UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA

FÁBIO ALESSANDRO DE FREITAS

Efeito do secretoma das células-tronco mesenquimais na expressão de genes de resistência a múltiplas drogas das linhagens hematológicas K562 e K562-Lucena

> São Paulo 2022

FÁBIO ALESSANDRO DE FREITAS

Efeito do secretoma das células-tronco mesenquimais na expressão de genes de resistência a múltiplas drogas das linhagens hematológicas K562 e K562-Lucena

Versão Corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11, de 13/10/2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios do crescimento celular, hemodinâmicos e da hemostasia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski

Co-Orientadora: Dra. Débora Levy

São Paulo 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Freitas, Fábio Alessandro de

Efeito do secretoma das células-tronco mesenquimais na expressão de genes de resistência a múltiplas drogas das linhagens hematológicas K562 e K562-Lucena / Fábio Alessandro de Freitas. -- São Paulo, 2022.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Ciências Médicas. Área de Concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Sérgio Paulo Bydlowski.

Coorientadora: Débora Levy

Descritores: 1.Células-tronco mesenquimais 2.Leucemia 3.Secretoma 4.Genes MDR 5.Células K562 6.Imunomodulação 7.Morte celular 8.Transportadores de cassetes de ligação de ATP 9.Ciclo celular 10.Medula óssea.

USP/FM/DBD-292/2022

Nome: Fábio Alessandro de Freitas

Título: Efeito do secretoma das células-tronco mesenquimais na expressão de genes de resistência a múltiplas drogas das linhagens hematológicas K562 e K562 Lucena

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 07 / 10 / 2022

Banca Examinadora

- Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro Araldi
- Instituição: UNIFESP
- Julgamento: Aprovado
- Prof. Dr. Walcy Paganelli Rosolia Teodoro
- Instituição: FM-USP
- Julgamento: Aprovado
- Prof. Dr. Luis Alberto de Padua Covas Lage
- Instituição: Externo
- Julgamento: Aprovado

Presidente da banca

- Prof. Dr. Sergio Paulo Bydlowski
- Instituição: FM-USP
- Julgamento: Aprovado

Aos meus pais, Sr. Moacir de Freitas (*in memoriam*) e Sra. Eliana Aparecida Picinato de Freitas, à minha irmã Dra. Flávia Alessandra de Freitas, ao meu cunhado Eng. Arthur Urbano Genofre, ao meu irmão Eng. Daniel Felipe de Freitas, à minha cunhada Eng. Gabriela Alves Magalhães, à minha amada namorada Gisele Marques Bizon e à minha querida enteada Laura Bizon Benetti, dedico a realização deste sonho e a elaboração desta tese. Sem o apoio e o incentivo de todos, este feito não teria sido possível.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski, agradeço por ter me recebido em seu laboratório, proposto este desafio, confiado em meu trabalho, por todos os ensinamentos técnicos e de vida e pelos bons momentos de convívio e descontração.

À minha co-orientadora e amiga, Dra. Débora Levy, agradeço por sua amizade, por trilhar ao meu lado todos os desafios encontrados na realização deste trabalho, por seus ensinamentos e "puxões de orelha" nos momentos necessários, pois estes me fizeram aprender e crescer muito no meio científico e pessoal. Além dos momentos de descontração regados a um bom café ou chá.

À minha família, tanto aos Freitas quanto aos Picinato, deixo meus sinceros agradecimentos pelo apoio e incentivo nesta jornada. Em especial, agradeço àqueles que infelizmente não estão aqui hoje para que eu possa abraçá-los, mas que *in memoriam* sempre estarão presentes, como minha querida tia Dora, meu tio Fernando, minha tia Solange, meus queridos tio Lilo e tia Lina, meu tio Carlinhos, meu tio Carlão, minha prima Mirian, e meus queridos avós.

À família de minha namorada, os Marques e os Bizon, agradeço por seu apoio e motivação, em especial ao Sr. Pedro Valdomiro Bizon (*in memoriam*) e à Sra. Maria Elizabeth Marques Pereira Bizon.

Ao Dr. Pedro Nogueira Giglio, ao Prof. Dr. Marco Kawamura Demange, ao Dr. Luís Alberto de Pádua Covas Lage, à Profa. Dra. Juliana Pereira, à Jessica Liliane Paz e à Priscila de Lima Barros, agradeço pela colaboração na obtenção das células-tronco mesenquimais utilizadas na realização deste trabalho.

A minha querida amiga Linah Akemi Fukuya, agradeço por sua amizade, pelos ensinamentos, pelo carinho, pelas orquídeas, pelas boas conversas, pelos momentos de descontração e pelos chás da tarde.

Às minhas amigas Beatriz Araújo Oliveira e Jessica Liliane Paz, agradeço por terem me recebido e ajudado no processo de familiarização com a rotina do laboratório, além das conversas descontraídas e troca de experiências. Aos meus amigos e amigas do Grupo de Lípides, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Imunologia do Incor HC-FMUSP, Cadiele Oliana Reichert, Priscila de Lima Barros, Juliana Sampaio Silva e Leonardo Rokita de Rosa, agradeço por toda a ajuda que me dispensaram, pelos ensinamentos compartilhados e pelo excelente ambiente de cooperação e amizade que desenvolvemos.

À minha amiga, especialista em citometria de fluxo, Sandra Maria Monteiro, agradeço por toda a ajuda na realização dos experimentos de ciclo celular e pelo agradável e divertido convívio.

À minha amiga Nair Yukie Maeda (Naná), agradeço pelo carinho, pela atenção, pelos ensinamentos e por toda a ajuda na realização dos experimentos de *array* de citocinas.

À minha amiga Simone Regina dos Santos, agradeço por toda a ajuda na Sala de Cultura Celular, por sua amizade e pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas Giovana De Giacomo e Daniela Flosi, agradeço pela agradável convivência e pelos momentos de descontração.

Às minhas amigas da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Dra. Ana Clelia Xavier Roussenq Baracho e Dra. Teresa Cristina Alves da Silva Gonzales de Carvalho, que de colegas de turma da disciplina de Docência Universitária, se tornaram amigas para a vida, agradeço por todo o carinho, apoio e por essa bela amizade que construímos.

À minha banca de qualificação, composta pela Profa. Dra. Juliana Pereira, Dr. Wagner Quintilio e Dr. Rodrigo Pinheiro Araldi, agradeço pelas ideias apresentadas e discutidas durante meu exame de qualificação, pois foram muito proveitosas e contribuíram de forma positiva na finalização desta tese.

Não posso deixar de agradecer àqueles que contribuíram em minha jornada pela área científica, nisso, agradeço: à Profa. Dra. Enny Fernandes Silva, por ter me incentivado desde a graduação a trilhar os caminhos da pesquisa e desenvolvimento; À Profa. Dra. Hiro Goto e ao Prof. Dr. José Ângelo Lauleta Lindoso, por terem me acolhido no Instituto de Medicina Tropical de São Paulo em minha Iniciação Científica e pelo incentivo em seguir na carreira dedicada à pesquisa; Ao Dr. Wagner Quintilio, por sua

paciência, seus ensinamentos, sua dedicação, sua amizade e principalmente por ter lutado ao meu lado durante todo o período de realização de meu mestrado. Se estou recebendo o título de Doutor hoje, é graças à participação de cada um de vocês na ascensão de cada degrau que me trouxe até aqui.

À todos do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular e Laboratório de Imunologia Clínica e alergia: Prof. Dr. Jorge Kalil, Profa. Dra. Luiza Guglielmi, Prof. Dr. Edécio Cunha Neto, Profa. Dra. Verônica Porto Carreiro Vasconcellos Coelho, Profa. Dra. Keity Souza Santos, Carlos Sérgio Viggiani, Cesar Manuel Remuzgo Ruiz, Samar Freschi de Barros, Selma Aliotti Palácios, Helcio Rodrigues, Filipe Margues, Claudia Borba Rosales Savioli, Ricardo Zaniratto da Costa Fernandes, Washington Robert da Silva, Andreia Cristina Kazue Kuramoto Takara, Greyce Luri Sasahara, Rafael Ribeiro Almeida, João Paulo Nunes, Karina Rodrigues Blanez, Raquel Elaine Alencar, Maria Lucia Aparecida Carnevale Marin, Jair Muro Martins, Laila Lima, Renata Pereira de Souza, Suellen Estrada, Fernanda Rosa Alegria, Marici Rached, Lilian Nascimento, Raimunda Maria de Oliveira (in memoriam), Elaine Lopes da Silva, Luiz Roberto M. Mundel, Janaína Baptista Alves, Gerlândia Neres Pontes, Fernanda Castro J. Vilalva, Amanda Rodrigues Fernandes de Camargo, Ivete Ramos, Fernando Ramon Zilinski, Celia Junko Yamaguti, Laylson Cardoso Silva, Ludmila Vieira Sambiase, Lidiane Bispo Cardoso, Michelle Campos de Matos, Sonia Romero da Silva, Viviane Castro de Araújo, André Kenji Honda, Ana Lochabel Soares Moretti e Vivian Leite de Oliveira. Não posso deixar de lado os alunos como Raquel Vieira, Jhosiene Yukari Magawa, Ariane Cesario Lima, Anne Karoline Rocha Medrado Ventura, Safiri de Paiva Alves, Jamille Ramos de Oliveira, Karla Deysiree Alcântara Silva, Giuliana Xavier de Medeiros, Celso Magnun Oliveira, Amanda Melato e Tamires Lopes Silva de Oliviera. Agradeço pela participação nesta jornada que foi meu Doutorado.

À minha amiga Olga Emy Morita, agradeço pelas orquídeas, pelas frutas do sítio de sua mãe e por seu carinho e amizade.

À Marcelo Gomes Barrocal, agradeço por sua amizade e momentos de descontração.

À Prof. Dra. Myrthes Anna Maragna Toledo Barros, agradeço por ter me aceitado como seu aluno no programa PAE da FM-USP e por ter me proporcionado um aprendizado diferenciado em minha formação. À Dra. Hisako Gondo Higashi e ao Prof. Dr. Isaías Raw, agradeço pelos exemplos de vida e por sua dedicação à saúde pública nacional e internacional. Devo a eles muito de meu conhecimento.

Aos meus amigos Fabio Luiz Carneiro Gonçalves e Henrique Luiz da Costa Koriat, agradeço por todo o apoio e incentivo.

Aos meus queridos amigos João Garcia Mazia, Aparecida de Moraes Mazia, Magda Aparecida de Moraes Mazia Bento e Bruno Moraes Mazia Bento, agradeço pelo apoio e incentivo.

Ao meu amigo Fernando Binda Bezerra, agradeço por seu apoio, por sua amizade e por seu incentivo.

Aos meus amigos e amigas da Drogaria Eduardo II, Carlos Eduardo da Silva Gonçalves (*in memoriam*), Clarice Aparecida Senna Gonçalves, Edna das Graças Senna, Guilherme Morais Gonçalves, Gizeli Cabrera Rizo, Helio da Cunha Vigiani Júnior, Vânia Valentin Durães Batista, Danilo Pereira Batista, Valério Andrade Pinto Júnior e Withiney Espíndola Santos, agradeço por toda a ajuda, apoio, incentivo e principalmente, pela amizade que construímos como se fôssemos uma grande família.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), agradeço pela ajuda financeira que permitiu esta conquista.

A todos que me ajudaram direta ou indiretamente, mas que por ventura seus nomes não foram citados, deixo meus sinceros agradecimentos.

À minha amiga Alline Rafaela Medeiros Souza, agradeço pelo apoio, pelo incentivo e pela motivação na execução deste trabalho.

Às secretárias do programa de Ciências Médicas, Angélica Belem de Souza e Rose Cler Ferreira, agradeço por toda ajuda na parte administrativa do meu Doutorado.

Não posso deixar de agradecer a todos os doadores, cujas células foram utilizadas na realização deste trabalho. Mesmo que eu não os conheça, sem sua participação a realização deste trabalho não teria sido possível. Portanto, deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos eles.

O SÁBIO SAMURAI

Perto de Tóquio, vivia um grande samurai, já idoso, que agora se dedicava a ensinar zen aos jovens. Apesar de sua idade, corria a lenda de que ainda era capaz de derrotar qualquer adversário.

Certa tarde, um guerreiro, conhecido por sua total falta de escrúpulos, apareceu por ali. Era famoso por utilizar a técnica da provocação. Esperava que seu adversário fizesse o primeiro movimento e, dotado de uma inteligência privilegiada para observar os erros cometidos, contra-atacava com velocidade fulminante. O jovem e impaciente guerreiro jamais havia perdido uma luta. Conhecendo a reputação do samurai, estava ali para derrotá-lo e aumentar sua fama.

Todos os estudantes se manifestaram contra a ideia, mas o velho e sábio samurai aceitou o desafio. Foram todos para a praça da cidade. Lá, o jovem começou a insultar o velho mestre. Chutou algumas pedras em sua direção, cuspiu em seu rosto, gritou todos os insultos que conhecia, ofendendo, inclusive, seus ancestrais. Durante horas fez tudo para provocá-lo, mas o velho sábio permaneceu impassível. No final da tarde, sentindo-se exausto e humilhado, o impetuoso guerreiro desistiu e retirou-se.

Desapontados pelo fato de o mestre ter aceitado tantos insultos e tantas provocações, os alunos perguntaram: — Como o senhor pôde suportar tanta indignidade? Por que não usou sua espada, mesmo sabendo que poderia perder a luta, ao invés de se mostrar covarde e medroso diante de todos nós?

Se alguém chega até você com um presente, e você não o aceita, a quem pertence o presente? — perguntou o Samurai.

A quem tentou entregá-lo — respondeu um dos discípulos.

O mesmo vale para a inveja, a raiva e os insultos — disse o mestre. — Quando não são aceitos, continuam pertencendo a quem os carrega consigo. A sua paz interior, depende exclusivamente de você. As pessoas não podem lhe tirar a serenidade, só se você permitir!

Autor desconhecido

Os sábios são os que mais buscam a sabedoria. Os tolos, pensam tê-la encontrado.

Napoleão Bonaparte

RESUMO

Freitas FA. Efeito do secretoma das células-tronco mesenquimais na expressão de genes de resistência a múltiplas drogas das linhagens hematológicas K562 e K562-Lucena [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

Uma das funções das células-tronco mesenguimais da medula óssea é a manutenção do nicho hematopoiético, exercendo ação cooperativa com as células-tronco hematopoiéticas na manutenção da homeostase sanguínea. No entanto, nos casos de leucemias, suspeita-se que ocorram alterações funcionais nas células-tronco mesenquimais da medula óssea, que passam a assumir um papel permissivo ao desenvolvimento, manutenção e até mesmo nas recidivas das leucemias. Estudamos a interação entre as células leucêmicas K562 (sensível a quimioterápicos) e K562-Lucena (resistente a quimioterápicos) em coculturas com as células-tronco mesenquimais de medula óssea, provenientes de pacientes acometidos pela leucemia mieloide aguda (CTM-LMA) e de doadores saudáveis (CTM-HMO), sendo avaliados parâmetros relativos à proliferação, viabilidade, morte celular, produção de citocinas, expressão de proteínas ABC, alterações na expressão de ciclinas e no ciclo celular. Observamos que o secretoma das CTM-HMO foi capaz de promover a diminuição da proliferação das células leucêmicas (K562 e K562-Lucena), associada à diminuição da viabilidade dessas células com aumento dos índices de apoptose, necrose e ativação de caspases 3/7, bem como promover alterações na produção de citocinas e expressão de proteínas ABC, além de alterações na expressão de ciclinas D1 e D2 e no ciclo celular. No entanto, o secretoma das CTM-LMA não foi capaz de promover os mesmos resultados, demonstrando que essas células perdem a capacidade de combater as leucemias, tornando-se permissivas a sua progressão. O secretoma das CTM-HMO, portanto, pode ser explorado como um adjuvante no tratamento das leucemias, uma vez que exerce ação nas células leucêmicas sensíveis e resistentes ao tratamento convencional.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Leucemia. Secretoma. Genes MDR. Células K562. Imunomodulação. Morte celular. Transportadores de cassetes de ligação de ATP. Ciclo celular. Medula óssea.

