	24.3%	45.9%	9.6%	34.5%	37.3%
MCV		56.8 fL	61.6 fL	58.5 fL	49.7 fL	56.0 fL	55.4 fL	43.8 fL	58.5 fL	56.8 fL
MCH		15.0 pg	16.1 pg	14.9 pg	13.6 pg	14.9 pg	14.5 pg	12.6 pg	14.9 pg	14.9 pg
MCHC		26.4 g/dL	26.1 g/dL	25.6 g/dL	27.4 g/dL	26.7 g/dL	26.3 g/dL	29.1 g/dL	25.5 g/dL	26.2 g/dL
RDW		19.9 %	23.7 %	19.9 %	15.0 %	16.7 %	21.4%	12.6 %	21.5 %	19.0 %
PLT		86 X10 ³ /μL	218 X10 ³ /μL	193 X10 ³ /μL	208 X10 ³ /μL	457 X10 ³ /μL	772 X10 ³ /μL	25 X10 ³ /μL	478 X10 ³ /μL	79 X10 ³ /μL
MPV		5.6 fL	6.2 fL	6.3 fL	6.5 fL	6.4 fL	6.1 fL	7.0 fL	5.9 fL	6.4 fL
PDW		18.3	18.0	17.7	18.2	17.3	16.8	18.1	17.6	18.1
PCT		0.048 %	0.135%	0.121 %	0.135%	0.292%	0.470%	0.017%	0.282%	0.050%

HEMOGRAMA										
D32										
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	5.0 X10 ³ /μL	3.2 X10 ³ /μL	8.2 X10 ³ /μL	5.5 X10 ³ /μL	4.4 X10 ³ /μL					20.7 X10 ³ /μL
Lymph	2.2 X10 ³ /μL	1.1 X10 ³ /μL	5.7 X10 ³ /μL	1.3 X10 ³ /μL	2.0 X10 ³ /μL					19.0 X10 ³ /μL
Mon	0.3 X10 ³ /μL	0.2 X10 ³ /μL	0.3 X10 ³ /μL	0.3 X10 ³ /μL	0.3 X10 ³ /μL					0.5 X10 ³ /μL
Gran	2.5 X10 ³ /μL	1.9 X10 ³ /μL	2.2 X10 ³ /μL	3.9 X10 ³ /μL	2.1 X10 ³ /μL					1.2 X10 ³ /μL
Lymph %	44.8 %	33.0 %	69.6%	24.5%	45.9%					91.6%
Mon %	5.4 %	6.4 %	3.7%	5.7%	7.5%					2.5%
Gran %	49.8 %	60.6 %	26.7%	69.8%	46.6%					5.9%
RCB	10.05 X10 ⁶ /μL	9.30 X10 ⁶ /μL	10.18 X10 ⁶ /μL	10.06 X10 ⁶ /μL	9.94 X10 ⁶ /μL					6.57 X10 ⁶ /μL
HGB	14.9 g/dL	13.8 g/dL	13.4 g/dL	14.1 g/dL	13.7 g/dL					9.8 g/dL
HCT	51.4 %	49.1 %	47.7 %	49.6 %	48.8%					37.3%
MCV	51.2.8 fL	52.9 fL	46.9 fL	49.4 fL	49.1 fL					56.8 fL
MCH	14.8 pg	14.8 pg	13.1 pg	14.0 pg	13.7 pg					14.9 pg
MCHC	28.9 g/dL	28.1 g/dL	28.0 g/dL	28.4 g/dL	28.0 g/dL					26.2 g/dL
RDW	17.0 %	16.4 %	18.7 %	17.6 %	17.3 %					19.0 %
PLT	1028 X10 ³ /μL	845 X10 ³ /μL	723 X10 ³ /μL	1159 X10 ³ /μL	1052 X10 ³ /μL					79 X10 ³ /μL
MPV	5.0 fL	5.7 fL	5.3 fL	4.6 fL	4.8 fL					6.4 fL
PDW	16.1	16.8	15.9	15.8	16.1					18.1
PCT	0.514 %	0.481 %	0.383%	0.533 %	0.504%					0.050%

