

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS**

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

ISABELA LOPES TREVIZAN

**SISTEMA MELATONÉRGICO EM CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DA
MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS EM CONDIÇÕES DE HIGIEZ**

**MELATONERGIC SYSTEM IN HEMATOPOIETIC STEM CELLS FROM
BONE MARROW OF MICE IN HEALTHY CONDITIONS**

**SÃO PAULO
2023**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO.

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

Programa de Pós-Graduação em Ciência - Fisiologia Geral

**SISTEMA MELATONÉRGICO EM CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOIÉTICAS DA
MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS EM CONDIÇÕES DE HIGIEDEZ**

**MELATONERGIC SYSTEM IN HEMATOPOIETIC STEM CELLS FROM
BONE MARROW OF MICE IN HEALTHY CONDITIONS**

Tese apresentada pela aluna **Isabela Lopes Trevizan** no programa de pós-graduação de Fisiologia Geral do Instituto de Biociência - USP, sob a orientação da **Prof.^a Regina Pekelmann Markus**, para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

**SÃO PAULO
2023**

RESUMO

A formação de elementos figurados do sangue é um processo dinâmico e diário regido por linhagens de células originadas de uma pequena porcentagem de células da medula óssea capazes de se autorrenovarem e diferenciarem de forma muito controlada. Estas células que se mantêm quiescentes por longos períodos (LT-HSC) dão origem a células tronco de curta duração (ST-HSC) que se proliferam e diferenciam em células progenitoras mielóides (CPM) e linfóides (CPL). As células da medula óssea sintetizam melatonina durante o período de claro e de escuro e esta tem papel relevante no controle dos processos de quiescência e atividade das LT-HSC, bem como nos processos de proliferação e diferenciação das células progenitoras. Nesta tese foi avaliada a ritmicidade da produção de melatonina e das enzimas envolvidas na via biossintética bem como a relação desta com as enzimas de síntese e os receptores de melatonina. Foram usados camundongos C57Bl16J hípidos. Animais mantidos em ciclo 12/12 apresentaram um ritmo diário do conteúdo de melatonina no total de células da medula e no sobrenadante. Os ritmos das moléculas precursoras da via biossintética sugeriam que haveria uma variação diária das enzimas presentes. Esta hipótese foi confirmada, e também foi mostrado que a porcentagem de cada subtipo celular que expressou as enzimas P-SNAT e ASMT variou ao longo do dia, mas esta variação foi diferente para cada tipo celular, sugerindo uma regulação dependente da função. A mesma conclusão pode ser observada com os receptores MT1 e MT2. O principal resultado observado nesta tese foi que a entrada do claro, mas não a entrada do escuro sincroniza a produção de melatonina pela medula óssea. Na entrada no claro ocorre uma rápida mas significativa redução da concentração de melatonina nas células da medula óssea que é seguida de um pico transiente de melatonina. Este perfil é também observado se a entrada do claro for atrasada em 4 horas. Por outro lado, o aumento da concentração de melatonina que ocorre na entrada do escuro, seguida de uma lenta redução, quando as luzes são apagadas às 18h00, mantém o curso de as luzes forem apagadas às 22h00. Portanto, não é o apagar das luzes que induz a resposta noturna. Considerando que a medula recebe informação direta do núcleo paraventricular, que recebe projeções do relógio central, os núcleos supraquiasmáticos e o ritmo destes é reajustado com a entrada do claro, mas não é alterada com a entrada do escuro. Esta tese sugere fortemente que o conteúdo de melatonina na medula óssea é orquestrado pelo sistema simpático de forma diferente do que ocorre na glândula pineal.

Palavras-chaves: células troncos e progenitoras hematopoiéticas, medula óssea, melatonina; receptores MT1 e MT2, P-SNAT, ASMT.

ABSTRACT

Bone-marrow hematopoietic stem and progenitor cells synthesize melatonin during the day and nighttime. Melatonin orchestrates in a specific manner the quiescent and active period of the long- and short-term stem hematopoietic cells (LT-HSC, ST-HSC), as well as the activity of the myeloid and lymphoid progenitor cells (CMP, CLP). Here we evaluated the daily rhythm of the production of melatonin and its precursors (tryptophan, serotonin, N-acetylserotonin), and the serotonin metabolite 5-HIAA. The profile of the synthetic enzymes at the active forms, P-SNAT and ASMT, as well as the expression of the receptors MT1 and MT2 were evaluated in healthy young C57B116J mice. Animals maintained on a 12/12 cycle showed a daily rhythm of melatonin content in total marrow cells and in the supernatant. The rhythms of the precursor molecules of the biosynthetic pathway suggested that there would be a daily variation of the enzymes present. This hypothesis was confirmed, and it was also shown that the percentage of each cell subtype that expressed P-SNAT and ASMT enzymes varied throughout the day. Still, this variation was different for each cell type, suggesting a function-dependent regulation. The same conclusion can be observed with the MT1 and MT2 receptors. The main result observed in this thesis was that the input of light, but not the input of dark, synchronizes the production of melatonin by the bone marrow. Upon entering the light, there is a rapid but significant reduction in melatonin concentration in bone marrow cells followed by a transient melatonin spike. This profile is also observed if the light entry is delayed by 4 hours. On the other hand, the increase in melatonin concentration that occurs at the onset of darkness, followed by lights off at 6:00 pm, maintains the same course as the lights are turned off at 10:00 pm. Therefore, lights off is not responsible for the nocturnal increase of melatonin. Considering that the medulla receives direct information from the paraventricular nucleus, which receives projections from the central clock, the suprachiasmatic nuclei and that their rhythm is readjusted with the entry of light but is not altered with the entry of darkness, this thesis strongly suggests that the Melatonin content in the bone marrow is orchestrated by the sympathetic system differently from what occurs in the pineal gland.

Keywords: hematopoietic stem cells; bone marrow; melatonin; MT1 receptor; MT2 receptor; ASMT; SNAT.

1.1. Célula-tronco hematopoiéticas

As células-tronco hematopoiéticas (HSC, do inglês *hematopoietic stem cells*), originadas de células-tronco pluripotentes, residem em nichos anatômicos reservados. Durante a embriogênese, as células-tronco pluripotentes migram do saco vitelínico para a mesoderme e após formação da circulação fetal para o fígado embrionário e posteriormente para a medula embrionária (KINGSLEY *et al.*, 2004; BERTRAND *et al.*, 2005; PALIS, 2014). Na fase adulta, a maior população de células-tronco hematopoiéticas reside na medula óssea (MO), e populações menores são encontradas no fígado, baço, pulmão, gônadas e tecido nervoso (WAGERS e WEISSMAN, 2004; RATAJCZAK, 2008). Desde o saco vitelínico estas são células comprometidas com a formação de eritrócitos primitivos e macrófagos embrionários. Os macrófagos embrionários dão origem aos macrófagos residentes encontrados no cérebro (microglias), pulmão, intestino, fígado, gônadas e outros tecidos da genitália acessória feminina e masculina. Estas células, bem como as HSC da medula óssea são autorrenováveis, mas apenas as HSC são responsáveis pela formação das células do osso e dos elementos figurados do sangue (JOHNSON e MOORE, 1975).

As regiões anatômicas da medula óssea admitem grande especialização e o microambiente de cada região determina os processos de diferenciação em múltiplas linhagens sanguíneas. Esse ambiente é rico de informações essenciais para a regulação das HSC, nele está presente diversos componentes moleculares e celulares que implicam na regulação e atividade das HSC, incluindo células-tronco mesenquimais perivascularares, células endoteliais, osteoblastos, células de linhagem de adipócitos, nervos do sistema nervoso simpático (SNS), células Schwann não mielinizantes, macrófagos, megacariócitos, entre outros. Esse sistema é uma orquestração altamente dinâmica regulada por fatores intrínsecos e sinais extrínsecos do microambiente, que contribuem para a quiescência, proliferação e diferenciação das HSC (PINHO e FRENETTE, 2019).

As HSC mais primitivas são conhecidas como células-tronco hematopoiéticas de longo termo (LT-HSC, do inglês – *Long-Term Hematopoietic Stem Cells*) porque mantem-se na fase G₀ do ciclo celular por longos períodos, sendo as mais quiescentes do sistema. As LT-HSC formam um conjunto de células de reserva e pequena parcela diferencia-se em células totipotentes de curta duração (ST-HSC, do inglês – *short-term hematopoietic stem cells*), que na dependência dos fatores de diferenciação e estímulos neurais e hormonais presentes no nicho formarão células multipotentes progenitoras (MPP, do inglês *multipotent progenitors*) que vão

gerar as células progenitoras comprometidas com a linhagem mielóide (CMP, do inglês *common myeloid progenitor*) e linfóide (CLP, do inglês *common lymphoid progenitor*) (Figura 1) (MORRISON e WEISSMAN, 1994; BRYDER e WEISSMAN, 2006; WEISSMAN, I.L. 2000; revisto por NAKAMURA-ISHIZU *et al.*, 2014).