ABSTRACT

Freitas FA. Effect of mesenchymal stem cell secretome on the expression of multidrug resistance genes of hematologic cell lineages K562 and K562-Lucena [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2022.

One function of bone marrow mesenchymal stem cells is the maintenance of the hematopoietic niche, exerting a cooperative action with the hematopoietic stem cells in the maintenance of blood homeostasis. However, in leukemia course, it is suspected that there are functional alterations in the bone marrow mesenchymal stem cells, which start to assume a permissive role in the development, maintenance and even relapse of leukemias. We studied the interaction between K562 (chemotherapeutic-sensitive) and K562-Lucena (chemotherapeutic-resistant) leukemic cells in cocultures with bone marrow mesenchymal stem cells derived from patients affected by acute myeloid leukemia (MSC-AML) and from healthy donors (MSC-HBM), being evaluated parameters related to proliferation, viability, cell death, production of cytokines, expression of ABC proteins, alterations in the expression of cyclins and in the cell cycle. We observed that the MSC-HBM secretome was able to promotes a decrease in the proliferation of leukemic cells (K562 and K562-Lucena), associated with a decrease in the viability of these cells with increases in the rates of apoptosis, necrosis and activation of caspases 3/7, as well as promote alterations in the production of cytokines and expression of ABC proteins, in addition to alterations in the expression of cyclins D1 and D2 and in the cell cycle. However, the secretome of MSC-AML was not able to promote the same results, demonstrating that these cells lose the ability of combat leukemias, making their progression permissive. The secretome of MSC-HBM, therefore, can be explored as an adjuvant in the treatment of leukemias, since it exerts action on leukemic cells that are sensitive and resistant to conventional treatment.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Leukemia. Secretome. Genes, MDR. K562 cells. Immunomodulation. Cell death. ATP-binding cassette transporters. Cell cycle. Bone marrow.

LISTA DE FIGURAS

_	Assunto	Pág.
Figura 01	llustração de um insert e do esquema de uma cocultura	53
Figura 02	Fotomicrografia de células-tronco mesenquimais	63
Figura 03	Fotomicrografias de células K562 e Lucena	66
Figura 04	Representação gráfica da razão entre o número de células leucêmicas (K562 ou Lucena) cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO e o número de células leucêmicas de seus respectivos controles	67
Figura 05	Representação gráfica da viabilidade das células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO.	68
Figura 06	Representação gráfica da porcentagem de morte celular por apoptose nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO	70
Figura 07	Representação gráfica da porcentagem de ativação das caspases 3/7 nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO	71
Figura 08	Representação gráfica da porcentagem de morte celular por necrose nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO	72
Figura 09	<i>Array</i> da expressão gênica das proteínas ABC de células Lucena cocultivadas com CTM-HMO, tendo como referência (valor zero) células Lucena cocultivadas com CTM-LMA	75
Figura 10	Expressão dos genes da ciclina D1 (<i>CCND1</i>) e ciclina D2 (<i>CCND2</i>) nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO	77
Figura 11	Representação gráfica das porcentagens das fases do ciclo celular das células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO	79

LISTA DE TABELAS

	Assunto	Pág.
Tabela 01	Classificação OMS (2016) para leucemia mieloide aguda	26
Tabela 02	Classificação FAB para leucemia mieloide aguda	27
Tabela 03	Perfil de STR das linhagens leucêmicas K562 e Lucena	65
Tabela 04	Dosagem semiquantitativa de citocinas no sobrenadante das coculturas de células K562 e Lucena com CTM-LMA e CTM-HMO	74

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Símbolo/Sigla	Significado
ATV	Associação de tripsina e versene
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CCL	Ligante C-C de quimiocinas
CCND1	Ciclina D1
CCND2	Ciclina D2
CD	Cluster de diferenciação
cDNA	DNA complementar
CO ₂	Dióxido de carbono
CTM	Célula-tronco mesenquimal
СТМ-НМО	Célula-tronco mesenquimal oriunda de indivíduo saudável
CTM-LMA	Célula-tronco mesenquimal oriunda de paciente portador de leucemia mieloide aguda
CXCL	Ligante C-X-C de quimiocinas
CXCR	Receptor C-X-C de quimiocinas
DEPC	Dietil-pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAse	Enzima desoxiribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
FAB	Franco-Americano-Britânico
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
GUSB	Gene da beta-glucuronidase
HCS	High content screening system
HLA	Antígeno leucicitário humano
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IDH1	Gene da isocitrato desidrogenase 1
IDH2	Gene da isocitrato desidrogenase 2
IL	Interleucina
INF	Interferon
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon gama

Símbolo/Sigla Significado

IPS	Célula-tronco pluripotente induzida
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LLA	Leucemia linfoide aguda
LLC	Leucemia linfoide crônica
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos-1
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MIF	Fator inibidor da migração de macrófagos
MIP	Proteína inflamatória dos macrófagos
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAI	Inibidor do ativador do plasminogênio
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
P-gp	Glicoproteína P
Ph	Cromossomo Philadelphia
рН	Potencial hidrogeniônico
PI	lodeto de propídeo
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Enzima ribonuclease
RT-PCR	PCR em tempo real
RUNX	Fator de transcrição relacionado à runt
SDF	Fator derivado de células estromais
SFB	Soro fetal bovino
STR	Short-tandem repeat
TNF	Fator de necrose tumoral
TREM	Receptor desencadeador expresso nas células mieloides
UK	Reino Unido
WCRF	Word Cancer Research Fund

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Leucemias	21
1.1.1. Leucemia mieloide aguda	24
1.1.2. Leucemia mieloide crônica	28
1.2. Resistência a múltiplas drogas	30
1.3. Linhagens hematológicas K562 e K562-Lucena 1	32
1.4. Células-tronco	33
1.5. Células-tronco mesenquimais	35
1.6. Células-tronco mesenquimais e leucemias	38
2. OBJETIVOS	41
2.1. Objetivo geral	42
2.2. Objetivos específicos	42
	A*2
3. JUSTIFICATIVA	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43 45
4. MATERIAIS E MÉTODOS	43 45 46
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenguimais de medula óssea de pacientes 	43 45 46
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA). 	43 45 46 46
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA)	43 45 46 46
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA)	43 45 46 46
 JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA) 4.1.2. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de indivíduos saudáveis (CTM-HMO)	43 45 46 46 46 47
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA) 4.1.2. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de indivíduos saudáveis (CTM-HMO) 4.1.3. Linhagem K562 4.1.4. Linhagem Lucena 	43 45 46 46 46 47 47
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA)	 43 45 46 46 47 47 47 47 47 47 47
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA)	 43 45 46 46 47 47 47 47 47 47
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS	 43 45 46 46 47 47 47 47 48
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA)	 43 45 46 46 47 47 47 47 48 48
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA)	 43 45 46 46 47 47 47 47 48 48 49
 3. JUSTIFICATIVA 4. MATERIAIS E MÉTODOS 4.1. Células 4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA)	 43 45 46 46 47 47 47 47 48 48 49 49 49

4.4. Padronização e validação das análises realizadas na	
plataforma de High Content Screening (HCS)	50
4.5. Cocultura de células-tronco mesenquimais e células K562 ou	
Lucena	51
4.6. Contagem total de células e viabilidade	53
4.7. Análise de morte celular (apoptose e necrose)	54
4.8. Atividade de caspases 3/7	54
4.9. <i>Array</i> de citocinas	55
4.10. Análise da expressão gênica de proteínas ABC e ciclinas D1	
e D2	56
4.10.1. Extração de RNA total pelo método de fenol-clorofórmio	
utilizando TRI Reagent®	56
4.10.2. Tratamento com DNAse	57
4.10.3. Síntese do cDNA	57
4.10.4. Expressão gênica de proteínas ABC (array de proteínas	
ABC)	58
4.10.5. Expressão gênica de ciclina D1 e ciclina D2	59
4.11. Ciclo celular	60
4.12. Análise estatística	60
5. RESULTADOS	62
5.1. Caracterização das células	63
5.1.1. Células-tronco mesenquimais	63
5.1.2. Células K562 e Lucena	64
5.2. Análise da contagem total de células K562 e Lucena controle	
e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO	66
5.3. Viabilidade das células K562 e Lucena controle e cocultivadas	
com CTM-LMA e CTM-HMO	68
5.4. Análise de morte celular nas células K562 e Lucena controle e	
cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO	69
5.4.1. Apoptose	69
5.4.2. Ativação de caspases 3/7	71

Pág.

5.4.3 Necrose	Pá
5.5 Dosagem semiguantitativa de citocinas nas coculturas de	· · -
células K562 e Lucena com CTM-LMA e CTM-HMO	, 73
5.6 Apálico do expressão gânico do protoínos ABC CCND1 d	. 75
CONDA	; 75
	. 75
5.6.1. Expressão genica de proteínas ABC	. 75
5.6.2. Expressao genica de <i>CCND1</i> e <i>CCND2</i>	. 76
5.7. Análise do ciclo celular em células K562 e Lucena controle e	•
cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO	. 78
. CONCLUSÕES	. 98
3. TRABALHOS PUBLICADOS	. 100
). REFERÊNCIAS	. 102
0. REFERÊNCIAS	. 102 . 125
9. REFERÊNCIAS 10. ANEXOS Anexo 01. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	. 102 . 125 . 126
9. REFERÊNCIAS 10. ANEXOS Anexo 01. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Anexo 02. Perfil de STR da amostra de células K562 adaptadas ac	. 102 . 125 . 126
 REFERÊNCIAS ANEXOS Anexo 01. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Anexo 02. Perfil de STR da amostra de células K562 adaptadas ac cultivo em meio DMEM <i>Low glucose</i> 	. 102 . 125 . 126 . 129
 REFERÊNCIAS ANEXOS Anexo 01. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Anexo 02. Perfil de STR da amostra de células K562 adaptadas ac cultivo em meio DMEM <i>Low glucose</i> Anexo 03. Perfil de STR da amostra de células K562-Lucena 1 	. 102 . 125 . 126 . 129

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Leucemia é o nome comum dado a um grupo de doenças malignas que acometem o sangue e a medula óssea (Juliusson; Hough, 2016), sendo caracterizada pela proliferação de células hematopoiéticas anormais (Seth; Singh, 2015). Essa doença acomete, anualmente, milhares de pessoas de todas as idades, sendo responsável por um elevado número de mortes (Bispo; Pinheiro; Kobetz, 2020), em particular, nos casos em que as células leucêmicas desenvolvem resistência a múltiplas drogas durante o tratamento (Du; Chen, 2017). Por outro lado, as células-tronco mesenquimais são células multipotentes com propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias, estando presentes na medula óssea e respondendo pela manutenção do nicho hematopoiético (Reichert *et al.*, 2021). O secretoma das células-tronco mesenquimais pode ser responsável pelo combate às células leucêmicas (Delgado, 2018), ou por tornar o nicho hematopoiético permissivo ao seu desenvolvimento (Pleyer; Valent; Greil, 2016).

1.1. Leucemias

No início do século XIX, relatos de cientistas de vários países estabeleceram a possibilidade de que a leucocitose sustentada poderia ocorrer na ausência de infecção (Kampem, 2012; Freireich; Wiernik; Steensma, 2014). Nessa época, os médicos descobriram que seus pacientes apresentavam grandes quantidades de células brancas (leucócitos) circulantes, portanto, descreveram a doença como "sangue branco" (Steady Health, 2020). Rudolph Virchow utilizou o termo leucemia (do grego, leukos, "branco" e haima "sangue") em 1847 para descrever tais condições (Piller, 2001; Freireich; Wiernik; Steensma, 2014; Steady Health, 2020).

É conhecido que a produção das células sanguíneas ocorre a partir das células-tronco hematopoiéticas, localizadas na medula óssea, e essa é regulada de acordo com as necessidades do organismo. No entanto, se esse mecanismo normal de controle da proliferação celular for quebrado, pode ocorrer uma proliferação excessiva de certos tipos celulares. Leucemias, linfomas, mielomas e a síndrome mielodisplasica são alguns tipos de câncer que podem afetar a medula óssea, as

células sanguíneas, os linfonodos e outras partes do sistema linfático (Pokharel, 2012; Brasil, 2015; LLS, 2018).

O câncer, de um modo geral, é a principal causa de mortes em países desenvolvidos e a segunda maior causa em países em desenvolvimento. Os casos de câncer nos países desenvolvidos têm se elevado devido ao aumento da idade média da população e a adoção de hábitos de vida não saudáveis (tabagismo, vida sedentária e maus hábitos alimentares), que aumentam a probabilidade de desenvolvimento da doença (Jemal *et al.*, 2011).

Segundo o World Cancer Research Fund International - American Institute for Cancer Research (WCRF International) e o Cancer Research UK, em 2018 foram estimados entre 17 e 18 milhões de novos casos de câncer ao redor do mundo (WCRF International, 2020; Cancer Research UK, 2020), sendo aproximadamente 9,5 milhões de novos casos em homens e 8,5 milhões de novos casos em mulheres (WCRF International, 2020). Nesse mesmo ano, foram estimados 9,6 milhões de óbitos relacionados aos diversos tipos de câncer (Cancer Research UK, 2020).

Num aspecto geral, o câncer de mama é o mais prevalente, seguido pelo câncer de pulmão, câncer colorretal/intestino e câncer de próstata, estando as leucemias na décima terceira posição (*WCRF International*, 2022). Porém, quando levamos em consideração os sexos, o câncer de pulmão é o tipo de câncer mais prevalente nos homens, seguido pelo câncer de próstata, tendo as leucemias na décima posição. Já para as mulheres, o câncer de mama é o mais prevalente, seguido pelo câncer colorretal/intestino, tendo as leucemias na décima segunda posição (*WCRF International*, 2022).

Para o ano de 2020, a Organização Mundial da Saúde estima que houve 475.519 novos casos de leucemia no mundo, correspondendo a aproximadamente 2,5 % de todos os novos casos de câncer no geral (WHO, 2020). Foram estimados, também, mais de 311 mil óbitos relacionados à leucemia nesse mesmo ano (WHO, 2020; Sung, *et al.* 2021), demonstrando que a alta mortalidade ligada a esse tipo de câncer reflete um prognóstico ruim, principalmente em populações com nível socioeconômico mais baixo (Brasil, 2015). Apesar de elevados, os dados de incidência e mortalidade das leucemias são subestimados, devido a falhas no diagnóstico da doença em algumas regiões, principalmente em indivíduos idosos e em infantes (Brasil, 2015).

Quando avaliamos os dados relativos ao Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou para o biênio 2018-2019, 10.800 novos casos de leucemia, sendo 5.940 novos casos em homens e 4.860 novos casos em mulheres (Brasil, 2017).

A estimativa de novos casos de leucemia para o triênio 2020-2022 é muito semelhante aos dados do biênio 2018-2019, esperando-se 5,67 novos casos a cada 100 mil homens (5.920 novos casos) e 4,56 novos casos para cada 100 mil mulheres (4.890 novos casos) (Brasil, 2017; Brasil, 2019).

Considerando os aspectos clínicos e patológicos, as leucemias podem ser classificadas de duas formas:

- 1) De acordo com o tempo de sua progressão, sendo divididas em:
 - a) forma aguda: caracterizada pelo aumento rápido de célula imaturas na corrente sanguínea, fazendo com que a medula óssea perca a capacidade de produzir células sanguíneas normais;
 - b) forma crônica: nesse caso, temos aumento excessivo de células maduras anormais, que pode levar meses, ou até mesmo anos para progredir.
- 2) De acordo com o tipo celular afetado, podendo ser do tipo:
 - a) Mieloide: quando acomete os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, célula dendríticas ou mastócitos;
 - b) Linfoide: quando acomete os linfócitos ou células NK (Pokharel, 2012; Brasil, 2015; Brasil, 2017. CDC, 2018).