HEMOGRAMA										
D62										
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	3.0 X10 ^{3/μL}	8.7 X10 ^{3/μL}	1.7 X10 ^{3/μL}	5.1 X10 ^{3/μL}		1.8 X10 ^{3/μL}	1.1 X10 ^{3/μL}		7.5 X10 ^{3/μL}	4.8 X10 ^{3/μL}
Lymph	2.1 X10 ^{3/μL}	7.2 X10 ^{3/μL}	1.5 X10 ^{3/μL}	3.7 X10 ^{3/μL}		1.3 X10 ^{3/μL}	0.8 X10 ^{3/μL}		5.1 X10 ^{3/μL}	3.1 X10 ^{3/μL}
Mon	0.2 X10 ^{3/μL}	0.2 X10 ^{3/μL}	0.0 X10 ^{3/μL}	0.2 X10 ^{3/μL}		0.1 X10 ^{3/μL}	0.1 X10 ^{3/μL}		0.3 X10 ^{3/μL}	0.2 X10 ^{3/μL}
Gran	0.7 X10 ^{3/μL}	1.3 X10 ^{3/μL}	0.2 X10 ^{3/μL}	1.2 X10 ^{3/μL}		0.4 X10 ^{3/μL}	0.2 X10 ^{3/μL}		2.1 X10 ^{3/μL}	1.5 X10 ^{3/μL}
Lymph %	69.9 %	81.9 %	83.3%	72.7%		71.8%	74.2%		68.4%	64.7%
Mon %	5.9 %	2.6 %	2.5%	4.2%		4.3%	4.6%		3.9%	3.5%
Gran %	24.2 %	15.5 %	14.2%	23.1%		23.9%	21.2%		27.7%	31.8%
RCB	8.31 X10 ^{6/μL}	6.50 X10 ^{6/μL}	4.29 X10 ^{6/μL}	8.02 X10 ^{6/μL}		7.11X10 ^{6/μL}	2.91X10 ^{6/μL}		8.59 X10 ^{6/μL}	9.48 X10 ^{6/μL}
HGB	11.4 g/dL	8.5 g/dL	5.6 g/dL	9.0 g/dL		9.9 g/dL	3.8 g/dL		12.2 g/dL	12.9 g/dL
HCT	46.7 %	33.9 %	23.2 %	45.3 %		37.2%	14.4%		48.3%	46.7%
MCV	56.2 fL	52.3 fL	54.2 fL	56.5 fL		52.4 fL	49.6 fL		56.3 fL	49.3 fL
MCH	13.7 pg	13.0 pg	13.0 pg	11.2 pg		13.9 pg	13.0 pg		14.2 pg	13.6 pg
MCHC	24.4 g/dL	25.0 g/dL	24.1 g/dL	19.8g/dL		26.6 g/dL	26.3 g/dL		25.2 g/dL	27.6 g/dL
RDW	17.8 %	18.1 %	20.8 %	15.6 %		15.8 %	15.4%		16.1 %	15.4 %
PLT	276 X10 ^{3/μL}	105 X10 ^{3/μL}	144 X10 ^{3/μL}	645 X10 ^{3/μL}		115 X10 ^{3/μL}	33 X10 ^{3/μL}		531 X10 ^{3/μL}	720 X10 ^{3/μL}
MPV	7.8 fL	6.9 fL	7.4 fL	7.3 fL		6.3 fL	5.7 fL		6.2 fL	5.2 fL
PDW	18.4	17.6	18.5	18.6		18.8	19.6		17.5	16.0
PCT	0.215 %	0.072 %	0.106%	0.470 %		0.072%	0.018%		0.329%	0.374%