A porcentagem de células que entra no ciclo celular varia de acordo com o tipo celular (CHESHIER *et al.*, 1999). A quiescência das células mais primitivas é uma propriedade fundamental porque evita a exaustão em períodos de grande de demanda de hematopoiese. Estudos recentes, mostraram que a quiescência das HSC é regulada por uma rede complexa de fatores intrínsecos e extrínsecos às células, induzidos em resposta a vários estresses, como por exemplo, inflamação ou perda de sangue (LUDIN *et al.*, 2014; GOLAN *et al.*, 2018; FIELDING *et al.*, 2022). Este controle estrito ocorre em uma região específica chamada de nicho hematopoiético.

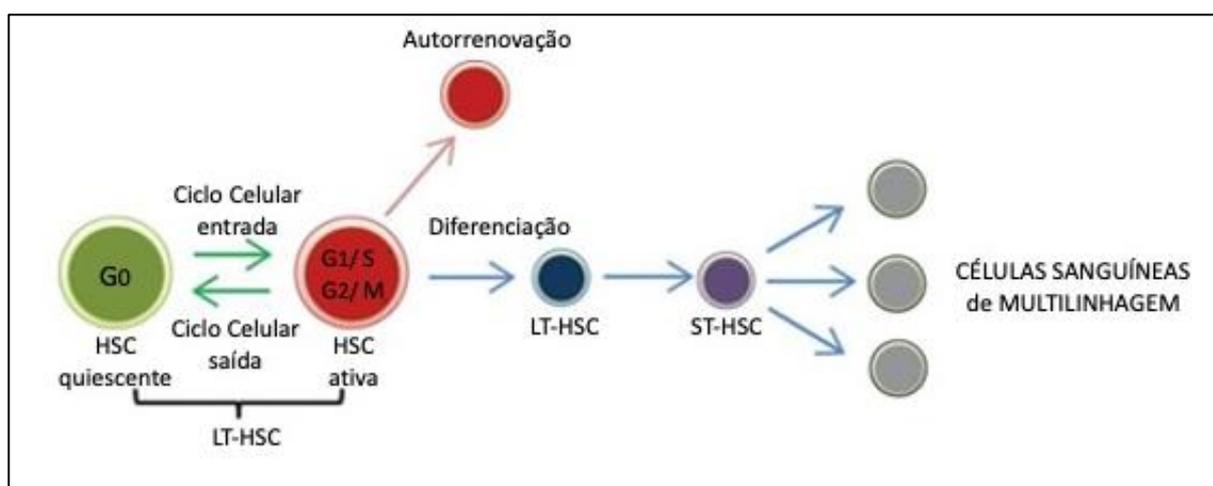


Figura 1. Fases de diferenciação das HSPC. HSC quiescentes na fase G0 podem ser ativadas para entrar no ciclo celular (fases G1/S/G2/M) para se autorrenovar ou diferenciar. As HSC ativas também podem sair do ciclo celular e retornar à quiescência. Após a diferenciação, acredita-se que as HSC de longo prazo (LT-HSC) dão origem a células com menor potencial de repovoamento – HSC de médio prazo e de curto prazo (ST-HSC) – e subsequentemente produzem multilinhagem células sanguíneas. (adaptado de NAKAMURA-ISHIZU *et al.*, 2014).

1.1. Nicho hematopoiético

O “nicho” das células-tronco hematopoiéticas, como foi definido por SCHOFIELD em 1978, fornece um ambiente especializado que preserva sua capacidade de repovoamento. Em adultos, a produção hematopoiética é feita em vértebras, costelas, crânio, esterno, sacro, pelve

e cabeça dos ossos longos. O nicho hematopoiético é envolvido pela lamínula óssea (metáfise) e no endóstio, interface entre o osso e a medula óssea, são encontrados os osteoblastos e osteoclastos (Figura 2) (OH *et al.*, 2010). O perióstio, região mais externa do osso, é onde ocorre a entrada e saída dos vasos sanguíneos e fibras nervosas. A irrigação dos nichos é feita por um sistema de sinusóides, que são vênulas irregularmente dilatadas compostos por uma camada descontínua de células endoteliais fenestradas próprio para locais de grandes trocas. Estes vasos estão a jazante dos locais de trocas metabólicas que ocorre nos capilares entre arteríolas e vênulas. Existe um suprimento particularmente rico de arteríolas, bem como de sinusóides, perto do endóstio que é circundado por um ambiente vascularizado e innervado (MORRISON e SCADDEN, 2014).

A hematopoiese na medula óssea é regulada pelo simpático e parassimpático. Fibras parassimpáticas chegam até à metáfise femoral (FIELDING e MÉNDEZ-FERRER, 2020). Junto com outros derivados da crista neural, fibras nervosas simpáticas fazem parte de um microambiente especial localizado nas intersecções entre osso e medula, conhecido como nicho medular, onde se localizam as células primitivas do sistema hematopoiético e que regula formação de elementos figurados sanguíneos em condições de normais e de estresse. Fisiologicamente a inervação simpática da MO regula a formação e degradação óssea e a produção de células sanguíneas (JUNG *et al.*, 2017; HANOUN *et al.*, 2015).

O nicho é essencial e fundamental para a (I) automanutenção da totalidade de células tronco hematopoiéticas indiferenciadas; (II) geração e manutenção de um conjunto de células progenitoras capazes de se diferenciar em todos os elementos figurados do sangue; (III) proliferação e diferenciação de células precursoras em células diferenciadas que migram para a corrente sanguínea. Resumidamente, enquanto um pequeno número de células-tronco é responsável pela manutenção da quantidade de células maduras, o restante encontra-se em quiescência contribuindo para manter um potencial hematopoiético quando há aumento de demanda. Este equilíbrio entre auto renovação e diferenciação garante a homeostase hematopoiética (BRYDER *et al.*, 2006; SZADE, *et al.*, 2018). A diferenciação excessiva ou auto renovação insuficiente esgota o conjunto de HSC, enquanto diferenciação insuficiente ou auto renovação desenfreada pode levar a doenças mielo proliferativas ou leucemia (PINHO e FRENETTE, 2019).