Portanto, seguindo essa classificação, temos a leucemia mieloide aguda (LMA), a leucemia mieloide crônica (LMC), a leucemia linfoide aguda (LLA) e a leucemia linfoide crônica (LLC). Esses quatro subtipos principais de leucemia podem ser distinguidos com base na diferenciação morfológica das células envolvidas, em seu estágio de maturação e em sua linhagem. Porém, esses subtipos podem ainda ser subdivididos, com base em suas alterações genéticas, em grupos de baixo, intermediário ou alto risco (Kampem, 2012).

As leucemias surgem a partir de lesões genéticas nas células hematopoiéticas progenitoras. A linhagem das células progenitoras acometidas determinará o tipo de leucemia (linfoide ou mieloide). No entanto, as células portadoras dessas mutações são conhecidas como células iniciadoras de leucemia e, não necessariamente, compreendem as células-tronco hematopoiéticas. Às vezes, uma única mutação genética não é suficiente para o desenvolvimento da leucemia. Como exemplo, para o desenvolvimento da leucemia mieloide aguda é necessário o envolvimento de uma série de eventos genéticos (Fiegl, 2016).

O diagnóstico e o tratamento das leucemias vêm evoluindo muito nas últimas décadas. Os estudos genômicos são responsáveis por esse avanço, principalmente nos casos de leucemias mieloide agudas, pois a classificação desse tipo de leucemia é baseada no conhecimento de anormalidades genéticas. Entre as anormalidades genéticas estudadas temos a fusão *BCR-ABL* (Pokharel, 2012; Brasil, 2015) no cromossomo Philadelphia, que codifica uma proteína que aumenta a atividade da tirosina quinase, levando a estimulação da divisão celular (Pokharel, 2012), implicando diretamente no seu prognóstico e tratamento (Brasil, 2015).

Os avanços na genômica e o desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas permitem o reconhecimento de novas entidades morfológicas e proporcionam uma melhor compreensão das leucemias. Além disso, o conhecimento das vias das transformações moleculares são caminhos promissores para novas terapias (Brasil, 2015).

Abordaremos com mais detalhes, a seguir, as leucemias mieloide aguda e crônica, objetos de nossos estudos.

1.1.1. Leucemia mieloide aguda

A leucemia mieloide aguda é uma doença heterogênea, caracterizada pela expansão clonal de progenitores mieloides (blastos) na medula óssea e no sangue periférico, originadas de lesões genéticas. Esse tipo de leucemia acomete principalmente pessoas idosas do sexo masculino (Fiegl, 2016), provocando uma

insuficiência hematopoiética nos indivíduos acometidos, trazendo riscos às suas vidas como sangramentos e infecções (Sylvester; Longaker, 2004).

Aproximadamente 1,3 % dos novos casos de câncer registrados nos Estados Unidos da América (EUA) são relacionados à leucemia mieloide aguda (Fiegl, 2016).

A Leucemia mieloide aguda foi o primeiro tipo de câncer cujo genoma completo foi sequenciado, sendo esse sequenciamento realizado na Universidade de Washington (EUA), em 2009 (Mardis *et al.*, 2009). Após esse fato e a análise genômica de muitos indivíduos portadores de leucemia mieloide aguda, foram registradas mais de 40 mutações associadas a essa doença. Algumas dessas mutações, como a *FLT3* ou *IDH1/IDH2*, podem ser úteis no estudo de terapias com alvos moleculares (Ferrara, 2012).

Translocações cromossômicas bem caracterizadas, como t(8:21) ou t(15:17) dão origem a proteínas quiméricas (RUNX1-RUNX1T1 e PML-RARA, respectivamente), responsáveis pela alteração da maturação normal das células precursoras mieloides. No entanto, além dos rearranjos cromossômicos, alterações moleculares também têm sido implicadas no desenvolvimento da leucemia mieloide aguda. Em regra, mais de 97 % dos casos estão ligados a mutações somáticas, não sendo essas mutações ligadas a grandes anormalidades cromossômicas (Patel *et al.*, 2012).

A correta classificação da leucemia mieloide aguda é muito importante para a determinação do melhor tratamento a ser seguido. Dentre as classificações para esse tipo de leucemia duas se destacam, sendo elas:

- 1) Classificação FAB (Franco-Americano-Britânico);
- 2) Classificação segundo a OMS (Organização Mundial da Saúde).

A classificação da OMS (2016) (tabela 01) é mais abrangente, levando em consideração outros fatores além dos considerados pela classificação FAB. Já a classificação FAB (M0 a M7) (tabela 02) se baseia apenas no tipo celular afetado e no seu estágio de maturação dessas células (*American Cancer Society*, 2018).

Tabela 01. Classificação OMS (2016) para leucemia mieloide aguda

Leucemia mieloide aguda com certas anormalidades genéticas (alterações genéticas ou cromossômicas)

- LMA com uma translocação entre os cromossomos 8 e 21 [t(8;21)]
- LMA com uma translocação ou inversão no cromossomo 16 [t(16;16) ou inv(16)]
- LPA com o gene de fusão PML-RARA
- LMA com uma translocação entre os cromossomos 9 e 11 [t(9;11)]
- LMA com uma translocação entre os cromossomos 6 e 9 [t(6:9)]
- LMA com uma translocação ou inversão no cromossomo 3 [t(3;3) ou inv(3)]
- LMA com uma translocação entre os cromossomos 1 e 22 [t(1:22)]
- LMA com o gene de fusão BCR-ABL1
- LMA com gene NPM1 mutado
- LMA com mutações bialélicas do gene CEBPA
- LMA com gene *RUNX1* mutado

Leucemia mieloide aguda com alterações relacionadas à mielodisplasia

Leucemia mieloide aguda relacionada a quimioterapia ou radioterapia prévia

Leucemia mieloide aguda não especificadas

- Leucemia mieloide aguda com diferenciação mínima (FAB M0)
- Leucemia mieloide aguda sem maturação (FAB M1)
- Leucemia mieloide aguda com maturação (FAB M2)
- Leucemia mielomonocítica aguda (FAB M4)
- Leucemia monocítica aguda (FAB M5)
- Leucemia eritroide pura (FAB M6)
- Leucemia megacarioblástica aguda (FAB M7)
- Leucemia basofílica aguda
- Panimielose aguda com fibrose

Sarcoma mieloide ou sarcoma granulocítico ou cloroma

Proliferações mieloides relacionadas com a síndrome de Down

Leucemias agudas indiferenciadas e bifenotípica

LMA - Leucemia mieloide aguda; LPA - Leucemia promielocítica aguda; Fonte: *American Cancer Society*, 2018.

Classificação FAB	Subtipo
M0	Leucemia mieloblástica aguda minimamente indiferenciada
M1	Leucemia mieloblástica aguda com maturação mínima
M2	Leucemia mieloblástica aguda com maturação
M3	Leucemia promielocítica aguda
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M4 eos	Leucemia mielomonocítica aguda com eosinofilia
M5	Leucemia monocítica aguda
M6	Leucemia eritroide aguda
M7	Leucemia megacariocítica aguda

Tabela 02. Classificação FAB para leucemia mieloide aguda

FAB: Franco-Americano-Britânico. Fonte: American Cancer Society, 2018.

O tratamento de alguns tipos de leucemia teve grande evolução desde a década de 1960, porém, o tratamento da leucemia mieloide aguda não apresentou a mesma evolução, apresentando modestas melhorias a partir da década de 1970. Como exemplo, podemos citar o uso da infusão intravenosa contínua de citarabina por 7 dias, associada com 3 doses diárias de daunorrubicina, preconizada em 1973. Mais de 40 anos depois, esse mesmo regime de indução, com pequenas modificações, continua a ser o tratamento padrão para indivíduos que não receberam tratamento prévio para a esse tipo de leucemia (Freireich; Wiernik; Steensma, 2014).

Novos medicamentos foram propostos para o tratamento da leucemia mieloide aguda, como a substituição da daunorubicina pela idarubicina, que em alguns estudos resultou em maior taxa de remissão completa, duração da resposta ou sobrevida em indivíduos com menos de 60 anos. No entanto, poucos medicamentos novos surgiram: Idarubicina (aprovada pelo *Food and Drug Administration* (FDA), EUA, em 1990), gemtuzumab ozogamicina (aprovado pelo FDA em 2000 e retirado do mercado em 2010) e decitabina (aprovada pela *European Medicines Agency* (EMEA) em 2013). Apesar do modesto avanço no desenvolvimento de novos medicamentos, estudos randomizados sugerem que a duplicação da dose padrão de daunorubicina melhora significantemente a taxa de remissão completa e a sobrevida dos pacientes (Freireich;

Wiernik; Steensma, 2014), mostrando que mesmo os medicamentos mais antigos podem ter uma melhor eficiência em novos esquemas terapêuticos.

1.1.2. Leucemia mieloide crônica

A leucemia mieloide crônica é caracterizada por uma desordem mieloproliferativa, decorrente de uma mutação nas células-tronco hematopoiéticas (Bollmann; Giglio, 2011; Narang *et al.*, 2016). Essa célula-tronco anormal inicia então a produção exacerbada de células de linhagem mieloide, primariamente na medula óssea, mas também em locais extramedulares, como por exemplo no baço ou no fígado (Emadi; Law, 2018).

O cromossomo Philadelphia (Ph) está presente em 90 % a 95 % dos casos de leucemia mieloide crônica. Embora esse cromossomo tenha sido relatado em pacientes com leucemia mieloide crônica em 1960, somente em 1973 Rowley reconheceu essa pequena estrutura subnuclear como uma translocação recíproca e equilibrada entre os cromossomos 9 e 22 (Rowley, 1973). Porém, apenas em 1985 essa translocação foi reconhecida como causadora de fusão oncogênica da tirosina quinase de Abelson no braço longo do cromossomo 9 e a região do ponto de ruptura no braço longo do cromossomo 22 gerando o gene *BCR-ABL*, responsável pela produção da oncoproteína bcr-abl (Heisterkamp *et al.*, 1985; Jabbour; Kantarjian, 2016).

A oncoproteína bcr-abl apresenta atividade não controlada da tirosina quinase, desregulando a proliferação celular. Além de diminuir a adesão das células leucêmicas ao estroma da medula óssea e proteger as células leucêmicas da apoptose (Emadi; Law, 2018).

A avaliação qualitativa e quantitativa do gene *BCR-ABL*, por hibridização fluorescente *in situ* ou reação em cadeia da polimerase, é agora essencial para o diagnóstico e para o monitoramento da resposta ao tratamento da leucemia mieloide crônica (Freireich; Wiernik; Steensma, 2014; Jabbour; Kantarjian, 2016).

Esse tipo de leucemia apresenta uma incidência entre 1 a 2 casos para cada 100.000 adultos, sendo responsável por aproximadamente 15 % dos casos de leucemias diagnosticados em adultos (Jabbour; Kantarjian, 2016). A idade média dos

indivíduos no momento do diagnóstico é de 60 a 65 anos na Europa, porém, essa faixa etária pode ser menor em países onde a população é mais jovem (Hochhaus *et al.*, 2017).

A leucemia mieloide crônica é dividida em três fases, sendo elas:

- a) fase crônica;
- b) fase acelerada;
- c) fase blástica (Furtado et al., 2015), também conhecida como crise blástica.

O desenvolvimento de inibidores da tirosina quinase voltados para o *BCR-ABL* revolucionaram o tratamento da leucemia mieloide crônica (Freireich; Wiernik; Steensma, 2014; Jabbour; Kantarjian, 2016), prolongando a sobrevida desses pacientes. O primeiro inibidor da tirosina quinase foi o imatinib, anteriormente conhecido como CGP57148B e STI-571, desenvolvido na década de 1990 por Druker, na Ciba-Geigy, atual Novartis (Freireich; Wiernik; Steensma, 2014). O tratamento com imatinib resulta em uma taxa de sobrevida de 10 anos superior a 80 % (Freireich; Wiernik; Steensma, 2014; Jabbour; Kantarjian, 2016) e pode induzir remissões moleculares importantes (Freireich; Wiernik; Steensma, 2014). Inibidores da tirosina quinase mais modernos como o dasatinibe e o nilotinibe, são mais eficazes do que o imatinib na prevenção da progressão da fase crônica para a fase acelerada e crise blástica. Já o ponatinibe, é ativo contra uma rara mutação do *BCR-ABL* no ponto T315I, que confere resistência a outros inibidores de tirosina quinase (Freireich; Wiernik; Steensma, 2014; Jabbour; Kantarjian, 2016).

Entretanto, o fenótipo *BCR-ABL* gera células geneticamente instáveis. Essas células são propensas a desenvolver anormalidades genômicas múltiplas e heterogêneas, responsáveis pela transformação do fenótipo leucêmico, levando a progressão da leucemia mieloide crônica em fase crônica para a fase acelerada e crise blástica (Hochhaus *et al.*, 2017; Hehlmann *et al.*, 2020).

A crise blástica é caracterizada pela presença ≥ 20 % de blastos circulantes ou na medula óssea, ou ainda pela presença de infiltrados de blastos extramedulares. Como sinais clínicos, os indivíduos acometidos pela leucemia mieloide crônica em crise blástica podem apresentar suor noturno, perda de peso, febre, dor nos ossos, sangramentos e infecções recorrentes (Hehlmann, 2012), falência de múltiplos órgãos e uma sobrevida estimada entre 3 a 6 meses sem tratamento (Bollmann; Giglio, 2011). Quanto a linhagem celular afetada, a crise blástica é heterogênea, pois esses blastos podem expressar fenótipo mieloide, linfoide, monocítico, megacariocítico e ainda, mesmo que raramente, eritroide. A correta identificação da linhagem celular afetada auxilia no tratamento (Narang, 2016).

Com os atuais tratamentos disponíveis, as crises blásticas são raras (Janjetovic *at al.*, 2019). Os pacientes diagnosticados com crise blástica necessitam de um tratamento mais intensivo que o uso dos inibidores das tirosinas quinases tradicionais, como o uso do ponatinibe, quimioterapia agressiva e transplante de medula óssea (Hehlmann *et al.*, 2020). No entanto, quando a crise blástica é instaurada, há um mau prognóstico, com uma expectativa de sobrevida de apenas 12 meses (Janjetovic *at al.*, 2019), principalmente nos casos em que há o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas durante o tratamento (Rumjanek; Vidal; Maia, 2013).

1.2. Resistência a múltiplas drogas

A resistência a múltiplas drogas (MDR do termo em Inglês *Multdrug resistance*) é um fenômeno onde a célula, por mecanismos diversos, desenvolve resistência a fármacos estruturalmente não relacionados (Wu; Calcagno; Ambudkar, 2008; Anreddy *et al.*, 2014;). Entre esses mecanismos se encontram:

- a) Melhoramento no processo de reparo ao DNA (Wu; Calcagno; Ambudkar, 2008);
- b) Inibição da apoptose;
- c) Alterações no metabolismo de fármacos;
- d) Efluxo ativo dos fármacos através das proteínas transportadoras ABC (Wu; Calcagno; Ambudkar, 2008; Anreddy *et al.*, 2014);
- e) Alterações no ciclo celular;
- f) Indução de genes de resposta emergencial;
- g) Alteração lipídicas na membrana celular;
- h) Compartimentação;
- i) Diminuição do influxo de fármacos (Anreddy et al., 2014).

Entre esses mecanismos de resistência a múltiplas drogas, o mais bem caracterizado é o que envolve as proteínas transportadoras ABC (Wang *et al.*, 2014).