2º Grupo Experimental

HEMOGRAMA										
D0										
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	12.1X10 ^{3/μ} L		12.0X10 ^{3/μ} L	12.5X10 ^{3/μ} L	12.9X10 ^{3/μ} L	13.6X10 ^{3/μ} L	12.0X10 ^{3/μ} L			10.2X10 ^{3/μ} L
Lymph	9.6X10 ^{3/μL}		8.7X10 ^{3/μL}	9.6X10 ^{3/μL}	10.0X10 ^{3/μ} L	10.7X10 ^{3/μ} L	8.7X10 ^{3/μL}			7.7X10 ^{3/μL}
Mon	0.4X10 ^{3/μL}		0.5X10 ^{3/μL}	0.4X10 ^{3/μL}	0.4X10 ^{3/μL}	0.4X10 ^{3/μL}	0.5X10 ^{3/μL}			0.4X10 ^{3/μL}
Gran	2.1X10 ^{3/μL}		2.8X10 ^{3/μL}	2.5X10 ^{3/μL}	2.5X10 ^{3/μL}	2.5X10 ^{3/μL}	2.8X10 ^{3/μL}			2.1X10 ^{3/μL}
Lymph %	80.6%		72.3%	77.0%	77.6%	78.5%	72.3%			75.6%
Mon %	3.2%		4.4%	3.1%	3.1%	3.0%	4.4%			4.3%
Gran %	16.2%		23.3%	19.9%	19.3%	18.5%	23.3%			20.1%
RCB	11.21X10 ⁶ /μL		11.69X10 ⁶ /μL	10.75X10 ⁶ /μL	12.11X10 ⁶ /μL	11.16X10 ⁶ /μL	11.69X10 ⁶ /μL			11.53X10 ⁶ /μL
HGB	14.8g/dL		16.3g/dL	14.8g/dL	16.0g/dL	15.5g/dL	16.3g/dL			15.8g/dL
HCT	52.9%		55.5%	56.3%	73.7%	56.5%	55.5%			54.5%
MCV	48.8fL		47.5fL	52.4fL	60.9fL	50.7fL	47.5fL			47.3fL
MCH	13.6pg		13.9pg	13.7pg	13.2pg	13.8pg	13.9pg			13.7pg
MCHC	28.0g/dL		29.3g/dL	26.2g/dL	21.7g/dL	27.4g/dL	29.3g/dL			28.9g/dL
RDW	15.0%		14.7%	17.9%	20.8%	16.3%	14.7%			15.0%
PLT	1080X10 ^{3/} μL		1021X10 ^{3/} μL	1056X10 ^{3/} μL	1412X10 ^{3/} μL	1095X10 ^{3/} μL	1021X10 ^{3/} μL			1216X10 ^{3/} μL
MPV	5.3fL		4.9fL	5.4fL	7.2fL	5.2fL	4.9fL			4.7fL
PDW	16.3		15.9	16.4	17.4	16.5	15.9			15.9
PCT	0.570%		0.500%	0.570%	0.447%	0.569%	0.500%			0.571%
HEMOGRAMA										
D2										
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC		1.7X10 ^{3/μL}		4.9 X10 ^{3/μL}	3.1X10 ^{3/μL}	0.8X10 ^{3/μL}	1.8X10 ^{3/μL}			1.1X10 ^{3/μL}
Lymph		1.0X10 ^{3/μL}		2.7 X10 ^{3/μL}	1.4X10 ^{3/μL}	0.5X10 ^{3/μL}	0.7X10 ^{3/μL}			0.6X10 ^{3/μL}
Mon		0.1X10 ^{3/μL}		0.3 X10 ^{3/μL}	0.2X10 ^{3/μL}	0.0X10 ^{3/μL}	0.1X10 ^{3/μL}			0.2X10 ^{3/μL}
Gran		0.6X10 ^{3/μL}		1.9 X10 ^{3/μL}	1.5X10 ^{3/μL}	0.3X10 ^{3/μL}	1.0X10 ^{3/μL}			0.3X10 ^{3/μL}
Lymph %		57.7%		55.2%	45.7%	63.0%	64.5%			63.0%
Mon %		6.3%		6.3%	5.5%	4.3%	4.8%			4.3%
Gran %		36.0%		38.5%	48.8%	32.7%	30.7%			32.7%
RCB		3.66X10 ^{6/μ} L		10.30 X10 ^{6/μL}	10.15X10 ⁶ /μL	8.41X10 ^{6/μ} L	10.15X10 ⁶ /μL			7.41X10 ^{6/μ} L
HGB		4.8g/dL		14.4 g/dL	13.8g/dL	11.7g/dL	14.0g/dL			11.6g/dL
HCT		17.2%		50.7%	49.5%	39.1%	48.8%			38.1%
MCV		47.2fL		49.3 fL	48.8fL	46.5fL	48.1fL			43.5fL
MCH		13.1Pg		13.9 pg	13.5pg	13.9pg	13.7pg			12.0pg
MCHC		27.9g/dL		28.4 g/dL	27.8g/dL	29.9g/dL	28.6g/dL			29.8g/dL
RDW		15.0%		16.7 %	15.4%	13.5%	14.7%			11.5%
PLT		401X10 ^{3/μ} L		456X10 ^{3/μ} L	436X10 ^{3/μ} L	347X10 ^{3/μ} L	285X10 ^{3/μ} L			323X10 ^{3/μ} L
MPV		4.8fL		5.3 fL	5.3fL	4.3fL	4.9fL			4.3fL
PDW		16.4		16.7	16.4	16.7	16.3			16.7
PCT		0.192%		.***%	.***%	0.149%	.***%			0.139%

HEMOGRAMA									
D17									
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT 5NT
WBC				0.6 X10 ^{3/μL}	0.3X10 ^{3/μL}	3.6X10 ^{3/μL}	1.3X10 ^{3/μL}		
Lymph				0.3 X10 ^{3/μL}	***. *X10 ^{3/μL}	3.1X10 ^{3/μL}	0.6X10 ^{3/μL}		
Mon				0.0 X10 ^{3/μL}	***. *X10 ^{3/μL}	0.1X10 ^{3/μL}	0.0X10 ^{3/μL}		
Gran				0.3 X10 ^{3/μL}	***. *X10 ^{3/μL}	0.4X10 ^{3/μL}	0.7X10 ^{3/μL}		
Lymph %				43.1%	**.*%	87.1%	48.0%		
Mon %				12.9%	**.*%	1.5%	3.3%		
Gran %				44.0%	**.*%	11.4%	48.7%		
RCB				19.78 X10 ^{6/μL}	3.11X10 ^{6/μL}	6.38X10 ^{6/μL}	9.41X10 ^{6/μL}		
HGB				5.3 g/dL	3.5g/dL	8.8g/dL	13.2g/dL		
HCT				**.*%	16.5%	34.7%	49.3%		
MCV				62.0 fL	53.3fL	54.5fL	52.4fL		
MCH				2.6 pg	11.2pg	13.7pg	14.0pg		
MCHC				***.* g/dL	21.2g/dL	25.3g/dL	26.7g/dL		
RDW				23.1 %	19.3%	19.9%	19.7%		
PLT				1111X10 ^{3/μL}	210X10 ^{3/μL}	123X10 ^{3/μL}	65X10 ^{3/μL}		
MPV				7.4 fL	7.7fL	5.8fL	6.7fL		
PDW				17.0	19.0	18.5	18.2		
PCT				.***%	0.161%	0.071%	0.043%		