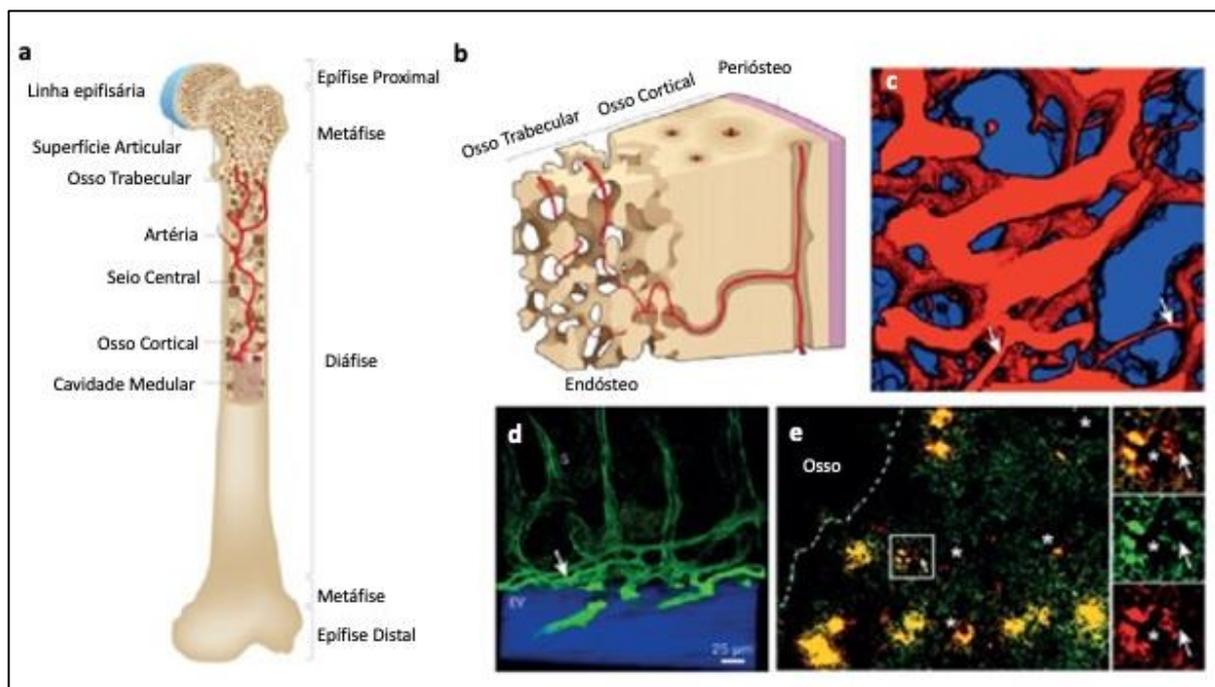


Figura 2. Anatomia da medula óssea. a. Microarquitetura do fêmur; b. Interfase entre o osso e a MO (endósteo), trabécula óssea, circulação medular; c. Fotomicrografia 3D reconstruída da MO em direção à superfície endosteal (azul, 50 μ m abaixo da superfície), mostrando a rede de vasos sanguíneos (vermelho). Vasos arteriulares menores (setas brancas) tornam-se vasos sinusoidais maiores (campo de visão, 350 μ m \times 350 μ m). d. Visão transversal dos vasos sanguíneos que correm ao longo da superfície endosteal (EV) e essa transição (seta branca) em sinusoides (S) que então seguem em direção ao seio central. e. Células-tronco de longo prazo (LT-HSC: CD150⁺CD48⁻CD41⁺) residindo em contato próximo não apenas com células vasculares e perivasculares (seta branca; * sinusoides), mas também com megacariócitos (grandes células amarelas) e outras células hematopoiéticas. Na ampliação, CD150 em vermelho e CD48, CD41 em verde. (imagem adaptada de MORRISON e SCADDEN, 2014).

1.2. A hierarquia da diferenciação hematopoiética

Desde os anos 60 quando as HSC foram identificadas por Till e McCulloch, estudos estabeleceram bases e propriedades a obtenção das HSPC para estudos. Pela localização e anatomia, e por serem fortemente interconectadas em um tecido, essas células podem ser facilmente isoladas sem sofrerem muito estresse. O isolamento a partir do sangue periférico é minimamente invasivo e milhões de células podem ser facilmente colhidas. Muitos tipos de células sanguíneas são naturalmente capazes de extravasar em tecidos compactados e sustentar enormes forças de cisalhamento, portanto, toleram bem o isolamento por citometria de fluxo (revisto por RIEGER e SCHROEDER, 2012). Dessa forma foram determinados padrões de expressão de marcadores de superfície para avaliar autorrenovação e função, clonogenicidade

e potencial de formação de linhagens específicas (MORRISON e WEISSMAN, 1994; KIEL *et al.*, 2005; INLAY *et al.*, 2009).

As HSPC são comumente caracterizadas por não expressarem marcadores de linhagens (Lin^+), expressos em hemácias, células T, células B, granulócitos, monócitos/macrófagos, natural killers, monócitos e granulócitos, entre outras células diferenciadas e são referidas por células “L-SK” por expressarem os marcadores: stem cell antigen-1 (sca-1); receptor de stem cell factor (c-KIT); e Thy-1 (CD90) (SPANGRUDE *et al.*, 1988). Esses marcadores, c-KIT, Thy-1.1^{lo}, $\text{Lin}^{-/lo}$, sca-1^{hi}, reconhecem todas as células multipotentes da medula óssea e podem subdividir essas subpopulações por marcadores de superfície e por grau de auto renovação (MORRISON e WEISSMAN, 1994).

A proteína de ativação de linfócitos (Ly-6 A/E, conhecida por sca-1), é uma proteína de membrana celular âncora-glicosil-fosfatidilinositol (GPI-AP) e é encontrada em células-tronco hematopoiéticas, mamárias, cardíacas e mesenquimais de camundongos (BRADFUTE *et al.*, 2005; HOLMES e STANFORD *et al.*, 2007; VALENTE *et al.*, 2014). A expressão de SCA-1 é regulada durante a formação de células hematopoiética, e é o marcador de escolha para enriquecer amostras medulares em HSC (SPANGRUDE e WEISSMAN, 1988). A redução da expressão de sca-1 é observada quando HSC se diferenciam em progenitores mielóides comuns (AKASHI *et al.*, 2000) e progenitores linfóides (KONDO *et al.*, 1997).

As membranas celulares não são estruturas homogêneas. Apresentam especializações bioquímicas ligadas a alterações funcionais. Uma destas especializações são as balsas lipídicas. Estes micros domínios apresentam uma maior concentração de colesterol e glicoesfingolípídeos que coordenam arranjos de receptores acoplados à proteína G como os noradrenérgicos e melatonérgicos, receptores canais, e receptores com atividade tirosina quinase, como c-KIT, receptores de insulina, etc. (JAHN *et al.*, 2007, RATAJCSZAK e ADAMIAK, 2015; SETHUMADHAVAN e MANI., 2020). Existem dois tipos de balsas lipídicas, as balsas planares e as balsas lipídicas invaginadas ou cavulares, que são exemplos de micro domínios ricos em colesterol na membrana celular e o colesterol pode ser visualizado como um tipo de “cola molecular” que mantém os componentes das balsas lipídicas unidos. As balsas lipídicas organizam as moléculas de sinalização e as vias de segundos mensageiros (REEVES *et al.*, 2012) coordenando funções. Nas HSPC, as balsas lipídicas organizam processos de retenção no nicho e quiescência, bem como na regulação da migração, mobilização e volta de HSPC do sangue para a medula (“*homing*”) (RATAJCSZAK e ADAMIAK, 2015).

Vale notar que quando o marcador c-KIT (receptores de tirosina-quinase tipo III) localiza-se em balsas lipídicas é facilitada a sobrevivência e a proliferação de células HSC

(RATAJCZAK e ADAMIAK, 2015). Esta situação tem relevância nos ciclos fisiológicos, e também é um indicativo de malignidade. A interação do fator de células-tronco (SCF) ao receptor c-KIT, promove a formação de um dímero e ativa a função tirosina quinase. Após a ativação, o receptor é ubiquitinado e internalizado em lisossomos para eventual degradação. SCF também induz quimiotaxia, quimiocinese e adesão celular via integrinas. Também foi demonstrado que a administração da porção solúvel de c-KIT em camundongos aumenta a mobilização induzida pelo fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF). A sinalização através do KIT desempenha um papel na sobrevivência, proliferação e diferenciação das células HSPC (BLUME-JENSEN *et al.*, 1991; SHIN *et al.*, 2014).

O uso de outros marcadores em conjunto com as “L-SK”, distinguem e refinam as subpopulações de HSC, como é o caso da identificação dos marcadores de superfícies da família de moléculas de ativação de linfócitos sinalizadores (SLAM), que foi um marco importante para a distinção entre células-tronco e células progenitoras hematopoiéticas (WEKSBERG *et al.*, 2008). Os receptores CD150, CD244 e CD48 da família SLAM são expressos diferencialmente em células progenitoras distintas. O CD150 foi identificado na população primitiva das células-tronco, em ensaios de reconstituição de linhagens em camundongos irradiados. Os receptores de células de medula óssea CD150⁺, mas não os CD150⁻, apresentavam uma completa restauração das linhagens primitivas e o uso de suas medulas reconstituía outros animais receptores (KIEL *et al.*, 2005).

Todos estes componentes que participam do sistema imunológico e hematopoiético, são caracterizados por uma estrutura de tempo multi-frequencial, com ritmos proeminentes na proliferação celular e função celular no circadiano, infradiano e ritmos na proliferação celular e função celular. Alguns ritmos circadianos das funções hematológicas parecem ser inatos e presumivelmente determinados geneticamente, mas são modulados e ajustados em seu tempo por fatores ambientais, os chamados sincronizadores, importantes na modulação da fisiologia e comportamento do sistema. Entretanto, a maioria dos processos fisiológicos não é uniforme, mas varia de acordo com a hora do dia. Na medula óssea, o tráfego de HSC e a hematopoiese não escapam da regulação circadiana que controla a maioria dos processos fisiológicos (MÉNDEZ-FERRER, 2009).