As proteínas transportadoras ABC fazem parte de uma família de proteínas bem conservadas, expressas em todos os organismos e com papel importante em muitos processos biológicos (Adamska; Falasca, 2018), estando associadas ao transporte (intra e extracelular) de substratos como açúcares, aminoácidos, íons, peptídeos, proteínas, colesterol e metabólitos e toxinas (EI-Awady *et al.*, 2017).

Em humanos, as proteínas transportadoras ABC são codificadas por 48 genes e um pseudogene. Dessa forma, essas proteínas são agrupadas em 7 subfamílias (A-G) baseadas em sua sequência gênica e similaridade estrutural (Adamska; Falasca, 2018). Essas subfamílias são ainda subdivididas: ABCA (13 membros), ABCB (11 membros), ABCC (11 membros), ABCD (4 membros), ABCE (1 membro), ABCF (3 membros) e ABCG (5 membros) (El-Awady *et al.*, 2017).

Essas proteínas transportadoras possuem funções fisiológicas no organismo, exercendo papel protetor contra uma variedade se substâncias tóxicas endógenas e exógenas. Essa ação se dá pelo transporte ativo dessas substâncias através da membrana celular, fazendo com que a célula não acumule concentrações tóxicas em seu interior. Como exemplo dessa função fisiológica a ABCB1 está associada ao transporte de moléculas hidrofóbicas neutras e catiônicas, a ABCC1 está associada ao transporte de xenobióticos aniônicos orgânicos conjugados com glutationa, ácido glucurônico ou sulfato e a ABCG2 está associada ao transporte de nucleosídeos e nucleotídeos fosforilados (Spitzwieser *et al.*, 2016).

Muitos fatores podem levar ao fenótipo MDR, porém, a superexpressão da glicoproteína P (P-gp) é um dos mecanismos mais estudados (Rumjanek *et al.*, 2001; Carrett-Dias *et al.*, 2016). O gene *MDR1* (*ABCB1*) codifica a P-gp que é uma glicoproteína com peso molecular de aproximadamente 170 kDa, sendo um membro da família das ATPase, expresso na membrana celular (Carrett-Dias *et al.*, 2016). Essa glicoproteína atua como mecanismo de efluxo, dependente de energia, bombeando os agentes quimioterápicos para fora da célula (Rumjanek *et al.*, 2001; Carrett-Dias *et al.*, 2016), fazendo, dessa forma, com que concentrações tóxicas não sejam atingidas em seu interior (Rumjanek *et al.*, 2001). No entanto, uma variedade

de células humanas não neoplásicas expressam diferentes níveis dessa glicoproteína, desempenhando papeis fisiológicos nessas células (Carrett-Dias *et al.*, 2016).

O fenótipo de resistência a múltiplas drogas pode envolver a superexpressão de diferentes genes, no entanto, os mais comuns são o *ABCB1*, *ABCC1* e *ABCG2*, identificados em células tumorais (Marques *et al.*, 2010; Tomiyasu *et al.*, 2013; Carrett-Dias *et al.*, 2016; Spitzwieser *et al.*, 2016; Wu; Fu, 2018). Dessa forma, a linhagem celular K562, uma das mais utilizadas em estudos envolvendo leucemias, e sua linhagem parental K562-Lucena, que expressa o fenótipo MDR (Rumjanek; Vidal; Maia, 2013), foram utilizadas na realização desta tese.

1.3. Linhagens hematológicas K562 e K562-Lucena 1

A linhagem celular K562 é derivada de células eritroleucêmicas, obtidas de uma mulher de 53 anos de idade diagnosticada com leucemia mieloide crônica em 1970 (Lozzio; Lozzio 1975; Lozzio; Lozzio, 1979; Carrett-Dias *et al.*, 2016). Após a realização de uma esplenectomia, a paciente apresentou crise blástica. As células tumorais se acumularam, formando massas tumorais de células indiferenciadas em vários tecidos e produziram uma efusão pleural. A linhagem K562 foi isolada a partir do material coletado dessa efusão pleural (Lozzio; Lozzio, 1975) e é positiva para o cromossomo Philadelphia (Ph) (Lozzio; Lozzio, 1975; Lozzio; Lozzio, 1979; Carrett-Dias *et al.*, 2016). As células da linhagem K562 se apresentam como mieloblastos e essa é uma das linhagens celulares mais utilizadas e estudadas nas pesquisas envolvendo leucemias (Carrett-Dias *et al.*, 2016).

A linhagem K562 apresenta como principais características:

- a) Proliferação imediata quando cultivadas em suspensão;
- b) Apresentam forma de blastos indiferenciados;
- c) Presença do cromossomo Philadelphia;
- d) Não produzem imunoglobulinas;
- e) Não apresentam contaminação por micoplasmas, vírus Epstein-Barr ou partículas do vírus Herpes-like;
- f) Não apresentam atividade de fosfatase alcalina e mieloperoxidase;

- g) Não fagocitam partículas inertes estranhas;
- h) Em cultura, apresentam uma fonte constante de antígenos associados à leucemia (polipeptídios de superfície e antígenos compartilhados com outros tipos de leucemias humanas) (Lozzio; Lozzio, 1975; Lozzio; Lozzio, 1979).

A linhagem K562-Lucena 1 foi desenvolvida com o intuito de se ter uma linhagem de células eritroleucêmicas com fenótipo de resistência a múltiplas drogas. Portanto, essa linhagem foi desenvolvida *in vitro*, utilizando a linhagem K562, selecionada para resistência ao quimioterápico vincristina. Essa seleção se deu com o cultivo das células K562 utilizando concentrações crescentes de vincristina, variando de 3 nM a 60 nM desse fármaco. Dessa forma, foi desenvolvido um modelo experimental comparativo de células resistente a múltiplas drogas. O nome dado a essa linhagem celular resistente a múltiplas drogas foi K562-Lucena 1 (Rumjanek *et al.*, 2001), chamada desse ponto em diante apenas de Lucena para evitar confusões com o nome de sua célula parental (K562).

1.4. Células-tronco

Alexander Maximow (1874-1928) postulou sobre a teoria de hematopoese e o conceito de células-tronco hematopoiéticas, enquanto Alexander J. Friedenstein (1924-1998) foi o responsável pela descoberta das células-tronco mesenquimais na medula óssea. Atualmente, os conceitos científicos de Maximow e Friedenstein são a base para o transplante de células-tronco hematopoiéticas, para a terapia celular e suas implicações (Afanasyev; Elstner; Zander, 2009), sendo as células-tronco de medula óssea um dos tipos de células-tronco mais estudado (Pereira, 2008).

As células-tronco podem ser definidas como sendo uma população celular indiferenciada que apresenta as seguintes características:

- a) Capacidade de auto renovação, ou seja, podem dar origem a outras células-tronco idênticas;
- b) Capacidade de se diferenciar em linhagens celulares distintas;

 c) Capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (Schwindt; Barnabe; Mello, 2005; Pereira, 2008; ISSCR, 2020; NIH, 2020).

A esses critérios, podemos incluir a capacidade dessas células saírem de seu estado quiescente para um estado proliferativo, ou ainda, que sua diferenciação pode ser revertida ao menos até certo estágio (Charbord, 2010).

Portanto, é possível dizer que as células-tronco são a base para a formação de todos os órgãos e tecidos do corpo. Isso, somado ao fato de que existem diferentes tipos de células-tronco, encontradas em diferentes tecidos e órgãos, ou em momentos diferentes da vida (ISSCR, 2018).

Considerando sua potencialidade, as células-tronco podem ser divididas em três tipos principais:

- Totipotentes: células capazes de gerar todos os tecidos embrionários e extraembrionários, como o zigoto e o blastômero;
- Pluripotentes: células capazes de gerar todas as células que formam um embrião com exceção da placenta e cordão umbilical, por exemplo, as células-tronco embrionárias;
- Multipotentes: células que originam apenas um subgrupo de linhagens celulares, por exemplo, células-tronco mesenquimais e neurais (Alison *et al.*, 2002; Schwindt; Barnabe; Mello, 2005; Takahashi; Yamanaka, 2006; Maria Ruiz; Levy; Bydlowski, 2014).

De uma forma resumida e didática, podemos classificar as células-tronco em dois tipos:

- Células-tronco embrionárias: células pluripotentes, derivadas da massa celular interna do blastocisto, que se diferenciarão em todas as linhagens e tipos celulares, formando o embrião;
- 2) Células-tronco adultas: essas células também são conhecidas como células-tronco tecido-específicas e células-tronco somáticas, sendo células mais especializadas que as células-tronco embrionárias. Devido a seu maior grau de diferenciação em relação às células-tronco embrionárias,

tipicamente essas células podem dar origem a diferentes tipos celulares ligados ao tecido de sua origem. Essas células, quando isoladas e em cultura, apresentam uma taxa de autorrenovação tão elevada quanto às células-tronco embrionárias (Sylvester; Longaker, 2004; Schwindt; Barnabe; Mello, 2005; Bajada *et al.*, 2008; ISSCR, 2018; ISSCR, 2020; NIH, 2022).

Além das células-tronco descritas acima, há um tipo de células-tronco produzida em laboratório, chamada de células-tronco pluripotentes induzidas (IPS do termo em inglês *Induced pluripotent stem cells*). Essas células são originadas convertendo-se células adultas em células semelhantes às células-tronco embrionárias, sendo ferramentas valiosas para o estudo do desenvolvimento normal, o início de certas doenças e sua progressão, sendo úteis também nos testes de novas drogas e terapias; (ISSCR, 2018; ISSCR, 2020).

1.5. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais são semelhantes às células-tronco adultas, com capacidade de auto renovação e diferenciação, sendo amplamente distribuídas no organismo (Williams; Hare, 2011).

Embora uma das fontes de células-tronco mesenquimais mais conhecida e estudada seja a medula óssea, essas células também podem ser encontradas em diferentes órgãos e tecidos como tendões (Bajada *et al.*, 2008; Ohishi; Schipani, 2009), ligamento periodontal (Bajada *et al.*, 2008), membrana sinovial, músculo esquelético (Bajada *et al.*, 2008; Ohishi; Schipani, 2009; Lv *et al.*, 2014), tecido adiposo (Bajada *et al.*, 2008; Ohishi; Schipani, 2009; Lv *et al.*, 2014), tecido adiposo (Bajada *et al.*, 2008; Ohishi; Schipani, 2009; Lv *et al.*, 2014; Maria Ruiz; Levy; Bydlowski, 2014), polpa dental, endométrio, sangue do cordão umbilical (Ohishi; Schipani, 2009; Lv *et al.*, 2008; Maria Ruiz; Levy; Bydlowski, 2014), Geleia de Wharton, (Lee, 2008; Maria Ruiz; Levy; Bydlowski, 2014), cordão umbilical, placenta (Lee, 2008; Lv *et al.*, 2014), líquido amniótico (Lee, 2008; Ohishi; Schipani, 2009; Maria Ruiz; Levy; Bydlowski, 2014), membrana amniótica (Lee, 2008; Ohishi; Schipani, 2009) e no sangue periférico (em quantidades ínfimas e apresentando marcadores de superfície distintos) (Bajada *et al.*, 2008; Lv *et al.*, 2014, Maria Ruiz; Levy; Bydlowski,
2014). De um modo geral, podemos dizer que as células-tronco mesenquimais podem ser encontradas em qualquer tecido vascularizado do organismo (Lv *et al.*, 2014).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular propôs critérios mínimos para a definição das células-tronco mesenquimais, que compreendem:

- a) Adesão ao plástico em condições padronizadas de cultura;
- b) Expressão dos marcadores de superfície CD73, CD90 e CD105, com ausência dos marcadores CD34, CD45, HLA-DR, CD14 ou CD11b, CD79a ou CD19;
- c) Capacidade de diferenciação, *in vitro*, em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Sylvester; Longaker, 2004; Lee, 2008; Ohishi; Schipani, 2009; Williams; Hare, 2011; Lv *et al.*, 2014; Maria Ruiz; Levy; Bydlowski, 2014).

Além dos critérios mínimos apresentados anteriormente, outros pesquisadores, como Lv e colaboradores (2014), sugerem em seu trabalho que outros marcadores de superfície como o CD13, CD29, CD44 e CD10 também podem ser expressos pelas células-tronco mesenquimais (Lv *et al.*, 2014).

Um dos principais papéis das células-tronco mesenquimais é sua participação na regulação dos nichos (unidades estruturais e funcionais que regulam a divisão das células-tronco e sua diferenciação), regulando a proliferação e diferenciação das células-tronco (Zhang *et al.*, 2003). Por exemplo, as células-tronco mesenquimais são as principais células que compõem o microambiente necessário para o desenvolvimento e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas na medula óssea, no chamado nicho hematopoiético (Williams; Hare, 2011).

Avaliando o contexto geral, as células-tronco mesenquimais da medula óssea são um tipo de células-tronco adulta, que dão suporte ao processo de hematopoese e possuem ação imunossupressora (Charbord, 2010).

As células-tronco mesenquimais apresentam propriedade imunomodulatória única tanto *in vivo* quanto *in vitro*, escapando do reconhecimento pelo sistema imunológico e inibindo ativamente a resposta imunológica. Portanto, podemos dizer que as células-tronco mesenquimais são imunoprivilegiadas, sendo capazes de sobreviver e se diferenciar em transplantes imunocompatível-incompatível alogênico ou xenogênico, sendo esse mecanismo de imunotolerância alvo de estudados (Atoui; Chiu, 2012; Song, Scholtemeijer; Shah, 2020), como por exemplo no transplante de células-tronco mesenquimais no tratamento de injúria traumática cerebral, melhorando o déficit neurológico pela modulação da inflamação e liberação de fatores neurotróficos (Alvararo-Velez *et al.*, 2021), ou no estudo do uso das células-tronco mesenquimais como agentes imunomoduladores na indução de tolerância nos transplantes de órgãos sólidos (Podestà; Remuzzi; Casiraghi, 2021). Alguns desses mecanismos de evasão da resposta imunológica podem ser atribuídos a hipoimunogenicidade das células-tronco mesenquimais, modulação do fenótipo das células T e imunossupressão do meio local (Atoui; Chiu, 2012; Song; Scholtemeijer; Shah, 2020).

As células-tronco mesenquimais expressam níveis moderados de Antígeno Leucocitário Humano classe I (HLA) e não expressam HLA classe II e moléculas coestimulatórias B7 e CD40 ligante (Majumdar *et al.*, 2003). A tolerância do transplante de células-tronco mesenquimais alogênicas se dá por essas características, somadas a uma potente atividade imunossupressiva via contato célula-célula com células alvo do sistema imunológico e secreção de fatores solúveis como o óxido nítrico, indolamina 2,3-dioxigenase e heme oxigenase-1. Portanto, de uma forma geral, podemos dizer que as células-tronco mesenquimais produzem um efeito imunomodulatório pela interação com células do sistema imunológico inato e adaptativo (Williams; Hare, 2011).

Estudos *in vivo* demonstraram que as células-tronco mesenquimais podem ter um papel importante na imunomediação de doenças e na rejeição de transplante de tecidos. Por exemplo, a infusão de células-tronco mesenquimais, em casos de doença do enxerto contra o hospedeiro esteroides-resistente, no transplante de células-tronco hematopoiética, tem demonstrado bons resultados (Ohishi; Schipani, 2009; Williams; Hare, 2011). O mesmo vale para os casos de tratamento de doenças autoimunes (Ohishi; Schipani, 2009).

Considerando a perspectiva terapêutica, a facilidade de obtenção e preparação das células-tronco mesenquimais, além de seus privilégios imunológicos, essas

células são consideradas como uma terapia extremamente promissora na regeneração de tecidos (Sylvester; Longaker, 2004; Williams; Hare, 2011).