HEMOGRAMA										
D32										
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	5.1X10 ³ /μL	1.0X10 ³ /μL	1.6X10 ³ /μL	2.3X10 ³ /μL	5.0X10 ³ /μL	10.9X10 ³ /μL	10.7X10 ³ /μL			8.3X10 ³ /μL
Lymph	3.4X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	1.0X10 ³ /μL	1.6X10 ³ /μL	3.2X10 ³ /μL	3.5X10 ³ /μL	3.0X10 ³ /μL			4.8X10 ³ /μL
Mon	0.1X10 ³ /μL	0.0X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	0.5X10 ³ /μL			0.3X10 ³ /μL
Gran	1.6X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.5X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	1.6X10 ³ /μL	7.1X10 ³ /μL	7.3X10 ³ /μL			3.2X10 ³ /μL
Lymph %	66.4%	55.9%	63.00%	71.7%	64.5%	32.2%	28.2%			57.3%
Mon %	2.9%	4.2%	3.7%	3.6%	3.7%	3.1%	4.4%			4.0%
Gran %	30.7%	39.9%	33.3%	24.7%	31.8%	64.7%	67.4%			38.7%
RCB	11.011X10 ⁶ /μL	5.36X10 ⁶ /μL	6.02X10 ⁶ /μL	10.00X10 ⁶ /μL	10.80X10 ⁶ /μL	11.10X10 ⁶ /μL	10.91X10 ⁶ /μL			10.59X10 ⁶ /μL
HGB	15.5g/dL	4.1g/dL	8.3g/dL	14.9g/dL	15.3g/dL	14.9g/dL	14.4g/dL			15.3g/dL
HCT	55.9%	27.7%	30.4%	52.4%	54.9%	53.0%	51.9%			54.5%
MCV	50.8fL	51.8fL	50.5fL	52.4fL	50.9fL	47.8fL	47.6fL			51.5fL
MCH	14.0pg	7.6pg	13.7pg	14.9pg	14.1pg	13.4pg	13.2pg			14.4pg
MCHC	27.7g/dL	14.8g/dL	27.3g/dL	28.4g/dL	27.8g/dL	28.1g/dL	27.9g/dL			28.0g/dL
RDW	17.3%	18.4%	16.0%	16.1%	17.3%	17.0%	17.0%			16.0%
PLT	131X10 ³ /μL	369X10 ³ /μL	58X10 ³ /μL	55X10 ³ /μL	58X10 ³ /μL	99X10 ³ /μL	75X10 ³ /μL			365X10 ³ /μL
MPV	6.4fL	6.8fL	6.3fL	6.2fL	6.9fL	6.4fL	6.2fL			5.5fL
PDW	17.7	18.2	17.4	17.9	17.9	17.3	17.5			16.5
PCT	0.083%	0.250%	0.036%	0.034%	0.040%	0.063%	0.046%			0.200%

HEMOGRAMA										
D62										
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	3.7X10³/μL	5.9X10³/μL	6.1X10³/μL	1.1X10³/μL	1.6X10³/μL	3.9X10³/μL	4.8X10³/μL	6.0X10³/μL	2.8X10³/μL	3.0X10³/μL
Lymph	2.8X10 ³ /μL	4.4X10 ³ /μL	4.7X10 ³ /μL	0.9X10 ³ /μL	1.3X10 ³ /μL	2.6X10 ³ /μL	3.7X10 ³ /μL	4.2X10 ³ /μL	2.0X10 ³ /μL	2.0X10 ³ /μL
Mon	0.1X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.0X10 ³ /μL	0.0X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL
Gran	0.8X10 ³ /μL	1.3X10 ³ /μL	1.2X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	1.1X10 ³ /μL	0.9X10 ³ /μL	1.5X10 ³ /μL	0.7X10 ³ /μL	0.8X10 ³ /μL
Lymph %	75.4%	75.4%	76.6%	81.3%	78.7%	65.8%	76.6%	69.9%	70.5%	66.4%
Mon %	3.1%	2.9%	3.7%	3.7%	3.7%	5.5%	3.8%	4.6%	3.8%	5.7%
Gran %	21.5%	21.7%	19.7%	15.0%	17.6%	28.7%	19.6%	25.5%	25.7%	27.9%
RCB	9.28X10⁶/μL	10.71X10⁶/μL	6.86X10⁶/μL	4.78X10⁶/μL	9.88X10⁶/μL	10.37X10⁶/μL	10.56X10⁶/μL	10.49X10⁶/μL	10.14X10⁶/μL	10.78X10⁶/μL
HGB	12.2g/dL	13.5g/dL	10.9g/dL	6.2g/dL	13.3g/dL	13.6g/dL	13.1g/dL	13.8g/dL	13.2g/dL	13.8g/dL
HCT	42.6%	47.3%	31.0%	21.6%	47.0%	48.1%	47.0%	49.0%	47.1%	49.4%
MCV	46.0fL	44.2fL	45.2fL	45.2fL	47.6fL	46.1fL	44.6fL	46.8fL	46.5fL	45.9fL
MCH	13.1pg	12.6pg	15.8pg	12.9pg	13.4pg	13.1pg	12.4pg	13.1pg	13.0pg	12.8pg
MCHC	28.6g/dL	28.5g/dL	35.1g/dL	28.7g/dL	28.2g/dL	28.2g/dL	27.8g/dL	28.1g/dL	28.0g/dL	27.9g/dL
RDW	16.3%	17.0%	16.0%	16.7%	15.3%	16.0%	16.3%	15.3%	15.6%	16.3%
PLT	1077X10³/μL	1083X10³/μL	123X10³/μL	97X10³/μL	1327X10³/μL	1250X10³/μL	1243X10³/μL	1298X10³/μL	1177X10³/μL	1157X10³/μL
MPV	5.3fL	5.2fL	7.2fL	6.0fL	5.4fL	5.3fL	5.1fL	5.4fL	5.5fL	5.5fL
PDW	15.8	15.6	17.6	16.6	16.1	15.9	15.5	15.9	15.8	15.8
PCT	0.570%	0.563%	0.088%	0.058%	***%	0.662%	0.633%	0.700%	0.647%	0.636%