Esse conhecimento sobre a hematopoiese, células e suas interações, tem importantes implicações clínicas, pois os avanços na compreensão desse sistema fornecem um rico aprendizado para tratamentos e transplantes clínicos de células hematopoiéticas, e identificar e explorar proteínas e moléculas para amplificar ou suprimir determinados tipos de células sanguíneas (CARROL e CLAIR, 2018); compreender a progressão gradual dos estágios pré-

leucêmicos levando primeiro a distúrbios mieloides crônicos, leucemias blásticas agudas; e tratamento de doenças malignas e não malignas com subconjuntos de células (WEISSMAN e SHIZURU, 2008).

1.3. Os ciclos circadianos influenciam o nicho hematopoiético

A regulação do complexo microambiente da medula óssea onde ocorre a hematopoiese é impactada pelos ritmos biológicos (MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2009). O sistema circadiano consiste em relógios centrais e periféricos. O relógio central em mamíferos deriva de uma rede de neurônios no núcleo supraquiasmático (NSQ). Os ritmos circadianos celulares são gerados pela expressão assíncrona dos chamados “genes do relógio” presentes em todas as células do organismo (KAMPHUIS *et al.*, 2005). O NSQ está diretamente ligado à retina via o trato retino-hipotalâmico que envia informações fóticas, independente da visão e arrasta os ritmos do relógio central redefinindo o padrão diário das oscilações circadianas (PROVENCIO *et al.*, 2002; GERY e KOEFFLER, 2010). Portanto, o ritmo circadiano é endógeno, mas este é arrastado pelas condições de iluminação ambiental permitindo que o organismo seja sincronizado às alternâncias claro/ escuro da Terra. Discute-se que o relógio central sincroniza esses osciladores periféricos de forma hierárquica. Estima-se que, em qualquer tecido, até 10% dos genes em sejam compostos por genes controlados pelos genes do relógio ou por hormônios circadianos (SCHEIERMANN e FRENETTE, 2013). Tanto em humanos como em roedores, os processos hematopoiéticos apresentam ritmos de 24 horas (BJARNASON e JORDAN, 2000; O-NEIL *et al.*, 2011; SANFORD *et al.*, 2022). Em camundongos adaptados a um determinado ciclo claro/ escuro, ritmicidade das células da medula óssea é mantida por até 4 dias após colocar os animais em condições arrítmicas, quer escuro ou claro constante (OHTA, *et al.*, 2006). Como é sabido que o claro constante resseta o núcleo supraquiasmático, enquanto o escuro constante permite detectar o ritmo do relógio de cada indivíduo, foi proposto que a medula óssea não está diretamente sob o controle do NSQ, mas sim, mantém um controle de ritmo circadiano independente e próprio. Portanto, está sendo feita uma intensa revisão dos conceitos de como as funções da produção de células sanguíneas variam circadianamente (MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2009).

A liberação fisiológica de células tronco hematopoiéticas na circulação não é aleatória ou constante, mas segue oscilações circadianas. Méndez-Ferrer *et al.*, (2008), identificou essa ação estudando os padrões circadianos e os mecanismos por trás da liberação de HSC na homeostase, submetendo camundongos a flutuações circadianas, analisando o comportamento

das células-tronco hematopoiéticas e progenitoras em diferentes situações. O tráfego circadiano de células tronco hematopoiéticas é orquestrado no sistema nervoso central por genes centrais do relógio molecular, que regulam a atração de HSC para seus nichos de medula óssea por secreção rítmica de noradrenalina dos terminais nervosos, ativação do receptor β 3-adrenérgico, degradação do fator de transcrição Sp1 e regulação negativa de CXCL12, uma molécula conhecida por ser a única capaz de realizar uma migração direcionada (MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2008; MAESTRONI, 2020). Os atratores químicos de HSC localizado na medula óssea (CXCL12) e no sangue (S1P) regulam dinamicamente a manutenção destas células na MO ou no sangue. Em situações estressantes, quando é requerido um aumento de células no sangue, este é mediado pela redução de CXCL12 e aumento de S1P. Estes mesmos mediadores regulam a formação de osso (GOLAN *et al.*, 2013).

Estudos com modelos pré-clínicos funcionais de células-tronco, demonstraram a influência do período claro e escuro na diferenciação, no reabastecimento de células sanguíneas. Foi identificado dois picos diários nos níveis de HSPC na medula óssea, um 5 horas após a entrada da luz e o outro, 5 horas após o início do escuro. O período claro envolve diferenciação, migração, aumento da permeabilidade vascular, saída e reposição de células sanguíneas, enquanto o período de escuro envolve diminuição da permeabilidade vascular da BM e renovação do reservatório das células-tronco primitivas, além da proliferação das células-tronco progenitoras (GOLAN *et al.*, 2018). Resumidamente, esses dados sugeriram que o fenótipo, a função das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, estão sujeitos a mudanças determinadas pelo ciclo claro e escuro, como por exemplo, na alteração na expressão dos marcadores de superfície CD150 e c-KIT a noite (GOLAN *et al.*, 2018; Golan *et al.*, 2019).

Além das HSPC, as células do sistema imunológico, como monócitos, macrófagos e leucócitos maduros, exibem oscilações circadianas nos genes do relógio central, bem como genes controlados pelo relógio e funções fisiológicas (KELLER. M. *et al.*, 2009, LUDIN *et al.*, 2012; COSSÍO I. *et al.*, 2019). Os macrófagos e monócitos desempenham uma série de funções dentro do sistema imune inato, sendo importante observar a diferença entre macrófagos derivados de monócitos e macrófagos residentes em tecidos, pois os macrófagos derivados de monócitos, são derivados da hematopoiese e recrutados para os tecidos durante a inflamação, os macrófagos residentes nos tecidos, são uma população heterogênea de células que se autorrenovam e seu fenótipo é controlado em grande parte pelo ambiente tecidual (OLIVA-RAMÍREZ *et al.*, 2014). Já os leucócitos maduros se infiltram na medula óssea no período do escuro de maneira circadiana pois há relatos que os leucócitos participam do nicho

hematopoiético e são responsáveis pela interação entre imunidade e hematopoiese (COSSÍO I. *et al.*, 2019).

A fisiologia do sistema formador de sangue, além de ser controlada a nível celular pelo estroma da medula óssea e pelas catecolaminas, como já mencionados, também é controlada por fatores neuroendócrinos incluindo substância P, neurocinina-A (MAESTRON e CONTI, 1996; MAESTRONI, 1998; MAESTRONI, 2000) e o hormônio melatonina (CONTI *et al.*, 2008; GOLAN *et al.*, 2018; GOLAN *et al.*, 2019).

Um melhor entendimento da regulação neural e neuroendócrina da hematopoiese pode fornecer novas perspectivas conceituais e terapêuticas em uma variedade de doenças hematopoiéticas e imunes (MAESTRONI *et al.*, 1998).

1.4. Melatonina

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) foi descrita originalmente como hormônio da glândula pineal (LERNER *et al.*, 1958). Atualmente, é considerada uma molécula multifatorial por apresentar efeitos cronobiológicos, em resultado da sua produção de forma rítmica pela glândula pineal, e também por efeitos que não estão ligados a ritmicidade do organismo, tal como a produção extra-pineal dessa molécula (MARKUS *et al.*, 2007). A produção extra-pineal de melatonina, ocorre geralmente de forma não rítmica e depende de estímulos específicos. Pode ser produzida de forma constitutiva ou induzida, atuando de forma autócrina ou parácrina fora da glândula pineal (revisto por MARKUS, R.P. *et al.*, 2007; MARKUS, R.P. *et al.*, 2017).

Em mamíferos, foram descritas várias fontes extra pineais, capazes de sintetizar melatonina: células do trato gastrointestinal (BUBENIK, 2002; KONTUREK, *et al.*, 2007); retina (ZMIJEWSKI *et al.*, 2007); pele (SLOMINSKI, 2002); células imunocompetentes (CARRILLO-VICO *et al.*, 2004; PONTE G.N. *et al.*, 2006; MALDONADO, M.D. *et al.*, 2010); células do colostro humano (PONTES *et al.*, 2006; PIRES-LAPA *et al.*, 2013); cérebro (JIMENEZ-JORGE *et al.*, 2007; PINATO *et al.*, 2015); medula óssea (MAESTRONI e CONTI, 1996; TAN *et al.* 1999; GALLI *et al.* 2014; GOLAN *et al.*, 2018); macrófagos residentes pulmonares (FERNANDES *et al.*, 2021) e de forma induzida por células do sistema imunológico (CONTI *et al.*, 2000; CARRILO-VICO *et al.*, 2004; PONTES *et al.*, 2006; MALDONADO *et al.*, 2010; MARKUS *et al.*, 2021).