A administração sistêmica de células-tronco mesenquimais demonstra resultados promissores em humanos e animais. Como por exemplo, na redução dos níveis de glicose em camundongos diabéticos, facilitação no reparo de lesões hepáticas e cerebrais em animais, osteogênese imperfeita em humanos, tratamento de humanos com infarto do miocárdio e anemia aplástica, além do tratamento de indivíduos que receberam o transplante de medula óssea, onde as células-tronco mesenquimais atuam na reconstituição do nicho hematopoiético (Ohishi; Schipani, 2009). Somado a tudo isso, há ainda os estudos que avaliam a ação das células-tronco mesenquimais sobre as leucemias, quer seja na permissibilidade à sua instalação e desenvolvimento, quer seja no combate a essa doença.

1.6. Células-tronco mesenquimais e leucemias

As células-tronco mesenquimais têm demonstrado participação na patogênese de certas malignidades hematológicas como: leucemia linfoide aguda, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crônica, mieloma múltiplo, linfomas, e síndromes mielodisplásicas. A interação das células leucêmicas com o microambiente existente na medula óssea, nos nichos funcionais, tem demonstrado ser o mecanismo mais importante na manutenção dessa patologia (Diaz De La Guardia *et al.*, 2017).

Enquanto todas as células-tronco mesenquimais derivadas de indivíduos portadores de leucemia mieloide aguda se mostraram multipotentes em relação a sua capacidade de diferenciação (independentemente da idade do doador) as células originadas de indivíduos portadores de leucemia mieloide aguda de alto risco apresentam um baixo potencial de diferenciação osteogênica e adipogênica, quando comparadas às células-tronco mesenquimais derivadas de indivíduos saudáveis (Williams; Hare, 2011).

As células-tronco mesenquimais representam uma pequena fração do estroma medular em indivíduos saudáveis, porém, representam a fração dominante nos casos de leucemia linfoide crônica. Isso demonstra o papel crucial que as células-tronco

mesenquimais desempenham nos mecanismos de proteção das células leucêmicas e na progressão da doença (Trimarco *et al.*, 2015).

As células-tronco mesenquimais da medula óssea estão envolvidas na proliferação, migração, sobrevivência, resistência à quimioterapia e imunossupressão na progressão das leucemias e à evasão das células leucêmicas a ação do sistema imune (Zanetti *et al.*, 2020), podendo, ainda, bloquear a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelas células T, além de inibir sua proliferação pela liberação dose dependente de L-fitoemaglutinina (Zanetti *et al.*, 2020).

As células B leucêmicas possuem um tempo de vida prolongado quando se encontram no sangue periférico, órgãos linfoides secundários e medula óssea. No entanto, elas rapidamente entram em apoptose quando cultivadas *in vitro*, sugerindo que a sobrevivência das células B leucêmicas não está ligada apenas a defeitos intrínsecos ao mecanismo de apoptose celular, mas também à interação com outras células nos nichos de atividade da doença, quer seja por interação célula-célula, ou pela interação com mediadores químicos como quimiocinas e citocinas (Trimarco *et al.*, 2015).

As células-tronco mesenquimais podem contribuir para o desenvolvimento e progressão das leucemias devido a imunomodulação promovida pela liberação de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo a interleucina-8 (IL-8), causando imunossupressão (Hmadcha *et al.*, 2020), embora o mecanismo molecular que promove essa imunossupressão seja desconhecido (Nasef; Ashammakhi; Fouillard, 2008), ou ainda pelo contato célula-célula, ou transferência de mitocôndrias para as células do sistema imune como um meio de sinalização (Pers; Jorgensen; Khoury, 2021).

As células leucêmicas estabelecem conexões com as células-tronco mesenquimais, reprogramando seu transcriptoma, induzindo proliferação e diferenciação celular aberrante e comprometendo severamente sua capacidade imunomoduladora, facilitando assim a progressão da leucemia. Por outro lado, nos casos de remissão pós tratamento, as células-tronco mesenquimais voltam a apresentar as características originais recuperadas em níveis transcricionais e funcionais, incluindo seu secretoma (Borella *et al.*, 2021).

O estudo e a identificação dos fatores envolvidos na interação entre as células leucêmicas e as células-tronco mesenquimais da medula óssea, assim como o conhecimento de seu funcionamento, podem ser uma ferramenta muito útil para a eliminação das células leucêmicas sob a ação protetora do nicho medular (Vicente López *et al.*, 2014).

Os novos tratamentos visam normalizar o nicho hematopoiético para a vantagem competitiva das células hematopoiéticas normais sobre as células leucêmicas (Pereira, 2008). Pois, se o tratamento não conseguir restaurar as funções normais das células-tronco mesenquimais, os portadores de leucemia mieloide aguda têm grande risco de sofrer recidivas (Chandran *et al.*, 2015).

O entendimento do papel das células-tronco mesenquimais da medula óssea nas leucemias, particularmente na leucemia mieloide aguda, poderia contribuir com o desenvolvimento de novas terapias, reduzindo a ocorrência de doença residual mínima e recidivas nos pacientes (Diaz De La Guardia *et al.*, 2017).

O estudo do secretoma das células-tronco mesenquimais poderia, dessa forma, contribuir com o desenvolvimento de um adjuvante acelular para o tratamento das leucemias e possivelmente outros tipos de câncer.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência exercida pelo secretoma das células-tronco mesenquimais da medula óssea de indivíduos saudáveis e de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda sobre as linhagens hematológicas K562 (sensível à quimioterapia) e Lucena (resistente à quimioterapia), avaliando diversos parâmetros celulares.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar nas linhagens celulares K562 e Lucena cocultivadas por 48 horas com CTM-LMA e CTM-HMO os parâmetros abaixo:

- ✓ Proliferação e viabilidade;
- ✓ Apoptose, necrose, e ativação de caspases 3/7;
- ✓ Dosagem das citocinas produzidas pelas coculturas;
- ✓ Expressão das ciclinas D1 e D2;
- ✓ Alterações no ciclo celular;
- ✓ Análise da expressão de proteínas ABC nas células Lucena.

3. JUSTIFICATIVA

3. JUSTIFICATIVA

As leucemias acometem, mundialmente, milhares de indivíduos todos os anos, sendo responsável por um elevado número de óbitos.

As células-tronco mesenquimais podem estar envolvidas na proteção das células leucêmicas frente ao tratamento quimioterápico. Essa proteção pode se dar por alterações no ciclo celular das células leucêmicas ou pelo desenvolvimento de resistência dessas células frente aos fármacos utilizados no tratamento, resultando em manutenção de doença residual mínima ou em muitos casos de recidiva.

Portanto, o estudo da interação entre as células-tronco mesenquimais e as células leucêmicas é uma importante ferramenta na busca do entendimento dos mecanismos de defesa desenvolvidos pelas células leucêmicas, ou até mesmo na proposição de novos tratamentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi realizado nas instalações do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular (LIM-19) do Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Sua realização foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMUSP sob Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) número 24060619.0.0000.0068, parecer número: 3.728.644 (anexo 01).

4.1. Células

Todas as células utilizadas na realização desta tese foram devidamente caracterizadas. As células-tronco mesenquimais atendem aos critérios mínimos para caracterização desse tipo celular, tendo sido isoladas e caracterizadas na execução de outros projetos de pesquisa (Paz *et al.*, 2019). As células das linhagens K562 e Lucena foram caracterizadas de acordo com seu pertil de STR (do termo em Inglês short tandem repeat).

4.1.1. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda (CTM-LMA)

Foram utilizadas as células-tronco mesenquimais de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda, criopreservadas no biorrepositório do Grupo de Lípides, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular (LIM-19) do InCor, HC-FMUSP. Essas células foram obtidas de indivíduos acometidos pela leucemia mieloide aguda, por punção da crista ilíaca ou do esterno, após indicação médica para a realização de um mielograma e/ou imunofenotipagem.

4.1.2. Células-tronco mesenquimais de medula óssea de indivíduos saudáveis (CTM-HMO)

Foram utilizadas as células-tronco mesenquimais de indivíduos saudáveis, criopreservadas no biorrepositório do Grupo de Lípides, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular (LIM-19) do InCor, HC-FMUSP. Essas células foram obtidas de indivíduos saudáveis, por punção femoral ou tibial, em pacientes submetidos a cirurgia ortopédica.

4.1.3. Linhagem K562

Foi utilizada a linhagem celular de leucemia mieloide crônica K562 (ATCC CCL-243), sensível à vincristina, adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e criopreservada no biorrepositório do Grupo de Lípides, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular, InCor, HC-FMUSP.

4.1.4. Linhagem Lucena

Foi utilizada a linhagem celular de leucemia mieloide crônica K562-Lucena 1, resistente à vincristina, doada gentilmente pela Dra. Vivian Rumjanek da Universidade Federal do Rio de Janeiro e criopreservada no biorrepositório do Grupo de Lípides, Oxidação e Biologia Celular do Laboratório de Histocompatibilidade e Imunidade Celular, InCor, HC-FMUSP. Essa linhagem é identificada deste ponto em diante apenas pelo nome Lucena para se evitar equívocos com sua linhagem parental (K562).

4.2. Cultivo celular

4.2.1. Cultivo de células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais de medula óssea, criopreservadas, foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C e transferidas para tubo plástico de fundo cônico de 15 mL, contendo 10 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) *Low Glucose* (DMEM *Low*) (Sigma-Aldrich) suplementado com 20 % de soro fetal bovino (SFB) (Invitrocell, Brasil), 26,4 mM de bicarbonato de sódio (Merck) e antibióticos (100 UI/mL de penicilina (Sigma-Aldrich) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich)) (DMEM *Low* 20 % SFB). O tubo foi centrifugado a 250 X g por 7 minutos à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado e a massa celular ressuspendida em 15 mL de meio DMEM *Low* 20 % SFB, e cultivadas em garrafas de cultura celular de 75 cm² ou 182 cm² em incubadora a 37 °C, com atmosfera úmida e

5 % de CO₂ (Thermo Scientific, Forma II). As culturas foram acompanhadas diariamente, para observação e registro morfológico, sendo a substituição do meio de cultivo realizada a cada três dias. Quando as células atingiram confluência mínima de 80 % foi realizada a dissociação destas células, procedendo-se a lavagem da garrafa com PBS (do termo em Inglês *Phosphate-buffered saline*) e posterior procedimento enzimático padrão com ATV (associação de tripsina e versene) (Instituto Adolfo Lutz, Brasil) por 3 minutos a temperatura de 37 °C, seguida da centrifugação da suspensão celular a 250 X g por 7 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a massa celular ressuspendida com meio DMEM *Low* 20 % SFB. Essas células foram utilizadas na expansão das culturas ou na execução dos experimentos.

4.2.2. Cultivo de células K562 e Lucena

As células K562 e Lucena, criopreservadas, foram descongeladas rapidamente em banho-maria a 37 °C e transferidas para um tubo plástico de fundo cônico de 15 mL, contendo 10 mL de meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute 1640*) (Sigma-Aldrich), suplementado com 10 % SFB, 26,4 mM de bicarbonato de sódio (Merck) e antibióticos (RPMI 1640 10 % SFB), ou meio DMEM *Low* 10 % SFB. O tubo foi centrifugado a 250 X g por 7 minutos à temperatura ambiente, sendo o sobrenadante descartado e a massa celular ressuspendida em 15 mL de meio RPMI 1640 10 % SFB ou DMEM *Low* 10 % SFB. As células foram cultivadas em garrafas de cultura celular de 75 cm² ou 182 cm² em incubadoras a 37 °C, com atmosfera úmida e 5 % de CO₂. A substituição do meio de cultivo ou a redução da cultura foi realizada a cada três dias. Essas células foram utilizadas na expansão das culturas ou na execução dos experimentos.

O cultivo das células Lucena foi acrescido de vincristina (Sigma-Aldrich), na concentração final de 60 nM, para manutenção de fenótipo MDR, com exceção ao momento dos experimentos.

4.3. Caracterização das linhagens celulares K562 e Lucena

Com o objetivo de caracterizar o perfil genético das linhagens celulares K562 e Lucena, empregadas nesta tese, foi realizada a técnica de *short-tandem repeat* (STR),

método reconhecido como "padrão-ouro" na autenticação de linhagens celulares (Tytgat *et al.*, 2021). Essa análise foi realizada no Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) em colaboração com a Profa. Dra. Edna Sadayo Miazato Iwamura e com o Dr. Rodrigo Pinheiro Araldi. Para tanto, uma garrafa de cultura de cada linhagem foi destinada à extração de DNA.

4.3.1. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com o kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen). As amostras foram processadas de acordo com as orientações da bula do kit. Aproximadamente 1 x 10^7 células foram ressuspendidas em 200 µL de PBS, acrescidos de 20 µL de proteinase K e 200 µL de Buffer AL, presentes no kit, e incubadas a 56 °C por 10 minutos. Foram adicionados 200 µL de etanol absoluto (Merck) a essa suspensão celular tratada, que foi transferida para a coluna, contendo a membrana de sílica gel, e centrifugada a 6.000 X g por 1 minuto à temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e foi acrescentado a coluna 500 µL do Buffer AW1. A coluna foi centrifugada a 6.000 X g por 1 minuto à temperatura ambiente, sendo o filtrado descartado e a coluna lavada com 500 µL do Buffer AW2. A coluna foi centrifugada a 20.000 X g por 3 minutos à temperatura ambiente e o filtrado foi descartado. Foram adicionados 20 µL de Buffer AE à coluna e essa foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. A coluna foi centrifugada a 6.000 X g por 1 minuto à temperatura ambiente e o filtrado foi descartado.

4.3.2. Autenticação das linhagens celulares por STR

O DNA extraído foi quantificado empregando o kit *Quantifilter Trio DNA Quantification* (Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas em placas de 96 poços, sendo adicionados 18 μ L da mistura de *master mix* (10 μ L) e oligonucleotídeos (8 μ L) contidos no kit. Um volume de 2 μ L da amostra de DNA extraída foi adicionado a cada poço, totalizando um volume de 20 μ L de reação. Como controles foram empregadas amostras de DNA de concentrações conhecidas (para preparo da curva padrão) e amostras sem adição de DNA (controle negativo). A placa foi selada com a película óptica e levada ao termociclador Applied Biosystems *7500 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, EUA). A partir da quantidade de DNA autossômico e sexual (X), foi realizada a amplificação empregando os kits *PowerPlex Fusion6C System* (Promega, EUA), que permite analisar 27 *loci* multiplex de STR. Estes kits permitem amplificar o DNA com oligonucleotídeos marcados com fluorocromos.

Para tanto, foram realizadas reações contendo 5 µL do master mix de cada um dos respectivos kits, 0,3 ng de DNA e água q.s.p. 25 µL. Essas reações foram realizadas em placas de 96 poços no termociclador Veriti 96-Well ThermalCycler (Applied Biosystems, EUA), programado para os seguintes ciclos: 1 minuto a 96 °C, 29 ciclos de 5 segundos a 96 °C, 1 minuto a 60 °C e uma extensão final de 10 minutos a 60 °C. Os produtos da reação foram analisados em eletroforese capilar, realizada no sequenciador ABI 3500XL Genetic Alayzer (Thermo Scientific, EUA), empregando capilar de 36 cm e polímero POP-4 (Applied Biosystems, EUA). Nesta etapa, o produto da amplificação foi misturado com formamida altamente deionizada (que mantém o DNA desnaturado) e com o marcador de peso molecular. Dessa forma, 1 µL do material amplificado foi adicionado a 9,8 µL de formamida Hi-Di e 0,2 µL de WEN ILS 500 (marcador de peso molecular) e foram transferidos, poço por poço, para uma placa de 96 poços, a qual foi levada ao termociclador por três minutos a 95 °C para a desnaturação. A detecção dos fragmentos foi realizada pela emissão de fluorescência captada à medida que os fragmentos de DNA passam por um laser. Os dados dessa análise foram adquiridos pelo software 3500 series Data Collection versão 3.1 (Applied Biosystems, EUA) e analisados pelo software GeneMapper™ *ID-X 1.6* (Applied Biosystems, EUA).