6 meses PósD62

HEMOGRAMA										
6 MESES PÓS D62										
	1T	2T	3T	4T	5T	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	4.4X10 ³ /μL	4.0X10 ³ /μL	1.8X10 ³ /μL	1.3X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	1.6X10 ³ /μL	1.4X10 ³ /μL	2.5X10 ³ /μL	5.3X10 ³ /μL	
Lymph	3.5X10 ³ /μL	2.8X10 ³ /μL	1.1X10 ³ /μL	0.8X10 ³ /μL	***.*X10 ³ /μL	1.1X10 ³ /μL	1.0X10 ³ /μL	1.5X10 ³ /μL	3.2X10 ³ /μL	
Mon	0.1X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.0X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	***.*X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.0X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	
Gran	0.8X10 ³ /μL	1.1X10 ³ /μL	0.7X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	***.*X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.9X10 ³ /μL	1.8X10 ³ /μL	
Lymph %	78.1%	68.8%	59.3%	61.2%	**.*%	70.5%	66.1%	60.3%	60.9%	
Mon %	2.6%	4.2%	4.5%	4.8%	**.*%	5.6%	3.3%	4.2%	5.3%	
Gran %	19.3%	27.0%	36.2%	34.0%	**.*%	23.9%	30.6%	35.5%	33.8%	
RCB	9.96X10 ⁶ /μL	9.86X10 ⁶ /μL	8.87X10 ⁶ /μL	8.76X10 ⁶ /μL	0.98X10 ⁶ /μL	9.12X10 ⁶ /μL	8.53X10 ⁶ /μL	9.70X10 ⁶ /μL	9.64X10 ⁶ /μL	
HGB	12.8g/dL	12.9g/dL	11.5g/dL	12.2g/dL	0.9g/dL	12.2g/dL	11.7g/dL	12.7g/dL	12.6g/dL	
HCT	45.7%	47.0%	41.6%	44.5%	4.8%	44.6%	42.9%	47.3%	46.3%	
MCV	45.9fL	47.7fL	47.0fL	50.8fL	49.0fL	49.0fL	50.4fL	48.8fL	48.1fL	
MCH	12.8pg	13.0pg	12.9pg	13.9pg	9.1pg	13.3pg	13.7pg	13.0pg	13.0pg	
MCHC	28.0g/dL	27.4g/dL	27.6g/dL	27.4g/dL	18.7g/dL	27.3g/dL	27.2g/dL	26.8g/dL	27.2g/dL	
RDW	15.3%	14.7%	15.7%	15.1%	15.7%	14.4%	15.7%	15.4%	15.0%	
PLT	917X10 ³ /μL	1614X10 ³ /μL	1434X10 ³ /μL	1280X10 ³ /μL	134X10 ³ /μL	2066X10 ³ /μL	1053X10 ³ /μL	2215X10 ³ /μL	1409X10 ³ /μL	
MPV	6.9fL	6.3fL	6.9fL	6.0fL	8.6fL	6.6fL	6.3fL	6.0fL	6.6fL	
PDW	16.3	16.3	16.6	16.1	19.6	16.5	16.2	16.1	16.3	
PCT	0.632%	***%	***%	***%	0.115%	***%	0.663%	***%	***%	