A via de biossíntese da melatonina, altamente conservada, inicia-se com a conversão aminoácido triptofano em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase 1

(TPH1). 5-HTP é descarboxilado dando origem à serotonina, que é convertida em N-acetilserotonina (NAS) na presença da enzima serotonina-N-acetiltransferase fosforilada (SNAT). A metilação de NAS catalisada pela enzima acetilserotonina metiltransferase (ASMT), também conhecida como hidroxindol-O-metiltransferase (HIOMT), resulta na melatonina (WURTMAN *et al.*, 1965; SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003). Tanto na glândula pineal, quanto em tecidos extra pineais, a produção de melatonina é dependente da expressão e ativação das enzimas P-SNAT e ASMT (AXELROD *et al.*, 1964; MARKUS *et al.*, 2018). Na pineal e em macrófagos a síntese de melatonina é controlada pela transcrição e fosforilação de SNAT disparada por adrenoceptores $\beta 1$ (SIMONNEAUX e RIBELAYGA, 2003; PIRES-LOPES *et al.*, 2018).

As duas isoformas da enzima triptofano-hidroxilase são enzimas limitantes na síntese de serotonina e sua variação diária está ligada ao ritmo dos hormônios do córtex da adrenal e pistas comportamentais (MALEK *et al.*, 2007). No sistema nervoso central TPH2 é a principal isoforma, enquanto em pinealócitos a exemplo do que ocorre nas células da medula óssea foi encontrada a TPH1 (HUANG *et al.*, 2008). Em ratos a síntese de melatonina e o conteúdo de TPH1 são maiores à noite. O conteúdo de serotonina e TPH1 são significativamente reduzidos por luz à noite. Este efeito é resultante da ativação simpática.

A produção da melatonina pela glândula pineal também pode ser regulada pelo comprimento do fotoperíodo, via controle da síntese e atividade da enzima ASMT. A ASMT é o passo limitante da síntese de MLT portanto quando a regulação da enzima SNAT é responsável pelo ciclo circadiano da melatonina, a enzima ASMT parece ser responsável pela variação da amplitude da produção de melatonina provocada pela diferença do fotoperíodo ao longo das estações do ano (RIBELAYGA *et al.*, 1998).

A efetuação da resposta da melatonina é dependente da ativação de receptores acoplados à proteína G que já foram localizados na membrana celular, nuclear e membrana de mitocôndrias. A melatonina é uma molécula aceptora de elétrons, atuando como antioxidante. No entanto, é preciso destacar que esta é uma reação estequiométrica com radicais livres e, portanto tem relevância na para concentrações muito altas de melatonina, cerca de 10.000 vezes maior que a concentração que atua nos receptores. A melatonina atua em receptores de alta afinidade acoplados à proteína G (MT1 e MT2, faixa pM-nM), mas também responde as ligações à diversas moléculas intracelulares, acarretando modulação de cascatas de sinalização, e, na ativação direta ou indireta de receptores nucleares que regulam a transcrição de genes alvos (revisto por LIU *et al.*, 2019). A caracterização funcional dos receptores de melatonina em diferentes espécies evidencia perfis farmacológicos espécie-específicos (MAILLIET *et al.*,

2004; AUDINOT *et al.*, 2008; DEVAVRY *et al.*, 2012; GAUTIER *et al.*, 2018). Historicamente o estudo de receptores de melatonina e foi baseado em ensaios com leitura fisiológica em tecidos nativos que expressam receptores de melatonina e em ensaios bioquímicos em células que expressavam os receptores de forma natural ou induzida (revisto por CECON *et al.*, 2023). Mais recentemente, o a aplicação de técnicas de imagem e ligantes de fluorescência específicos que permite o entendimento das vias de sinalização e da localização celular dos dímeros ativos (Figura 4).

O receptor MT1 é codificado pelo gene MTNR1A localizado no cromossomo 4q35.1 e consiste em 351 aminoácidos. Já o receptor MT2 é codificado pelo gene MTNR1B localizado no cromossomo 11q21-q22 e consiste em 363 aminoácidos (ALEXANDER *et al.*, 2021; CARDINALI *et al.*, 2023). Ambos os receptores formam homo e heterodímeros (Figura 4). Os homodímeros de receptores MT1/MT1 e MT2/MT2 ativam a proteína Gi, inibindo a produção do segundo mensageiro AMP cíclico (cAMP). Na maioria dos sistemas experimentais, os receptores MT₁ e MT₂ estão acoplados à proteína Gi, resultando na diminuição da atividade da adenililciclase e dos níveis de AMPc (CECON *et al.*, 2016). Os dímeros MT1/MT1 também podem estar acoplados a Gq que modula o efeito da melatonina via regulação da concentração intracelular de cálcio. Foi identificado que diferentes tecidos e células expressam receptores de melatonina, entre eles, cérebro (CARDINALI *et al.*, 1979); células pancreáticas (BÄHR *et al.*, 2012) e células-tronco mesenquimais humanas (LEE *et al.*, 2014), e células que expressam receptores recombinantes (MACKENZIE *et al.*, 2002), células-tronco hematopoiéticas (GOLAN *et al.*, 2018), entre outros (HOTTA *et al.*, 2000; revisto por CECON *et al.*, 2018). Há também a possibilidade de formar heterodímeros de forma a controlar o efeito da melatonina de acordo com os receptores que formam os pares. O heterodímeros MT1/MT2 aumenta a capacidade do receptor MT1 sinalizar via proteína Gq, e com isso muda a forma de transcrição do sinal. A dimerização de MT1/GPR50 inativa o receptor MT1 porque o sítio de ligação propriamente dito não fica aparente para a melatonina. GPR50 é um receptor acoplado à proteína G órfão em mamíferos. Esta molécula que é estruturalmente semelhante aos receptores acoplados à proteína G não é capaz de ativar a via de transdução. Interessante notar, que GPR50 é homólogo ao receptor de melatonina Mel1c encontrado em anfíbios e aves (DUBOCOVITCH *et al.*, 2010). Dessa forma, a expressão da molécula GPR50 pode levar a uma inibição do efeito da melatonina, apesar de serem detectados receptores na membrana em estudos de imagem. Uma outra interação importante é a dimerização com receptores de serotonina 5HT_{2c}. MT2/5HT_{2c} é um dímero funcional. A melatonina liga-se à porção MT2 e transduz via a porção 5HT_{2c}. Apesar de fora do escopo desta tese, fica registrado que esta resposta bisada demorou

muitos anos a ser consolidada e abre um espaço interessante para avaliar respostas farmacológicas da melatonina e da própria serotonina. Em suma, os conhecimentos sobre a efetuação da resposta melatonérgica estão em processo de consolidação, e a busca de dados básicos pode revelar condições específicas no caso do processo de hematopoiese.

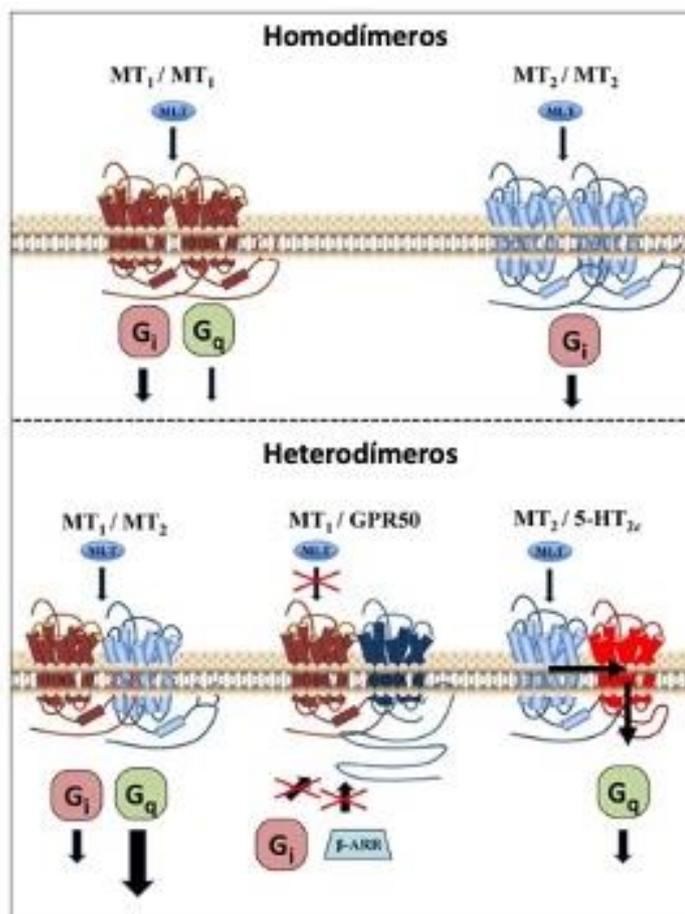


Figura 3. Sinalização de homômeros e heterômeros do receptor de melatonina. A ativação da melatonina dos homômeros MT1/MT1 desencadeia a sinalização intracelular predominantemente através da via G_i sobre a via G_q , enquanto os homômeros MT2/MT2 sinalizam exclusivamente através das proteínas G_i . No heterômeros MT1/MT2, a sinalização da melatonina é direcionada para a ativação do G_q sobre o G_i . Ao dimerizar com GPR50, o receptor MT1 perde sua capacidade de se ligar à melatonina, desencadear a sinalização G_i e recrutar β -arrestina (β -ARR). MLT, melatonina (adaptado de CECON *et al.*, 2018).