4.4. Padronização e validação das análises realizadas na plataforma de *High Content Screening* (HCS)

Após todas as linhagens celulares utilizadas nesta tese estarem devidamente caracterizadas e validadas, foi muito importante a padronização e validação da análise das células K562 e Lucena na plataforma de HCS. O HCS realiza as análises através de imagens celulares e posteriormente é realizada a quantificação da fluorescência na imagem. Para uma correta análise é necessário padronizar o número de células em cada imagem evitando a falta de células ou a sobreposição dessas.

Utilizando placas de 96 poços pretas com fundo transparente (Corning), foi realizada uma curva com quantidades crescentes de células e observou-se que as concentrações de 1 X 10⁴ e 2 X 10⁴ células por poço foram as concentrações que proporcionaram as melhores condições de análise.

Como as células K562 e Lucena são células que crescem em suspensão no meio de cultivo e devido à característica particular das células K562 formarem agrupamentos celulares com forma de cachos de uva, foi necessária a padronização da metodologia analítica para o trabalho com essas linhagens celulares. A metodologia foi padronizada incluindo uma etapa de homogeneização, por turbilhonamento com micropipeta, para dissociação dos agrupamentos celulares, seguida da centrifugação da placa para que as células estivessem todas em um mesmo plano para análise.

A padronização da quantidade ideal de células para análise e dos procedimentos de homogeneização e centrifugação das placas, forneceram as condições ideais de análise das células K562 e Lucena pela plataforma de HCS. Após a realização de pelo menos 3 experimentos, repetindo os procedimentos padronizados e obtendo resultados equivalentes, essa metodologia pôde ser considerada validada.

A etapa de validação das metodologias analíticas é muito importante e têm por objetivo demonstrar que o método analítico é adequado para o seu propósito (Walsh, 1999).

4.5. Cocultura de células-tronco mesenquimais e células K562 ou Lucena

Foram conduzidos cultivos celulares em esquema de cocultura, empregando sistema de transfiltro Transwell[®] Inserts (Corning) (*inserts*), com membrana permeável de 0,4 µm. Nesse sistema, 5 X 10⁴ células-tronco mesenquimais foram semeadas em cada poço de placas de 24 poços (Corning). As células foram cultivadas por 24 horas em meio DMEM *Low* 20 % SFB, em incubadora a 37 °C, com atmosfera úmida e 5 % de CO₂, para a adesão celular, obtenção da confluência mínima de 80 % e para a realização dos experimentos. Após essa incubação inicial, o meio de cultura dos poços foi aspirado e descartado, sendo adicionados 750 µL de meio DMEM *Low* 10 % SFB em cada poço onde foi realizada a cocultura. Os *inserts* foram instalados nesses

poços e foram adicionados 250 µL de uma suspensão de células K562 ou Lucena no interior de casa insert, contendo nesse volume 2,5 X 10⁵ células. Foram realizados controles apenas com as células isoladas, incubadas em 1 mL meio DMEM *Low* 10 % SFB e o controles de morte, onde as células foram incubadas com 1 mL de meio DMEM *Low* 10 % SFB acrescido de 20 % de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). O volume final dos poços foi sempre de 1 mL. As placas foram incubadas em incubadora a 37 °C, com atmosfera úmida e 5 % de CO₂. O meio de cultura não foi trocado até o final de cada experimento, permitindo assim que as duas linhagens compartilhassem o mesmo microambiente. As análises foram realizadas após 48 horas de incubação.

Esse mesmo sistema foi utilizado com placas de 6 poços (Corning), utilizando os *inserts* adequados à essas placas, quando uma maior quantidade de células foi necessária para análise, como por exemplo, na extração de RNA. O procedimento foi o mesmo descrito para as placas de 24 poços, porém, as quantidades e volumes utilizados são quatro vezes maiores. Portanto, foram utilizadas 2 X 10⁵ células-tronco mesenquimais por poço e 1 X 10⁶ células K562 ou Lucena em cada *insert.* O volume final dos poços foi de 4 mL.

Com caráter didático, ilustramos na figura 01 um *insert* (figura 01A) e um esquema de cocultura entre as CTM e as células leucêmicas (figura 01B). As CTM foram semeadas na placa de cultura, enquanto as células leucêmicas foram semeadas no interior dos *inserts*. Devido à porosidade dos *inserts*, ambos os tipos celulares compartilharam o mesmo microambiente, havendo a troca de substâncias solúveis e vesículas extracelulares com tamanho inferior a 0,4 µm (secretoma), entre os dois tipos celulares.

Como as células K562 têm um tempo de dobramento médio de 20 a 24 horas (Martins *et al.*, 1997) e sabidamente a taxa de proliferação das células Lucena é menor que o das células K562 (Daflon-Yunes *et al.*, 2013), optamos por trabalhar com o período de 48 horas de cultivo/cocultivo em nossos experimentos. Dessa forma, garantimos um maior tempo para que houvesse interação entre as células leucêmicas e as CTM, no microambiente gerado com as coculturas, e para que houvesse ao menos um ciclo completo relativo ao tempo de dobramento das células K562 e Lucena.



Figura 01. Ilustração de um insert e do esquema de uma cocultura

A) Ilustração de um *Insert*. Fonte: *Corning website*; B) representação esquemática de uma cocultura entre CTM e células K562 ou Lucena em um poço de placa de cultivo celular. Fonte: de autoria própria.

4.6. Contagem total de células e viabilidade

As células leucêmicas K562 e Lucena controle, controle de morte e cocultivadas com as células-tronco mesenquimais foram avaliadas quanto a sua viabilidade e a contagem total de células utilizando Hoechst 33342 e iodeto de propídio (PI). Para isso, no mínimo 2 horas antes do término do período de incubação, foram adicionados nos inserts e nos poços controles das células leucêmicas K562 e Lucena 0,1 µg/mL de Hoecsht 33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Ao término do período de incubação, as suspensões de células K562 e Lucena dos inserts ou poços controle foram homogeneizadas e o volume correspondente a 1 x 10⁴ células leucêmicas iniciais (10 µL do interior dos inserts ou 40 µL dos poços controle e controle de morte) foi transferido para uma microplaca de poliestireno preta de 96 poços com fundo chato e transparente (Corning). O volume final de todos os pocos foi ajustado para 100 µL com PBS. Foram adicionados a cada poço 0,1 µg de iodeto de propídio (Molecular Probes) e a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Após incubação, a placa foi centrifugada a 250 X g por 3 minutos a temperatura ambiente. Foi utilizada a Plataforma ImageXpress Micro High Content Screening System (HCS) (Molecular Devices), com a aquisição de cinco sítios por poço e dois poços para cada condição. O software Cell Scoring MetaXpress (versão 5, Molecular Devices) foi utilizado para analisar o número de células e sua viabilidade.

4.7. Análise de morte celular (apoptose e necrose)

As células leucêmicas K562 e Lucena controle, controle de morte e cocultivadas com as células-tronco mesenquimais foram avaliadas quanto à presença e tipo de morte celular (apoptose e necrose) através do kit Annexin-V/PI (BD Pharmigem, USA). No mínimo 2 horas antes do término do período de incubação, foram adicionados nos inserts e nos controles das células leucêmicas (K562 e Lucena) 1 µL Hoecsht 33342 (0,1 mg/mL). Após o período de incubação, o volume correspondente a 1 x 10⁴ células leucêmicas (10 µL do interior dos inserts ou 40 µL dos poços controle e controle de morte) foi transferido para uma placa preta de 96 poços com fundo chato e transparente (Corning). O volume final de todos os pocos foi ajustado para 100 µL com PBS. Foram adicionados a cada poço da placa de 96 poços 12,5 µL da solução de Anexina V/PI, sendo essa preparada pela mistura de 0,5 µL de Anexina-V (FITC), 2 µL de iodeto de propídeo (PI) e 10 µL tampão anexina V 10 X (contendo 0,1 M de Hepes/NaOH (pH 7,4), 1,4 M de NaCl, 25 mM de CaCl₂). Após a adição da mistura de Anexina V/PI à placa, essa foi centrifugada a 250 X g por 3 minutos a temperatura ambiente. A análise foi realizada pela plataforma de HCS, utilizando o equipamento ImageXPress Micro High Content (Molecular Devices, EUA), sendo adquiridos cinco sítios por poço e dois poços por condição. O software Cell Health MetaExpress (Molecular Devices) foi utilizado para analisar a porcentagem de células mortas por apoptose e necrose, fornecendo o percentual de células marcadas com anexina V, PI ou ambos os marcadores, além do número total de células analisadas.

4.8. Atividade de caspases 3/7

As células leucêmicas K562 e Lucena controle, controle de morte e cocultivadas com as células-tronco mesenquimais foram avaliadas quanto à atividade de caspase 3/7, utilizando o reagente *CellEvent Caspase 3/7 Green* (Invitrogen Life Technologies). Para isso, no mínimo 2 horas antes do término do período de incubação, foram adicionados nos inserts e nos poços controles das células leucêmicas K562 e Lucena 0,1 µg/mL de Hoecsht 33342. Ao término do período de incubação, as suspensões de células K562 e Lucena dos inserts ou poços controle foram homogeneizadas e o volume correspondente a 1 x 10⁴ células leucêmicas

iniciais (10 µL do interior dos inserts ou 40 µL dos poços controle e controle de morte) foi transferido para uma microplaca de poliestireno preta de 96 poços com fundo chato e transparente (Corning). O volume final de todos os poços foi ajustado para 100 µL com PBS. Foi adicionado a cada poço 1 µL do reagente *CellEvent Caspase 3/7 Green* e a placa foi incubada por 15 minutos ao abrigo da luz. Após incubação, a placa foi centrifugada a 250 X g por 3 minutos a temperatura ambiente. Foi utilizada a Plataforma *ImageXpress Micro High Content Screening System* (HCS) (Molecular Devices), com a aquisição de cinco sítios por poço e dois poços para cada condição, para quantificação da fluorescência do substrato. O *software Cell Scoring MetaXpress* (versão 5, Molecular Devices) foi utilizado para analisar a atividade de caspase 3/7.

4.9. Array de citocinas

Ao término das 48 horas de cocultura entre as células leucêmicas K562 e Lucena com as CTM-LMA e CTM-HMO (conforme descrito no item 4.5.), o meio de cultura dessas coculturas foi aspirado, filtrado em filtro Millex de 0,22 µm (Millipore), aliquotado e armazenado em ultrafreezer a -80 °C para a realização do *array* de citocinas.

Foram avaliadas, semiquantitativamente, a produção de 36 citocinas (CCL1/I-309, CCL2/MCP-1, MIP-1α/MIP-1β, CCL5/RANTES, CD40 ligante/TNFSF5, componente do complemento C5/C5a. CXCL1/GROa, CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1, G-CSF, GM-CSF, CXCL11/I-TAC. ICAM-1/CD54, INF-v. IL-1α/IL-1F1, IL-1β/IL-1F2, IL-1ra/IL-1F3, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL12p70, IL-13, IL-16, IL-17A, IL-17E, IL-18/IL-1F4, IL-21, IL-27, IL-32α, MIF, Serpin E1/PAI-1, TNF-α, TREM-1), utilizando o kit semiquantitativo Proteome Profiler Antibody Arrays *Human Cytokine Array* (R&D Systems).

Para tanto, foi feito uma mistura com quantidades iguais do sobrenadante de três experimentos diferentes das coculturas K562/CTM-LMA, K562/CTM-HMO, Lucena/CTM-LMA e Lucena/CTM-HMO, gerando 4 amostras distintas para análise.

As amostras foram analisadas de acordo com as recomendações do kit. Em suma, o kit é composto por membranas de nitrocelulose que contém anticorpos de

captura ancorados em sua superfície, em duplicata e em regiões estabelecidas. As membranas foram incubadas, sob agitação, por 1 hora à temperatura ambiente com 2 mL do Array Buffer 4, para bloqueio de ligações inespecíficas. As amostras foram preparadas com a mistura de 700 µL da amostra de meio de cultura das coculturas, 300 µL Array Buffer 4, 500 µL Array Buffer 5 e 15 µL do Human Cytokine Array Detection Antibody Cocktail reconstituído, seguida da incubação por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Após incubação, o Array Buffer 4 das membranas foi descartado. As membranas foram então incubadas com as amostras, previamente preparadas, por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente e posteriormente overnight sob refrigeração (2 °C a 8 °C). Após essa etapa, as membranas foram lavadas por 4 vezes com o Wash Buffer. Utilizando o Array Buffer 5, diluiu-se a Streptavidin-HRP de acordo com as recomendações desse reagente e adicionaram-se 2 mL dessa solução sobre cada membrana, que foram incubadas, sob agitação, por 30 minutos à temperatura ambiente. As membranas foram lavadas por 3 vezes com o Wash Buffer, sendo incubadas posteriormente por 1 minuto com Chemi Reagent Mix, sob agitação. A leitura foi realizada no equipamento ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Science) em modo de quimioluminescência e tempo de exposição de 10 minutos. A análise das imagens foi realizada com o software Image Quant TL 8.1 (GE Healthcare Life Science) no modo Array Analysis. Os dados foram normalizados dividindo-se os valores obtidos em cada ponto pela média do resultado dos controles e multiplicando-se o resultado por 1.000. Os resultados são apresentados como número de pixels.

4.10. Análise da expressão gênica de proteínas ABC e ciclinas D1 e D2

4.10.1. Extração de RNA total pelo método de fenol-clorofórmio utilizando TRI Reagent®

Após o término do período de cultura e/ou cocultura, as células K562 e Lucena foram recolhidas e acondicionadas em microtubos. Após lavagem das células com PBS e centrifugação a 250 X g por 10 minutos à temperatura ambiente, foi adicionado 1 mL de TRI Reagent® (Sigma-Aldrich) à massa celular contendo de 1 X 10⁶ a 2 X 10⁶ células, sendo a mistura homogeneizada com o auxílio de uma micropipeta e

armazenada em freezer a -20 °C até o momento da extração do RNA. Para extração do RNA as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e adicionadas de 200 µL de clorofórmio (Merck), seguido de vigorosa agitação e incubação por 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12.000 X g por 15 minutos a 4 °C, sendo a fase aquosa (incolor) transferida para um novo microcubo estéril, livre de RNAse. Foi realizada a precipitação do RNA, utilizando 500 µL de álcool isopropílico gelado (Merck) para cada amostra. As amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos e, após esse período, centrifugadas a 12.000 X g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, acrescentando-se 1 mL de etanol 75 % (Merck) ao RNA precipitado; etanol preparado no momento do uso com água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) (Sigma-Aldrich). As amostras foram homogeneizadas vigorosamente e centrifugadas por 7.500 X g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA seco à temperatura ambiente por cerca de 15 minutos, sendo posteriormente ressuspendido em 20 µL de água tratada com DEPC.

4.10.2. Tratamento com DNAse

RNA 1000 As amostras de foram quantificadas NanoDrop em Spectrophotometer V3.7 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e 1 µg de RNA de cada amostra foi diluído em água tratada com DEPC para o volume final de 8 µL. Foram acrescidos à cada amostra 1 µL de Buffer DNAse 1 X (Promega, Madison, WI, USA) e 1 µL da enzima RQ1 DNAse 1 UI/µL (Promega, Madison, WI, USA), seguido de incubação a 37 ºC por 30 minutos. Após incubação, foi adicionado 1 µL do Stop Solution (Promega, Madison, WI, USA), seguido de incubação a 65 °C por 10 minutos, para que ocorra a inativação da enzima.