3º Grupo Experimental

HEMOGRAMA										
D0										
	1IT	2IT	3IT	4IT	5IT	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	8.5X10 ³ /μL	7.1X10 ³ /μL	9.3X10 ³ /μL	13.3X10 ³ /μL	9.1X10 ³ /μL	4.2X10 ³ /μL	11.8X10 ³ /μL	10.0X10 ³ /μL	8.3X10 ³ /μL	12.0X10 ³ /μL
Lymph	7.0X10 ³ /μL	4.7X10 ³ /μL	6.6X10 ³ /μL	9.6X10 ³ /μL	7.9X10 ³ /μL	2.8X10 ³ /μL	9.2X10 ³ /μL	7.0X10 ³ /μL	5.3X10 ³ /μL	8.7X10 ³ /μL
Mon	0.2X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.5X10 ³ /μL
Gran	1.3X10 ³ /μL	2.2X10 ³ /μL	2.4X10 ³ /μL	3.4X10 ³ /μL	1.0X10 ³ /μL	1.2X10 ³ /μL	2.2X10 ³ /μL	2.6X10 ³ /μL	2.6X10 ³ /μL	2.8X10 ³ /μL
Lymph %	82.1%	65.7%	70.5%	72.2%	86.5%	67.5%	77.8%	69.9%	63.9%	72.3%
Mon %	2.5%	3.8%	4.1%	2.5%	2.3%	4.9%	3.5%	4.2%	4.7%	4.4%
Gran %	15.4%	30.5%	25.4%	25.3%	11.2%	27.6%	18.7%	25.9%	31.4%	23.3%
RCB	11.20X10 ⁶ /μL	10.61X10 ⁶ /μL	10.76X10 ⁶ /μL	10.38X10 ⁶ /μL	11.44X10 ⁶ /μL	11.42X10 ⁶ /μL	11.48X10 ⁶ /μL	11.11X10 ⁶ /μL	11.09X10 ⁶ /μL	11.69X10 ⁶ /μL
HGB	15.8g/dL	15.1g/dL	15.4g/dL	14.7g/dL	16.4g/dL	16.1g/dL	16.3g/dL	15.4g/dL	15.3g/dL	16.3g/dL
HCT	53.5%	50.3%	51.7%	50.1%	54.7%	54.5%	55.2%	53.2%	52.4%	55.5%
MCV	47.8fL	47.5fL	48.1fL	48.3fL	47.9fL	47.8fL	48.1fL	47.9fL	47.3fL	47.5fL
MCH	14.1pg	14.2pg	14.3pg	14.1pg	14.3pg	14.0pg	14.1pg	13.8pg	13.7pg	13.9pg
MCHC	29.5g/dL	30.0g/dL	29.7g/dL	29.3g/dL	29.9g/dL	29.5g/dL	29.5g/dL	28.9g/dL	29.1g/dL	29.3g/dL
RDW	14.7%	14.7%	15.0%	15.0%	14.3%	14.7%	14.7%	15.3%	15.0%	14.7%
PLT	1410X10 ³ /μL	1124X10 ³ /μL	1121X10 ³ /μL	990X10 ³ /μL	1417X10 ³ /μL	1202X10 ³ /μL	607X10 ³ /μL	1308X10 ³ /μL	1268X10 ³ /μL	1021X10 ³ /μL
MPV	4.6fL	5.3fL	5.2fL	4.9fL	4.7fL	4.6fL	5.2fL	4.4fL	4.4fL	4.9fL
PDW	15.7	16.1	16.0	16.0	15.8	15.8	16.3	15.8	15.8	15.9
PCT	0.648%	0.595%	0.582%	0.485%	0.665%	0.552%	0.315%	0.575%	0.557%	0.500%

HEMOGRAMA										
D2										
	1IT	2IT	3IT	4IT	5IT	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	3.6X10 ³ /μL	1.1X10 ³ /μL	3.4X10 ³ /μL	1.3X10 ³ /μL	4.4X10 ³ /μL	0.9X10 ³ /μL	1.9X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	0.8X10 ³ /μL	
Lymph	2.3X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	1.9X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	2.2X10 ³ /μL	0.3X10 ³ /μL	0.8X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	
Mon	0.1X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.0X10 ³ /μL	0.0X10 ³ /μL	
Gran	1.2X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	1.3X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	2.0X10 ³ /μL	0.5X10 ³ /μL	1.0X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	0.4X10 ³ /μL	
Lymph %	62.6%	35.0%	55.3%	49.7%	49.7%	37.5%	42.9%	29.4%	46.0%	
Mon %	4.8%	6.5%	6.8%	6.5%	5.6%	6.1%	7.0%	6.1%	8.3%	
Gran %	32.6%	58.5%	37.9%	43.8%	44.7%	56.4%	50.1%	64.5%	45.7%	
RCB	9.87X10 ⁶ /μL	7.97X10 ⁶ /μL	10.62X10 ⁶ /μL	10.61X10 ⁶ /μL	10.86X10 ⁶ /μL	7.52X10 ⁶ /μL	9.07X10 ⁶ /μL	10.23X10 ⁶ /μL	10.44X10 ⁶ /μL	
HGB	13.4g/dL	10.4g/dL	14.1g/dL	14.5g/dL	14.6g/dL	9.7g/dL	12.4g/dL	14.3g/dL	14.2g/dL	
HCT	47.5%	36.2%	48.9%	50.9%	50.8%	35.4%	43.9%	50.2%	49.5%	
MCV	48.2fL	45.5fL	46.1fL	48.0fL	46.8fL	47.2fL	48.5fL	49.1fL	47.5fL	
MCH	13.5pg	13.0pg	13.2pg	13.6pg	13.4pg	12.8pg	13.6pg	13.9pg	13.6pg	
MCHC	28.2g/dL	28.7g/dL	28.8g/dL	28.4g/dL	28.7g/dL	27.4g/dL	28.2g/dL	28.4g/dL	28.6g/dL	
RDW	15.0%	14.9%	15.3%	15.7%	15.0%	15.7%	14.4%	15.4%	15.3%	
PLT	2051X10 ³ /μL	2615X10 ³ /μL	1696X10 ³ /μL	909X10 ³ /μL	1147X10 ³ /μL	580X10 ³ /μL	1756X10 ³ /μL	1639X10 ³ /μL	1761X10 ³ /μL	
MPV	5.0fL	4.9fL	4.7fL	5.1fL	4.9fL	5.0fL	5.2fL	4.8fL	4.7fL	
PDW	15.9	15.8	15.8	16.4	15.8	16.3	16.0	15.8	15.9	
PCT	***%	***%	***%	0.463%	0.562%	0.290%	***%	***%	***%	