1.4.1. Melatonina e o nicho hematopoiético

A partir dos anos 90, estudos começaram a identificar efeitos da melatonina nas funções fisiológicas na medula óssea. Melatonina exógena atuava diretamente em células T auxiliares da medula óssea impedindo a apoptose de células progenitoras mieloides induzida por fármacos e protegia células progenitoras de granulócitos/macrófagos (MAESTRONI *et al.*,

1994, ANWAR, *et al.*, 1998; CONTI *et al.*, 1998; TAN *et al.*, 1999). Além disso, a concentração de melatonina em células da medula óssea de camundongos é maior que no sangue (CONTI e MAESTRONI, 1998). Posteriormente foi mostrada a presença de SNAT sugerindo que células da medula óssea de camundongos e humanos poderiam sintetizar melatonina (CONTI *et al.*, 2000). O efeito da melatonina exógena e endógena está relacionado com a capacidade de reduzir radicais livres (REITE *et al.*, 1995; REITER *et al.*, 1998; e TAN *et al.*, 1999) e regular a expressão de receptores e mediadores de processos de proliferação e diferenciação celular (GOLAN *et al.*, 2018). Do ponto de vista funcional, a melatonina transduz informações ambientais para o sistema hematopoiético (MAESTRONI *et al.*, 2006), influencia no ritmo circadiano de células-tronco mesenquimais (LYKOV *et al.*, 2017) e hematopoiéticas (HRUSHESKY *et al.*, 2015; GOLAN *et al.*, 2018), e apresenta efeito citoprotetor (CASANOVA-ACEBES *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2015; MAN *et al.*, 2016; BORNING *et al.*, 2017).

Estudos buscam determinar um conceito mecanicista sobre como a proliferação, a manutenção HSPC são reguladas e sincronizadas diariamente. Essas células são responsáveis por manter um pool diário para reabastecimento, pela migração de células sanguíneas e imunes da medula óssea para o sangue periférico, e são reguladas por vários tipos de sinais celulares, que residem no microambiente hematopoiético e por ciclos externos na presença e ausência de luz, que são traduzidos por sinais neurais e hormonais, incluindo a sinalização simpática (MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2008; GARCIA-GARCIA *et al.*, 2019.), melatonina (GOLAN *et al.*, 2018) e reguladas pelas interações entre hormônios, citocinas inflamatórias e macrófagos.

O SNC, funciona como um oscilador central que governa a atividade circadiana do organismo baseado em parte no desencadeamento da liberação de sinais hormonais como noradrenalina e melatonina por componentes do SNS. Um estudo realizado com camundongos por Golan *et al.*, (2018) mostrou um pico matinal de noradrenalina e do fator de necrose tumoral (TNF), importante citocina inflamatória que é secretada principalmente por leucócitos ativados (REZZOUG *et al.*, 2008), induz a permeabilidade vascular para reabastecer o sangue, aumenta temporariamente os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS), facilita a proliferação, diferenciação e migração de HSPC. Em contraste, o período do escuro, um segundo pico de TNF aumenta a secreção de melatonina para conduzir a renovação de HSPC e atividade das LT-HSC através da modulação da expressão de CD150 e c-KIT, macrófagos, o que resulta na redução da permeabilidade vascular e dos níveis de ROS nas HSPC, facilitando assim, a manutenção dessas células. Esses achados revelam que os picos de noradrenalina, TNF e melatonina induzidos pela entrada do claro e escuro são essenciais para a produção sincronizada

de células sanguíneas maduras e repovoamento o conjunto de HSPC. Vale ressaltar que nestes processos o TNF está exercendo um efeito fisiológico. Como descrevemos a seguir, as espécies reativas de oxigênio (ROS) também têm papel fisiológico no controle da proliferação e diferenciação de células tronco hematopoiéticas.

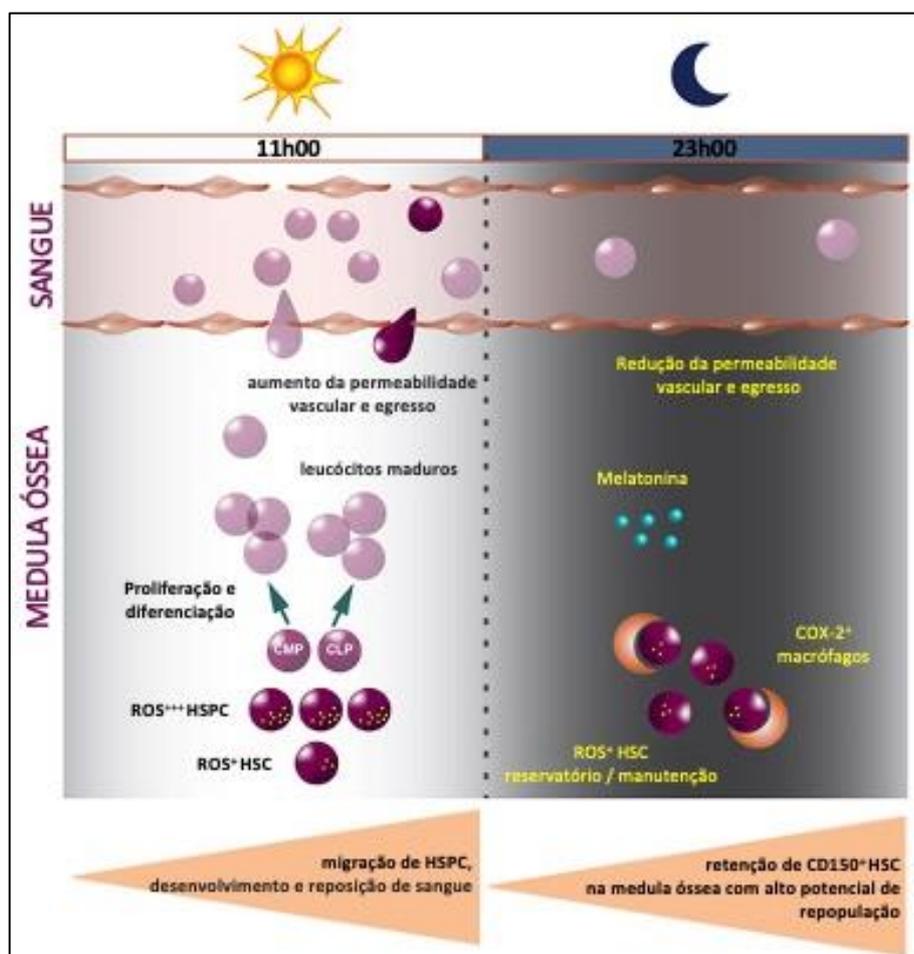


Figura 4. A entrada do claro e o período de escuro controlam diferencialmente a diferenciação e manutenção das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas. O início do período claro e escuro induz explosões de noradrenalina e TNF na medula óssea, que regulam transitoriamente e aumentam temporariamente o nível de ROS nas HSPC às 11h00 e 23h00. Às 11h00 a noradrenalina induz a permeabilidade vascular, diferenciação e saída das HSPC para o sangue. E às 23h00, a melatonina aumenta a expressão de CD150⁺, a retenção de HSC e a autorrenovação (adaptado de GOLAN *et al.*, 2018).