4.10.3. Síntese do cDNA

Com o RNA tratado com DNAse, foi realizada a reação de transcrição reversa para a síntese do cDNA com o *kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied BiosystemsTM). O cDNA foi obtido em volume final da reação de 20 µL, contendo 1 µg de RNA total, 1 µL de iniciadores aleatórios (20 pM), 2 µL de *RT Buffer* (10 X tampão de reação), 1 µL de dNTP mix (4 mM de cada dNTP), 1 µL *de MultiScribe*TM *Reverse Transcriptase* (transcriptase reversa) e água tratada com DEPC para completar o volume final de 20 µL. As amostras foram submetidas às variações de temperatura de 25° C por 10 minutos, 37° C por 120 minutos e 85° C por 5 minutos no termociclador PTC-200® (Peltier Engine, EUA).

4.10.4. Expressão gênica de proteínas ABC (array de proteínas ABC)

Antes da utilização do cDNA sintetizado, foi realizada a validação das amostras de cDNA das células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA ou CTM-HMO, utilizando o gene endógeno da β -glucuronidase (*GUSB*, 4326320E - Thermo Fisher - Waltham, Massachusetts, USA), sendo utilizados por amostra: 5 µL de *TaqMan Universal Master Mix* (Applied Biosystem), 1,5 µL de água tratada com DEPC, 0,5 µL do conjunto de *primers* e sonda TaqMan e 3 µL da amostra de cDNA. As reações preparadas (10 µL/amostra) foram aplicadas na placa de 96 poços para PCR (Scientific Specialities Inc), que foi selada com o adesivo óptico MicroAmpTM (Applied Biosystems), centrifugada a 250 X g por 5 minutos a temperatura ambiente e analisada no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) através do *software 7500 software* v2.0.5 (Applied Biosystems). No equipamento, a temperatura das amostras foi elevada para 95 °C por 20 segundos, seguida pela realização de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos.

Após verificado que as amostras de cDNA estavam viáveis, foram utilizadas placas de PCR em arranjo (gPCR array) para múltiplos genes envolvidos nos transportadores ABC (TagMan® Array 96 Well FAST Plate Human ABC Transporters, Applied Biosystems), verificando a expressão gênica de 44 proteínas transportadoras ABC: ABCA1 (Hs00194045_m1), ABCA12 (Hs00292421_m1), ABCA2 (Hs00242232_m1), ABCA3 (Hs00184543_m1), ABCA4 (Hs00184367_m1), ABCA5 (Hs00363322_m1), ABCA6 (Hs00365329_m1), ABCA7 (Hs00185303_m1), ABCA8 (Hs00992371_m1), ABCB1 (Hs00184491_m1), ABCB10 (Hs00429240_m1), ABCB11 (Hs00184824_m1), ABCB4 (Hs00240956_m1), ABCB5 (Hs00698751_m1), ABCB6 (Hs00180568_m1), ABCB7 (Hs00188776_m1), ABCB8 (Hs00185159_m1), ABCB9 (Hs00375716_m1), ABCC1 (Hs00219905_m1), ABCC10 (Hs00608640_m1), ABCC11 ABCC12 (Hs00264354 m1), (Hs01090768 m1), ABCC2 (Hs00166123_m1), ABCC3 (Hs00358656_m1), ABCC4 (Hs00195260_m1), ABCC5 (Hs00981089_m1), ABCC6 (Hs00184566_m1), ABCC8 (Hs00165861_m1), ABCC9 (Hs00245832_m1), ABCD1 (Hs00163610_m1), ABCD2 (Hs00193054_m1), ABCD3 (Hs00161065_m1), *ABCD4* (Hs00245340_m1), *ABCE1* (Hs01003010_g1), *ABCF1* (Hs00153703_m1), *ABCF2* (Hs00606493_m1), *ABCG1* (Hs00245154_m1), *ABCG2* (Hs00184979_m1), *ABCG4* (Hs00223446_m1), *ABCG5* (Hs00223686_m1), *ABCG8* (Hs00223690_m1), *CFTR* (Hs00357011_m1), *TAP1* (Hs00388677_m1), e *TAP2* (Hs00241060_m1).

Para tanto, foi feito uma mistura de quantidades iguais de cDNA de três experimentos diferentes das coculturas Lucena/CTM-LMA e Lucena/CTM-HMO, gerando duas amostras distintas para análise.

Para realização do *array*, 144 µL das amostras de cDNA foram acrescidos de 96 µL de água tratada com DEPC e 240 µL de *TaqMan Universal Master Mix* 2X (Applied Biosystems). Foram aplicados 10 µL das amostras preparadas em cada poço da placa, sendo essa selada com o adesivo óptico MicroAmp™ e centrifugada a 250 X g por 5 minutos a temperatura ambiente. Foram avaliadas duas amostras por placa, sendo aplicadas uma amostra em todos os poços das colunas 1 a 6 (Lucena/CTM-LMA - referência) e a outra amostra em todos os poços das colunas 7 a 12 (Lucena/CTM-HMO - comparativo). A análise foi realizada no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), onde a temperatura das amostras foi elevada para 95 °C por 20 segundos, seguida pela realização de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos. A aquisição e análise dos resultados foi realizada através do *software 7500 software* v2.0.5 (Applied Biosystems), utilizando a metodologia de 2^{-ΔΔCT}.

4.10.5. Expressão gênica de ciclina D1 e ciclina D2

Após verificado que as amostras de cDNA estavam viáveis, foi realizado o RT-PCR para avaliar a expressão dos genes da ciclina D1 (*CCND1*) e ciclina D2 (*CCND2*) nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA ou CTM-HMO. A expressão do mRNA foi normalizada utilizando o gene endógeno da β-glucuronidase (*GUSB*, 4326320E - Thermo Fisher - Waltham, Massachusetts, USA), utilizando o método comparativo de CT (do termo em inglês *cycle threshold*) e as duplicatas não excederam o valor 0,5 CT entre elas. Foram utilizadas sondas TaqMan hidrolisáveis para *CCND1* (Hs00765553_m1) e *CCND2* (Hs00153380_m1) (Applied Biosystems), sendo utilizados por amostra: 5 μL de *TaqMan Universal Master Mix*

(Applied Biosystem), 1,5 µL de água tratada com DEPC, 0,5 µL do conjunto de sondas hidrolisáveis TaqMan e 3 µL da amostra de cDNA. As reações preparadas (10 µL/amostra) foram aplicadas na placa de 96 poços para PCR (Scientific Specialities Inc), que foi selada com o adesivo óptico MicroAmp[™] (Applied Biosystems), centrifugada a 250 X g por 5 minutos a temperatura ambiente e analisada no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) através do *software 7500 software* v2.0.5 (Applied Biosystems), utilizando a metodologia de 2^{-ΔΔCT}. No equipamento, a temperatura das amostras foi elevada para 95 °C por 20 segundos, seguida pela realização de 40 ciclos de 95 °C por 3 segundos e 60 °C por 30 segundos.

4.11. Ciclo celular

Aproximadamente 1 x 10⁶ células K562 ou Lucena, controle ou cocultivadas com CTM-LMA ou CTM-HMO foram coletadas em tubos para citometria (BD). Essas células foram lavadas com PBS e fixadas com etanol 70 % gelado, sendo armazenadas em freezer a -20 °C até o momento da análise. Para análise, essas células foram lavadas com PBS, ressuspendidas em solução de PBS com 100 µg/mL de RNAse e 20 µg/mL de iodeto de propídio (PI) (SIGMA, St. Louis, MO), sendo incubadas a 37 °C por 45 minutos. Após incubação, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo, utilizando o citômetro de fluxo FACSCanto[™] II (Becton Dickinson, San Jose, CA.), com a aquisição de 10.000 eventos por amostra. A análise da porcentagem do conteúdo de DNA nas diferentes fases do ciclo celular foi realizada utilizando o *software FlowJo*[™] *Software v10.5.3 Software* (Ashland, BD Life Sciences).

4.12. Análise estatística

A verificação de diferenças estatísticas entre os parâmetros analisados das células leucêmicas K562 e Lucena em cultura ou cocultura com células-tronco mesenquimais de indivíduos saudáveis e acometidos pela leucemia mieloide aguda, foi realizada utilizando a análise da variância (ANOVA), quando da comparação de

mais de dois grupos, com comparações múltiplas de Tukey; ou utilizando o teste t de student para comparação de dois grupos. Para essas análises foi utilizando o pacote estatístico *GraphPad Prism 9.3.0* ®. Os resultados são expressos como média ± erro padrão (SEM), considerando estatisticamente significantes valores de $p \le 0,050$. Os dados foram verificados quanto a presença de "outliers" utilizando o método de ROUT e Q = 1 %, sendo os dados considerados "outliers" desconsiderados nas análises.

5. RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização das células

5.1.1. Células-tronco mesenquimais

As células-tronco mesenquimais utilizadas nesta tese, oriundas de indivíduos saudáveis ou pacientes acometidos pela leucemia mieloide aguda, foram previamente isoladas e caracterizadas pelo grupo de pesquisa, obedecendo aos critérios mínimos estabelecidos para que essas fossem consideradas células-tronco mesenquimais:

- a) Adesão ao plástico;
- b) Expressão dos antígenos de superfície CD29, CD44, CD90 e CD105, com ausência da expressão dos antígenos de superfície CD34, CD45 e CD11b;
- c) Diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica (Paz et al., 2019).

De forma didática, a figura 02 ilustra duas culturas de células-tronco mesenquimais, diretamente de suas garrafas de cultivo celular. Essas células são identificadas deste ponto em diante apenas como CTM-LMA para as células-tronco mesenquimais oriundas da medula óssea de pacientes acometidos pela leucemia mieloide aguda (figura 02A) e como CTM-HMO para as células-tronco mesenquimais oriundas da indivíduos saudáveis (figura 02B).

Figura 02. Fotomicrografia de células-tronco mesenquimais



Fotomicrografia de células-tronco mesenquimais de: **A**) medula óssea de paciente com leucemia mieloide aguda (CTM-LMA); **B**) medula óssea de indivíduo saudável (CTM-HMO). Células aderidas ao fundo das garrafas de cultivo celular. Imagens obtidas com microscópio invertido Zeiss Axio A.1 com objetiva de 5 X. Escala igual a 20 µm. Fonte: de autoria própria.

5.1.2. Células K562 e Lucena

Originalmente, as células-tronco mesenquimais são cultivadas em meio DMEM *Low* 20 % SFB e as células leucêmicas das linhagens K562 e Lucena são cultivadas em meio RPMI 1640 10 % SFB. No entanto, para a realização das coculturas é importante que ambos os tipos celulares fossem cultivados em um mesmo meio de cultivo, para minimizarmos possíveis variáveis durante os experimentos e análises. Devido a esse fato, foi necessária a adaptação do cultivo das células K562 e Lucena ao meio DMEM *Low* 10 % SFB. Foi escolhida a adaptação das células leucêmicas, pois essas apresentam maiores taxas de proliferação em relação às CTM e por se tratar de linhagens estabelecidas, dessa forma, facilitando sua posterior caracterização.

A adaptação do cultivo das células leucêmicas (K562 e Lucena) ao novo meio de cultura se deu pela manutenção dessas células, por 20 passagens consecutivas, em meio DMEM *Low* 10 % SFB, em incubadora a 37 °C, com atmosfera úmida e 5 % de CO₂. No caso das células Lucena, foi mantida a adição de vincristina ao meio de cultivo, na concentração final de 60 nM, para manutenção do fenótipo MDR apresentado por essa linhagem celular em particular.

Ao término do processo de adaptação do cultivo das células K562 e Lucena em meio DMEM *Low*, realizamos a extração do DNA de uma amostra de ambas as linhagens para sua caracterização, de acordo com seu perfil de STR.

O perfil de STR obtido para a amostra de células K562, adaptadas ao cultivo com meio DMEM Low (anexo 02), apresenta 100 % de homologia com o perfil de STR descrito nas fichas técnicas da American Type Culture Collection (ATCC) e do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) para essa linhagem, conforme pode ser verificado na tabela 03. Apesar de a amostra de células K562 apresentar o alelo 17 no Locus vWA e esse alelo não ser reportado nas especificações técnicas da ATCC e do BCRJ, a linhagem K562 adaptada ao meio DMEM Low foi considerada validada.

O perfil de STR obtido para a amostra de células Lucena, adaptadas ao cultivo com meio DMEM *Low* (anexo 03), apresenta 86 % de homologia com o perfil de STR descrito na ficha técnica do BCRJ para essa linhagem, conforme pode ser verificado

na tabela 03. Apesar da ausência dos alelos 11 no *Locus* D16S539 e 9 no *Locus* D7S820, a linhagem Lucena adaptada ao meio DMEM *Low* foi considerada validada.

		Alelos			
Locus	ATCC K562	BCRJ K562/Lucena	Amostra K562	Amostra Lucena	
Amelogenin	Х	Х	Х	Х	
CSF1PO	9, 10	9, 10	9, 10	9, 10	
D13S317	8	8	8	8	
D16S539	11, 12	11, 12	11, 12	12	
D5S818	11, 12	11,12	11, 12	11, 12	
D7S820	9, 11	9, 11	9, 11	11	
TH01	9.3	9.3	9.3	9.3	
ТРОХ	8, 9	8, 9	8, 9	8, 9	
vWA	16	16	16, 17	16	

Tabela 03. Perfil de STR das linhagens leucêmicas K562 e Lucena

Comparativo do perfil de STR das linhagens leucêmicas K562 e Lucena, adaptadas ao cultivo em meio de cultura DMEM *Low* 10 % SFB, às especificações da ATCC e do BCRJ. Por se tratar de uma célula parental à linhagem K562, a linhagem Lucena apresenta o mesmo perfil de STR dessa. ATCC: *American type culture collection*; BCRJ: Banco de células do Rio de Janeiro; DMEM *Low: Dulbecco's Modified Eagle Medium Low glucose*; SFB: soro fetal bovino. Fonte: Dados de autoria própria e dados extraídos da ATCC e BCRJ (ab).

Quando comparamos os perfis de STR completos obtidos para as linhagens K562 e Lucena, considerando todos os 27 *loci* analisados (anexos 02 e 03), observamos que a homologia entre as duas linhagens é superior a 90 %, confirmando que se tratam de linhagens parentais. Esse fato era esperado devido à linhagem Lucena derivar da linhagem K562, que foi tratada para o desenvolvimento e seleção de uma linhagem com fenótipo de resistência à múltiplas drogas.

Com caráter ilustrativo, apresentamos na figura 03 a fotomicrografia de uma cultura de células K562, exibindo os tradicionais agrupamentos celulares com forma de "cachos de uva" (figura 3A), e a fotomicrografia de uma cultura de células Lucena, onde, apesar das células apresentarem morfologia e tamanho semelhantes aos das

células K562, não há a formação de agrupamentos celulares (figura 3B). Ambas as imagens se referem às culturas adaptadas ao crescimento em meio DMEM *Low*, que não difere do cultivo com o meio RPMI.



Figura 03. Fotomicrografias de células K562 e Lucena

A) cultura de células K562, apresentando os clássicos agrupamentos celulares com forma de "cachos de uva", escala de 50 μm; **B**) cultura de células Lucena, apresentando as células isoladas, sem a presença de agrupamentos celulares, escala de 50 μm. Imagens obtidas com microscópio invertido Zeiss Axio A.1 com objetiva de 20 X. Fonte: de autoria própria.

5.2. Análise da contagem total de células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO

Um dos primeiros experimentos que realizamos foi a avaliação da quantidade de células leucêmicas presente nas coculturas após as 48 horas de incubação, comparando-as com seus respectivos controles. Por motivos intrínsecos à técnica de preparação das suspensões celulares, há variação do número de células inicial em cada experimento. Portanto, para uma adequada comparação dos dados obtidos, foi realizada a normalização das contagens celulares. Essa normalização se deu pelo cálculo da razão entre o número de células das amostras (células K562 ou Lucena cocultivadas com CTM-LMA ou CTM-HMO) e o número de células de seus respectivos controles. Nessa situação, os controles assumem o valor 1,0 e os dados obtidos são apresentados no gráfico da figura 04.