HEMOGRAMA

D17									
	1IT	2IT	3IT	4IT	5IT	1NT	2NT	3NT	4NT 5NT
WBC	9.7X10 ^{3/μL}	7.3X10 ^{3/μL}	8.5X10 ^{3/μL}	4.8X10 ^{3/μL}	4.2X10 ^{3/μL}	4.2X10 ^{3/μL}		5.1X10 ^{3/μL}	7.6X10 ^{3/μL}
Lymph	5.3X10 ^{3/μL}	4.7X10 ^{3/μL}	4.7X10 ^{3/μL}	3.2X10 ^{3/μL}	3.3X10 ^{3/μL}	2.3X10 ^{3/μL}		2.6X10 ^{3/μL}	5.1X10 ^{3/μL}
Mon	0.4X10 ^{3/μL}	0.2X10 ^{3/μL}	0.5X10 ^{3/μL}	0.2X10 ^{3/μL}	0.1X10 ^{3/μL}	0.2X10 ^{3/μL}		0.2X10 ^{3/μL}	0.5X10 ^{3/μL}
Gran	4.0X10 ^{3/μL}	2.4X10 ^{3/μL}	3.3X10 ^{3/μL}	1.4X10 ^{3/μL}	0.8X10 ^{3/μL}	1.7X10 ^{3/μL}		2.3X10 ^{3/μL}	2.0X10 ^{3/μL}
Lymph %	54.2%	64.0%	55.3%	67.7%	76.6%	54.6%		50.1%	66.6%
Mon %	4.9%	3.4%	5.3%	3.3%	3.3%	3.9%		5.5%	7.0%
Gran %	40.9%	32.6%	39.4%	29.0%	20.1%	41.5%		44.4%	26.4%
RCB	11.18X10 ⁶ /μL	10.56X10 ⁶ /μL	10.27X10 ⁶ /μL	10.34X10 ⁶ /μL	10.27X10 ⁶ /μL	7.20X10 ^{6/μ} L		9.27X10 ^{6/μ} L	10.71X10 ⁶ /μL
HGB	14.8g/dL	15.0g/dL	14.5g/dL	14.2g/dL	14.3g/dL	9.4g/dL		11.8g/dL	15.1g/dL
HCT	55.4%	52.8%	52.1%	51.0%	51.8%	35.0%		46.4%	54.2%
MCV	49.6fL	50.0fL	50.8fL	49.4fL	50.5fL	48.7fL		50.1fL	50.7fL
MCH	13.2pg	14.2pg	14.1pg	13.7pg	13.9pg	13.0pg		12.7pg	14.0pg
MCHC	26.7g/dL	28.4g/dL	27.8g/dL	27.8g/dL	27.6g/dL	26.8g/dL		25.4g/dL	27.8g/dL
RDW	17.6%	17.0%	17.3%	17.6%	17.3%	19.9%		17.9%	17.3%
PLT	659X10 ^{3/μ} L	684X10 ^{3/μ} L	1304X10 ^{3/μ} μL	995X10 ^{3/μ} L	924X10 ^{3/μ} L	488X10 ^{3/μ} L		2809X10 ^{3/μ} μL	558X10 ^{3/μ} L
MPV	6.0fL	6.2fL	6.0fL	6.0fL	6.4fL	6.8fL		6.2fL	6.4fL
PDW	16.7	16.8	16.6	16.4	16.9	16.4		16.8	17.3
PCT	0.395%	0.424%	***%	0.597%	0.591%	0.331%		***%	0.357%