O conteúdo de ROS influencia a migração, o desenvolvimento e a autorrenovação das células-tronco, bem como o status do ciclo celular. Em células-tronco quiescentes (LT-HSC), os níveis de ROS são mantidos baixos, apoiando assim sua capacidade de repovoamento a longo prazo. A elevação no conteúdo de ROS impulsiona a diferenciação de LT-HSC para ST-HSC e a seguir para diferenciação em progenitoras mieloide (JANG e SHARKIS, 2007; LUDIN *et*

al.; 2014). Evidências cumulativas, também, indicam que o SNS regula a proliferação e diferenciação de HSPC e a migração de HSPC e leucócitos entre a MO e os locais extramedulares. Isso foi sugerido inicialmente porque os níveis de catecolaminas no sangue e na MO aderiam a ritmos circadianos que também afetavam a proliferação de células da MO que expressavam receptores de catecolaminas (MAESTRONI *et al.*, 1998). Juntos, esses dados definem um circuito complexo que liga o SNS, as vias das citocinas inflamatórias, melatonina e outros, na regulação de estados funcionais distintos do HSPC ao longo do dia.

Considerando a grande variabilidade do sistema melatonérgico há necessidade de um trabalho de base para se determinar a variação circadiana das células hematopoiéticas ao mesmo tempo que se determina a expressão de receptores de acordo com os tipos celulares.

CONCLUSÕES

- Melatonina é produzida e liberada ritmicamente pelas células da medula óssea.
- As expressões das enzimas P-SNAT e ASMT apresentam variação ao longo do dia na dependência do tipo celular da medula óssea.
- As expressões dos receptores MT1 e MT2 variam ao longo do dia deferentemente para cada tipo/função das células da medula óssea.
- A entrada do claro, mas não a do escuro, sincroniza a produção de melatonina pela medula óssea.
- Os dados sugerem que a variação do conteúdo de melatonina na medula óssea é orquestrada pelo sistema simpático.

REFERÊNCIAS

- AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; *et al.* A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, v. 404, n. 6774, p. 193-197, 2000. DOI: [10.1038/35004599](https://doi.org/10.1038/35004599)
- BERTRAND, J. Y.; GIROUX, S.; CUMANO, A.; *et al.* Hematopoietic stem cell development during mouse embryogenesis. *Developmental Hematopoiesis: Methods and Protocols*, p. 273-287, 2005. DOI: [10.1385/1-59259-826-9:273](https://doi.org/10.1385/1-59259-826-9:273)
- BJARNASON, Georg A.; JORDAN, Richard. Circadian variation of cell proliferation and cell cycle protein expression in man: clinical implications. *Progress in cell cycle research*, p. 193-206, 2000. DOI: [10.1007/978-1-4615-4253-7_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4253-7_17)
- 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. DOI: [10.1016/j.exphem.2005.04.001](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2005.04.001)
- BRYDER, D.; ROSSI, D. J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *The American journal of pathology*, v. 169, n. 2, p. 338-346, 2006. DOI: [10.2353/ajpath.2006.060312](https://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060312)
- BLUME-JENSEN, Peter *et al.* Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis. *The EMBO journal*, v. 10, n. 13, p. 4121-4128, 1991. DOI: [10.1002/j.1460-2075.1991.tb04989.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04989.x)
- CARROLL, D.; CLAIR, S. T.; DARET, K. Hematopoietic stem cells: normal versus malignant. *Antioxidants & redox signaling*, v. 29, n. 16, p. 1612-1632, 2018. DOI: [10.1089/ars.2017.7326](https://doi.org/10.1089/ars.2017.7326)
- CHESHER, S. H.; MORRISON, S. J.; LIAO, X.; *et al.* In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 6, p. 3120-3125, 1999 DOI: [10.1073/pnas.96.6.3120](https://doi.org/10.1073/pnas.96.6.3120)
- FIELDING, C.; GARCÍA-GARCÍA, A.; KORN, C.; *et al.* GADOMSKI, S., FANG, Z., REGUERA, J. L. Cholinergic signals preserve haematopoietic stem cell quiescence during regenerative haematopoiesis. *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 543, 2022. DOI: [10.1038/s41467-022-28175-1](https://doi.org/10.1038/s41467-022-28175-1)
- FERNANDES, P. A.; KINKER, G. S.; NAVARRO, B. V.; *et al.* Melatonin-Index as a biomarker for predicting the distribution of presymptomatic and asymptomatic SARS-CoV-2 carriers. *Melatonin Research*, v. 4, n. 1, p. 189-205, 2021. DOI: [10.32794/mr11250090](https://doi.org/10.32794/mr11250090)
- FIELDING, C.; MÉNDEZ-FERRER, S. Neuronal regulation of bone marrow stem cell niches. *F1000Research*, v. 9, 2020. DOI: [10.12688/f1000research.22554.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.22554.1)
- GERY, S; KOEFFLER, H. P. Circadian rhythms and cancer. *Cell cycle*, v. 9, n. 6, p. 1097-1103, 2010. DOI: [10.4161/cc.9.6.11046](https://doi.org/10.4161/cc.9.6.11046)

GOLAN, K.; KOLLET, O.; LAPIDOT, T. Dynamic cross talk between S1P and CXCL12 regulates hematopoietic stem cells migration, development and bone remodeling. *Pharmaceuticals*, v. 6, n. 9, p. 1145-1169, 2013. DOI: [10.3390/ph6091145](https://doi.org/10.3390/ph6091145)

GOLAN, K.; KUMARI, A., KOLLET, O; *et al.* Daily onset of light and darkness differentially controls hematopoietic stem cell differentiation and maintenance. *Cell Stem Cell*, v. 23, n. 4, p. 572-585. e7, 2018. DOI: [10.1016/j.stem.2018.08.002](https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.08.002)

GOLAN, K; KOLLET, O.; MARKUS, R. P.; Lapidot, T. Daily light and darkness onset and circadian rhythms metabolically synchronize hematopoietic stem cell differentiation and maintenance: The role of bone marrow norepinephrine, tumor necrosis factor, and melatonin cycles. *Experimental Hematology*, v. 78, p. 1-10, 2019. DOI: [10.1016/j.exphem.2019.08.008](https://doi.org/10.1016/j.exphem.2019.08.008)

GOLAN, K.; LAPIDOT, T. Daily light-and-darkness onset regulates mouse hematopoietic stem cells. *Blood Advances*, v. 3, n. 4, p. 704, 2019. DOI: [10.1182/bloodadvances.2018027722](https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018027722)

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. DOI: [10.1634/stemcells.2006-0644](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0644)

INLAY, M. A.; BHATTACHARYA, D.; SAHOO, D.; *et al.* Ly6d marks the earliest stage of B-cell specification and identifies the branchpoint between B-cell and T-cell development. *Genes & development*, v. 23, n. 20, p. 2376-2381, 2009.

JAHN, T.; LEIFHEIT, E.; GOOCH, S.; *et al.* Lipid rafts are required for KIT survival and proliferation signals. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 110, n. 6, p. 1739-1747, 2007. DOI: [10.1182/blood-2006-05-020925](https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-020925)

JOHNSON, G. R.; MOORE, M. A. S. Role of stem cell migration in initiation of mouse fetal liver haemopoiesis. *Nature*, v. 258, n. 5537, p. 726-728, 1975. DOI: [10.1038/258726a0](https://doi.org/10.1038/258726a0)

JUNG, W.; LEVESQUE, J.; RUITENBERG, M. J. It takes nerve to fight back: the significance of neural innervation of the bone marrow and spleen for immune function. *In: Seminars in Cell & Developmental Biology*. Academic Press, v.61, p. 60-70, 2017. DOI: [10.1016/j.semcdb.2016.08.010](https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.08.010)

KAMPHUIS, W.; CAILOTTO, C.; DIJK, F.; *et al.* Circadian expression of clock genes and clock-controlled genes in the rat retina. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 330, n. 1, p. 18-26, 2005. DOI: [10.1016/j.bbrc.2005.02.118](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.118)

KIEL, M. J.; YILMAZ, Ö. H.; IWASHITA, T.; *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell*, v. 121, n. 7, p. 1109-1121, 2005. doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.026

KINGSLEY, P. D.; MALIK, J.; FANTAUZZO, K. A.; *et al.* Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. *Blood*, v. 104, n. 1, p. 19-25, 2004. DOI: [10.1182/blood-2003-12-4162](https://doi.org/10.1182/blood-2003-12-4162)

LUDIN, A.; GUR-COHEN, S., Golan, K., *et al.* Reactive oxygen species regulate hematopoietic stem cell self-renewal, migration and development, as well as their bone marrow

microenvironment. *Antioxidants & redox signaling*, v. 21, n. 11, p. 1605-1619, 2014. DOI: [10.1089/ars.2014.5941](https://doi.org/10.1089/ars.2014.5941)

MAESTRONI, G.J.M. Adrenergic Modulation of Hematopoiesis. *J Neuroimmune Pharmacol*, v. 15, 82–92, 2020. DOI: [10.1007/s11481-019-09840-7](https://doi.org/10.1007/s11481-019-09840-7)

MÉNDEZ-FERRER, S.; CHOW, A.; MERAD, M.; et al. Circadian rhythms influence hematopoietic stem cells. *Current opinion in hematology*, v. 16, n. 4, p. 235, 2009. DOI: [10.1097/MOH.0b013e32832bd0f5](https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32832bd0f5)

MÉNDEZ-FERRER, S.; LUCAS, D., BATTISTA, M.; et al. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature*, v. 452, n. 7186, p. 442-447, 2008. DOI: [10.1038/nature06685](https://doi.org/10.1038/nature06685)

MARKUS, R. P.; FERREIRA, Z. S.; FERNANDES, P. A.; et al. The immune-pineal axis: a shuttle between endocrine and paracrine melatonin sources. *Neuroimmunomodulation*, v. 14, n. 3-4, p. 126-133, 2007.

MARKUS, R. P., FERNANDES, P. A., KINKER, G. S.; et al. Immune-pineal axis—acute inflammatory responses coordinate melatonin synthesis by pinealocytes and phagocytes. *British journal of pharmacology*, v. 175, n. 16, p. 3239-3250, 2018.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, v. 505, n. 7483, p. 327-334, 2014. DOI: [10.1038/nature12984](https://doi.org/10.1038/nature12984)

MORRISON, S. J.; WEISSMAN, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*, v. 1, n. 8, p. 661-673, 1994. DOI: [10.1016/1074-7613\(94\)90037-X](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90037-X)

MUXEL, S. M.; PIRES-LAPA; M. A.; MONTEIRO, A. W. A., et al. NF- κ B drives the synthesis of melatonin in RAW 264.7 macrophages by inducing the transcription of the arylalkylamine-N-acetyltransferase (AA-NAT) gene. *PLoS One*, v. 7, n. 12, p. e52010, 2012. DOI: [10.1371/journal.pone.0052010](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052010)

NAKAMURA-ISHIZU, A.; TAKIZAWA, H.; SUDA, T. The analysis, roles and regulation of quiescence in hematopoietic stem cells. *Development*, v. 141, n. 24, p. 4656-4666, 2014. DOI: [10.1242/dev.106575](https://doi.org/10.1242/dev.106575)

OH, S. A.; LEE, G. S.; PARK, J. H.; Kim, H. W.; et al. Osteoclastic cell behaviors affected by the α -tricalcium phosphate based bone cements. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, p. 3019-3027, 2010. DOI: [10.1007/s10856-010-4152-z](https://doi.org/10.1007/s10856-010-4152-z)

O'NEILL, John S.; REDDY, Akhilesh B. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature*, v. 469, n. 7331, p. 498-503, 2011. DOI: [10.1038/nature09702](https://doi.org/10.1038/nature09702)

OHTA, H.; MITCHELL, A. C.; MCMAHON, D. G. Constant light disrupts the developing mouse biological clock. *Pediatric research*, v. 60, n. 3, p. 304-308, 2006. DOI: [0.1203/01.pdr.0000233114.18403.66](https://doi.org/0.1203/01.pdr.0000233114.18403.66)

- PALIS, J. Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Frontiers in physiology*, v. 5, p. 3, 2014. DOI: [10.3389/fphys.2014.00003](https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00003)
- PINHO, S.; FRENETTE, P. S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 20, n. 5, p. 303-320, 2019.
- PROVENCIO, I.; ROLLAG, M. D.; CASTRUCCI, A. M. Photoreceptive net in the mammalian retina. *Nature*, v. 415, n. 6871, p. 493-493, 2002. DOI: [10.1038/415493a](https://doi.org/10.1038/415493a)
- RATAJCZAK, M. Z. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Current opinion in hematology*, v. 15, n. 4, p. 293-300, 2008. DOI: [10.1097/MOH.0b013e328302c7ca](https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e328302c7ca).
- RATAJCZAK, M. Z.; ADAMIAK, M. Membrane lipid rafts, master regulators of hematopoietic stem cell retention in bone marrow and their trafficking. *Leukemia*, v. 29, n. 7, p. 1452-1457, 2015. DOI: [10.1038/leu.2015.66](https://doi.org/10.1038/leu.2015.66).
- REEVES, V. L.; THOMAS, C. M.; SMART, E. J. Lipid rafts, caveolae and GPI-linked proteins. *Caveolins and Caveolae: Roles in Signaling and Disease Mechanisms*, p. 3-13, 2012. DOI: [10.1007/978-1-4614-1222-9_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1222-9_1)
- RIEGER, M. A.; SCHROEDER, T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 4, n. 12, p. a008250, 2012. DOI: [10.1101/cshperspect.a008250](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008250).
- SANFORD, A.B.A.; DA CUNHA, L.S.; MACHADO, C.B.; *et al.* Circadian Rhythm Dysregulation and Leukemia Development: The Role of Clock Genes as Promising Biomarkers. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(15):8212. Doi: [10.3390/ijms2315821](https://doi.org/10.3390/ijms2315821)
- SETHUMADHAVAN, A.; MANI, M. KIT activates interleukin-4 receptor and effector signal transducer and activator of transcription 6 independent of its cognate ligand in mouse mast cells. *Immunology*, v. 159, n. 4, p. 441-449, 2020. DOI: [10.1111/imm.13174](https://doi.org/10.1111/imm.13174)
- SCHEIERMANN, C.; KUNISAKI, Y; FRENETTE, P. Circadian control of the immune system. *Nat Rev Immunol* 13, 190–198, 2013. DOI: [10.1038/nri3386](https://doi.org/10.1038/nri3386)
- SCHNEIDER, C.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.
- SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells*, v. 4, n. 1-2, p. 7-25, 1978. PMID: [747780](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/747780/)
- SHIN, J.; HU, W.; NARAMURA, M.; *et al.* High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *Journal of Experimental Medicine*, v. 211, n. 2, p. 217-231, 2014. DOI: [10.1084/jem.20131128](https://doi.org/10.1084/jem.20131128)
- SPANGRUDE, G. J.; AIHARA, Y. U. K. O. H.; WEISSMAN, I. L.; *et al.* The stem cell antigens sca-1 and sca-2 subdivide thymic and peripheral T lymphocytes into unique subsets. *Journal of immunology* v. 141, n. 11, p. 3697-3707, 1988. DOI: [10.4049/jimmunol.141.11.3697](https://doi.org/10.4049/jimmunol.141.11.3697)

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, v. 241, n. 4861, p. 58-62, 1988. DOI: [10.1126/science.2898810](https://doi.org/10.1126/science.2898810)

SZADE, K.; GULATI, G. S.; CHAN, C. K.; *et al.* Where hematopoietic stem cells live: the bone marrow niche. *Antioxidants and redox signaling*, v. 29, n. 2, p. 191-204, 2018.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. Repair processes in irradiated mouse hematopoietic tissue. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 114, n. 1, 1964. DOI: [10.1111/j.1749-6632.1964.tb53566.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1964.tb53566.x)

VALENTE, M.; NASCIMENTO, D. S.; CUMANO, A.; *et al.* Sca-1+ cardiac progenitor cells and heart-making: a critical synopsis. *Stem cells and development*, v. 23, n. 19, p. 2263-2273, 2014. DOI: [10.1089/scd.2014.0197](https://doi.org/10.1089/scd.2014.0197)

VAN DE RIJN, M., HEIMFELD, S., SPANGRUDE, G. J., *et al.* Mouse hematopoietic stem-cell antigen Sca-1 is a member of the Ly-6 antigen family. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 86, n. 12, p. 4634-4638, 1989. DOI: [10.1073/pnas.86.12.4634](https://doi.org/10.1073/pnas.86.12.4634)

WAGERS, A. J.; WEISSMAN, I. L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v. 116, n. 5, p. 639-648, 2004. DOI: [10.1016/S0092-8674\(04\)00208-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00208-9)

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 157-168, 2000. DOI: [10.1016/s0092-8674\(00\)81692-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81692-x)

WEISSMAN, Irving L.; SHIZURU, Judith A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 112, n. 9, p. 3543-3553, 2008. DOI: [10.1182/blood-2008-08-078220](https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-078220)

WEKSBERG, D.; CHAMBERS, S. M., BOLES, N. C., *et al.* CD150⁻ side population cells represent a functionally distinct population of long-term hematopoietic stem cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, v. 111, n. 4, p. 2444-2451, 2008. DOI: [10.1182/blood-2007-09-115006](https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-115006)