HEMOGRAMA

D32									
	1IT	2IT	3IT	4IT	5IT	1NT	2NT	3NT	4NT 5NT
WBC			11.4X10 ^{3/μ} L	8.1X10 ^{3/μL}	8.3X10 ^{3/μL}		8.4X10 ^{3/μL}		10.5X10 ^{3/μ} L
Lymph			8.4X10 ^{3/μL}	4.2X10 ^{3/μL}	1.5X10 ^{3/μL}		5.3X10 ^{3/μL}		6.3X10 ^{3/μL}
Mon			0.4X10 ^{3/μL}	0.5X10 ^{3/μL}	0.3X10 ^{3/μL}		0.3X10 ^{3/μL}		0.4X10 ^{3/μL}
Gran			2.6X10 ^{3/μL}	3.4X10 ^{3/μL}	6.5X10 ^{3/μL}		2.8X10 ^{3/μL}		3.8X10 ^{3/μL}
Lymph %			73.4%	52.0%	17.6%		63.4%		60.1%
Mon %			4.2%	5.6%	3.6%		3.6%		4.0%
Gran %			22.4%	42.4%	78.8%		33.0%		35.9%
RCB			10.56X10 ⁶ /μL	10.56X10 ⁶ /μL	11.15X10 ⁶ /μL		11.07X10 ⁶ /μL		11.12X10 ⁶ /μL
HGB			14.4g/dL	14.4g/dL	12.0g/dL		14.8g/dL		14.6g/dL
HCT			49.9%	50.0%	43.4%		51.6%		52.0%
MCV			47.3fL	47.4fL	39.0fL		46.7fL		46.8fL
MCH			13.6pg	13.6pg	10.7pg		13.3pg		13.1pg
MCHC			28.8g/dL	28.8g/dL	27.6g/dL		28.6g/dL		28.0g/dL
RDW			16.0%	16.3%	19.5%		17.7%		17.7%
PLT			580X10 ^{3/μ} L	1386X10 ^{3/μ} μL	1565X10 ^{3/μ} μL		1498X10 ^{3/μ} μL		1580X10 ^{3/μ} μL
MPV			5.6fL	5.4fL	5.4fL		5.4fL		5.4fL
PDW			16.5	16.0	15.5		15.9		15.6
PCT			0.324%	***%	***%		***%		***%

HEMOGRAMA										
	D62									
	1IT	2IT	3IT	4IT	5IT	1NT	2NT	3NT	4NT	5NT
WBC	1.3X10 ³ /μL	2.7X10 ³ /μL		6.1X10 ³ /μL	3.2X10 ³ /μL	3.2X10 ³ /μL	1.3X10 ³ /μL	2.0X10 ³ /μL	2.7X10 ³ /μL	
Lymph	0.9X10 ³ /μL	1.8X10 ³ /μL		2.9X10 ³ /μL	2.4X10 ³ /μL	1.8X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	1.5X10 ³ /μL	2.0X10 ³ /μL	
Mon	0.0X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL		0.4X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.2X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	0.0X10 ³ /μL	0.1X10 ³ /μL	
Gran	0.4X10 ³ /μL	0.8X10 ³ /μL		2.8X10 ³ /μL	0.7X10 ³ /μL	1.2X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	0.5X10 ³ /μL	0.6X10 ³ /μL	
Lymph %	62.3%	65.1%		46.7%	73.8%	55.9%	48.3%	72.9%	72.5%	
Mon %	3.8%	4.6%		6.8%	3.0%	6.9%	8.3%	3.5%	4.5%	
Gran %	33.9%	30.3%		46.5%	23.2%	37.2%	43.4%	23.6%	23.0%	
RCB	8.77X10 ⁶ /L	9.82X10 ⁶ /L		10.75X10 ⁶ /μL	9.27X10 ⁶ /L	9.69X10 ⁶ /μL	9.65X10 ⁶ /L	10.04X10 ⁶ /μL	9.78X10 ⁶ /L	
HGB	11.6g/dL	13.0g/dL		11.9g/dL	12.2g/dL	13.1g/dL	13.0g/dL	13.3g/dL	13.2g/dL	
HCT	40.2%	45.6%		40.7%	42.5%	45.0%	45.2%	46.1%	44.9%	
MCV	45.9fL	46.5fL		37.9fL	45.9fL	46.5fL	46.9fL	46.0fL	46.0fL	
MCH	13.2pg	13.2pg		11.0pg	13.1pg	13.5pg	13.4pg	13.2pg	13.4pg	
MCHC	28.8g/dL	28.5g/dL		29.2g/dL	28.7g/dL	29.1g/dL	28.7g/dL	28.8g/dL	29.3g/dL	
RDW	16.3%	15.6%		23.8%	15.3%	15.6%	16.0%	15.6%	14.3%	
PLT	876X10 ³ /L	1215X10 ³ /μL		952X10 ³ /μL	953X10 ³ /L	9108X10 ³ /μL	721X10 ³ /μL	400X10 ³ /μL	752X10 ³ /μL	
MPV	4.8fL	4.8fL		4.6fL	4.9fL	6.2fL	5.9fL	5.7fL	6.1fL	
PDW	16.1	15.8		15.3	15.7	16.1	15.9	16.2	16.2	
PCT	0.420%	0.583%		0.437%	0.466%	0.564%	0.425%	0.228%	0.458%	