Figura 04. Representação gráfica da razão entre o número de células leucêmicas (K562 ou Lucena) cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO e o número de células leucêmicas de seus respectivos controles



Controles K562 e Lucena n = 8; Coculturas CTM-LMA K562 e Lucena n = 10; Coculturas CTM-HMO K562 e Lucena n = 6. Dados apresentados como média e erro padrão. Realizado teste de ANOVA (K562 p = 0,020 e Lucena p < 0,001) e pós teste de Tukey para comparação de grupos. Foram considerados estatisticamente significantes valores de p \leq 0,050 (*). Análises realizadas com *software GraphPad Prism 9.3.0.* Fonte: de autoria própria.

Nas coculturas, não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre a razão do número de células da cultura K562 controle e a cocultura K562/CTM-LMA p = 0,209), tampouco entre as coculturas (1,00 e 0,81 respectivamente, K562/CTM-LMA e K562/CTM-HMO (0,81 e 0,63 respectivamente, p = 0,269). Porém, foi observada uma redução significante de 37 % entre a razão do número de células da cocultura K562/CTM-HMO quando comparada à cultura K562 controle (0,63 e 1,00 respectivamente, p = 0.015). Na linhagem Lucena, foi observado o mesmo padrão. Não sendo encontradas diferenças significantes entre a razão da contagem de células da cultura Lucena controle e a cocultura Lucena/CTM-LMA (1,00 e 0,80 respectivamente, p = 0.077) e entre as coculturas Lucena/CTM-LMA e Lucena/CTM-HMO (0,80 e 0,55 respectivamente, p = 0,054). No entanto, houve uma redução significante de 45 % na razão da contagem de células da cocultura Lucena/CTM-HMO, guando comparada à cultura de células Lucena controle (0,55 e 1,00 respectivamente, p < 0,001).

Observamos, após esta análise, que houve redução significante da contagem das células K562 e Lucena quando essas foram cocultivadas com as CTM-HMO, não havendo diferenças significante na contagem de células quando as células leucêmicas foram cocultivadas com as CTM-LMA.

5.3. Viabilidade das células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO

Além da razão da contagem das células K562 e Lucena presentes nas culturas e coculturas, a viabilidade dessas células também foi avaliada, como pode ser verificado na figura 05.

Figura 05. Representação gráfica da viabilidade das células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO



Dados apresentados em porcentagem como média e erro padrão. Controles K562 e Lucena n = 8; Coculturas CTM-LMA: K562 n = 10 e Lucena n = 9; Coculturas CTM-HMO: K562 e Lucena n = 6. Realizado teste de ANOVA (K562 p < 0,001; Lucena p = 0,011) e pós teste de Tukey para comparação de grupos. Foram considerados estatisticamente significantes valores de p \leq 0,050 (*). Análises realizadas com o *software GraphPad Prism 9.3.0*. Fonte: de autoria própria.

Na linhagem K562, não foi observada diferença estatística significante entre o controle e a cocultura K562/CTM-LMA (96,94 % e 91,41 % respectivamente, p = 0,144), porém, foi observada redução de 30 % na viabilidade da cocultura

K562/CTM-HMO em comparação com a cultura K562 controle (67,61 % e 96,94 % respectivamente, p < 0,001) e uma redução de 26 % na viabilidade quando comparamos a cocultura K562/CTM-HMO com a cocultura K562/CTM-LMA (67,61 % e 91,41 % respectivamente, p < 0,001). Já para linhagem Lucena, observamos redução de 16 % na viabilidade da cocultura Lucena/CTM-LMA em comparação à cultura Lucena controle (78,46 % e 93,89 % respectivamente, p = 0,037) e redução de 21 % na viabilidade da cocultura Lucena/CTM-HMO em comparação à cultura Lucena controle (73,75 % e 93,89 % respectivamente, p = 0,016). No entanto, não foram observadas diferenças significantes na viabilidade das células Lucena entre as coculturas Lucena/CTM-HMO e Lucena/CTM-LMA (73,75 % e 78,46 % respectivamente, p = 0,737).

Esses resultados mostram que a cocultura entre as células leucêmicas e as CTM-HMO reduzem significantemente a viabilidade das células K562 e Lucena quando comparadas ao controle. No caso das coculturas com células K562, a redução da viabilidade dessas células também é significante quando comparamos as coculturas K562/CTM-HMO e K562/CTM-LMA, sendo que as células CTM-HMO são responsáveis por uma menor viabilidade das células K562 quando comparadas às células CTM-LMA.

5.4. Análise de morte celular nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO

Ao verificarmos a redução na viabilidade das células leucêmicas K562 e Lucena nas coculturas com CTM-HMO, avaliamos qual o tipo de morte celular (apoptose e necrose) envolvida na alteração da viabilidade dessas células.

5.4.1. Apoptose

Na figura 06 são apresentados os dados obtidos com a determinação da porcentagem de apoptose encontrada nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com células CTM-LMA e CTM-HMO.



Figura 06. Representação gráfica da porcentagem de morte celular por apoptose nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO

Dados apresentados em porcentagem como média e erro padrão. Controles: K562 e Lucena n = 6; Coculturas CTM-LMA: K562 e Lucena n = 6; Coculturas CTM-HMO: K562 e Lucena n = 6. Realizado teste de ANOVA (K562 e Lucena p < 0,001) e pós teste de Tukey para comparação de grupos. Foram considerados estatisticamente significantes valores de p \leq 0,050 (*). Testes realizados com *software GraphPad Prism 9.3.0.* Fonte: de autoria própria.

Na linhagem K562, não foi observada diferença significante entre os índices de apoptose das células K562 controle e a cocultura K562/CTM-LMA (4,89 % e 0,00 % respectivamente, p = 0,426). No entanto, foi observado aumento maior que 5 vezes nos índices de apoptose da cocultura K562/CTM-HMO comparada à cultura K562 controle (26,01 % e 4,89 % respectivamente, p < 0,001) e maior que 26 vezes quando comparada à cocultura K562/CTM-LMA (26,01 % e 0,00 % respectivamente, p < 0,001). Para a linhagem Lucena, foi observado um padrão muito semelhante, não sendo encontrada diferença significante entre os índices de apoptose da cultura Lucena controle e Lucena/CTM-LMA (0,00 % e 4,75 % respectivamente, p = 0,394). Por outro lado, foi encontrado aumento superior à 17 vezes nos índices de apoptose da cocultura Lucena/CTM-HMO comparada à cultura Lucena controle (17,06 % e 0,001) e aumento superior à 3 vezes quando comparada à cocultura Lucena/CTM-LMA (17,06 % e 4,75 % respectivamente, p = 0,009).

Desta forma, observamos elevação nos níveis de apoptose nas células K562 e Lucena cocultivadas com as CTM-HMO, não havendo alterações nos níveis de apoptose das células leucêmicas cocultivadas com as CTM-LMA.

5.4.2. Ativação de caspases 3/7

Em paralelo à análise dos índices de apoptose, realizamos, também, a análise de ativação das caspases 3/7 nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com células CTM-LMA e CTM-HMO (figura 07).

Figura 07. Representação gráfica da porcentagem de ativação das caspases 3/7 nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO



Dados apresentados em porcentagem como média e erro padrão. Controles: K562 n = 8 e Lucena n = 6; Coculturas CTM-LMA: K562 e Lucena n = 6; Coculturas CTM-HMO: K562 e Lucena n = 6. Realizado teste de ANOVA (K562 p < 0,001 e Lucena p = 0,003) e pós teste de Tukey para comparação de grupos. Foram considerados estatisticamente significantes valores de p \leq 0,050 (*). Testes realizados com *software GraphPad Prism 9.3.0.* Fonte: de autoria própria.

As células K562 controle não apresentam ativação das caspases 3/7, em cocultura há aumento superior a 24 vezes nos índices de ativação das caspases 3/7 quando comparamos a cocultura K562/CTM-LMA à cultura K562 controle (24,18 % e 0,00 % respectivamente, p = 0,002) e aumento superior a 21 vezes nos índices de ativação das caspases 3/7 quando comparamos a cocultura K562/CTM-HMO à cultura K562 controle (21,42 % e 0,00 % respectivamente, p = 0,005). No entanto, não foi observada diferença significante nos índices de ativação das caspases 3/7 entre as coculturas K562/CTM-LMA e K562/CTM-HMO (24,18 % e 21,42 % respectivamente, p = 0,896). Quando avaliamos as células Lucena, foi observado um padrão muito semelhante ao encontra com as células K562. As células Lucena controle apresentam
índices de ativação das caspases 3/7 muito próximo à zero. Houve aumento superior a 15 vezes na ativação das caspases 3/7 na cocultura Lucena/CTM-LMA em comparação às células Lucena controle (15,01% e 0,00 % respectivamente, p = 0,003) e aumento superior à 11 vezes na ativação das caspases 3/7 na cocultura Lucena/CTM-HMO em comparação às células Lucena controle (11,65 % e 0,00 % respectivamente, p = 0,017). No entanto, não foi observada diferença significante nos índices de ativação das caspases 3/7 entre as coculturas Lucena/CTM-LMA e Lucena/CTM-HMO (15,01 % e 11,65 % respectivamente, p = 0,640).

Esses achados demonstram que as células K562 e Lucena apresentaram aumento dos níveis de ativação das caspases 3/7 quando cocultivadas tanto com as CTM-HMO quanto com as CTM-LMA.

5.4.3. Necrose

Avaliamos também os índices de morte celular por necrose nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO, sendo os dados obtidos representados na figura 8.

Figura 08. Representação gráfica da porcentagem de morte celular por necrose nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO



Dados apresentados em porcentagem como média e erro padrão. Controles: K562 e Lucena n = 6; Coculturas CTM-LMA: K562 e Lucena n = 6; Coculturas CTM-HMO: K562 e Lucena n = 6. Realizado teste de ANOVA (K562 p = 0,041 e Lucena p = 0,003) e pós teste de Tukey para comparação de grupos. Foram considerados estatisticamente significantes valores de p \leq 0,050 (*). Testes realizados com *software GraphPad Prism 9.3.0.* Fonte: de autoria própria.

Realizada a avaliação da morte celular por necrose, observamos que a linhagem K562 controle apresenta níveis de necrose muito próximos à zero. Apesar de haver um ligeiro aumento nos índices de necrose na cocultura K562/CTM-LMA, esse não se se mostrou significante quando comparado à cultura K562 controle (1,32 % e 0,38 % respectivamente, p = 0,875), tampouco quando comparada à cocultura K562/CTM-HMO (1,32 % e 5,41 % respectivamente, p = 0,111). No entanto, houve aumento significante, superior à 5 vezes, nos índices de necrose da cocultura K562/CTM-HMO quando comparada à cultura K562 controle (5,41 % e 0,38 % respectivamente, p = 0.045). As células Lucena controle, igualmente às células K562 controle, apresentam índices de necrose basal muito próximos à zero. Embora tenha havido um ligeiro aumento no índice de necrose das células Lucena da cocultura Lucena/CTM-LMA, esse não foi significante em comparação às células Lucena controle (1,65 % e 0,33 % respectivamente, p = 0,705). No entanto, observa-se aumento significante nos índices de necrose, superior à 7 vezes, quando comparamos as células Lucena da cocultura Lucena/CTM-HMO com as células Lucena controle (6,93 % e 0,33 % respectivamente, p = 0,003) e um aumento superior à 4 vezes quando comparamos essa cocultura com a cocultura Lucena/CTM-LMA (6,93 % e 1,65 % respectivamente, p = 0,014).

Portanto, observamos o aumento da morte celular por necrose nas células K562 e Lucena cocultivadas com as CTM-HMO. Por outro lado, não foi encontrado aumento significante da morte celular por necrose nas células leucêmicas K562 e Lucena cocultivadas com CTM-LMA.

5.5. Dosagem semiquantitativa de citocinas nas coculturas de células K562 e Lucena com CTM-LMA e CTM-HMO

Além dos estudos ligados à investigação da proliferação e viabilidade das células leucêmicas K562 e Lucena nas coculturas com as CTM-HMO e CTM-LMA, foi realizada a dosagem semiquantitativa das citocinas produzidas nas coculturas. Foram investigados o conjunto dos sobrenadante de 3 experimentos de coculturas entre células K562 e Lucena cocultivadas com CTM-HMO e CTM-LMA. Os resultados obtidos são reportados na tabela 04.

Citocinas	K562			Lucena		
	CTM-LMA ($\overline{x} \pm$ SEM)	CTM-HMO ($\overline{x} \pm$ SEM)	р	CTM-LMA $(\overline{x} \pm SEM)$	CTM-HMO ($\overline{x} \pm SEM$)	р
CCL2 / MCP-1	22,7 ± 3,6	113,4 ± 16,1	0,016	17,5 ± 0,9	78,5 ± 7,0	0,007
CXCL12 / SDF-1	5,1 ± 1,5	8,5 ± 0,1	0,080	4,4 ± 0,1	3,1 ± 0,1	0,012
IL-6	83,1 ± 3,9	65,4 ± 1,6	0,027	84,4 ± 8,8	128,5 ± 2,1	0,021
IL-8	$28,7 \pm 3,4$	15,7 ± 0,1	0,032	23,9 ± 3,3	43,0 ± 3,1	0,027
MIF	27,4 ± 2,5	$32,8 \pm 2,5$	0,167	22,6 ± 1,5	20,8 ± 1,6	0,369
Serpin E1 / PAI-1	172,9 ± 7,2	188,6 ± 29,5	0,540	136,7 ± 3,6	182,0 ± 3,2	0,006

Tabela 04. Dosagem semiquantitativa de citocinas no sobrenadante das coculturas de células K562 e Lucena com CTM-LMA e CTM-HMO.

Dados apresentados em pixels como média \pm erro padrão (SEM). CTM-LMA: células-tronco mesenquimais de medula óssea de óssea de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda; CTM-HMO: células-tronco mesenquimais de medula óssea de indivíduos saudáveis; CCL2: C-C *motif chemokine ligand* 2; MCP-1: *monocyte chemoattractant protein* 1; CXCL12: *C-X-C motif chemokine* 12; SDF-1: *stromal cell-derived factor* 1; IL-6: Interleucina 6; IL-8: Interleucina 8; MIF: *Macrophage migration inhibitory factor*, PAI-1: *Plasminogen activator inhibitor-1*. A comparação das médias foi realizada utilizando o teste t de Student. Análise realizada no *softwareGraphPad Prism* 9.3.0. Foram considerados significantes valores de p ≤ 0,050. Fonte: de autoria própria.

Quando comparamos a cocultura K562/CTM-HMO com a cocultura K562/CTM-LMA, observamos que não houve diferença significante na produção de CXCL12/SDF-1, MIF e Serpin E1/PAI-1. No entanto, observamos aumento significante da produção de CCL2/MCP1, associado a redução significante na produção de IL-6 e IL-8 na cocultura K562/CTM-HMO em relação à cocultura K562/CTM-LMA. Já na comparação entre as coculturas Lucena/CTM-HMO e Lucena/CTM-LMA, observamos que não houve diferença significante na produção apenas do MIF entre as duas coculturas. No entanto, observamos aumento significante na produção de CCL2/MCP-1, IL-6 e IL-8, associado com a redução significante da produção de CXCL12/SDF-1 na cocultura Lucena/CTM-HMO relação em à cocultura Lucena/CTM-LMA e redução de Serpin E1/PAI-1 na cocultura Lucena/CTM-LMA em relação à cocultura Lucena/CTM-HMO.

Dessa forma, observamos diferenças na produção de CCL2/MCP-1, IL-6 e IL-8 entre as coculturas K562/CTM-HMO e K562/CTM-LMA, e diferenças na produção de

CCL2/MCP-1, CXCL12/SDF-1, IL-6, IL-8 e Serpin E1/PAI-1 entre as coculturas Lucena/CTM-HMO e Lucena CTM-LMA. MIF foi a única citocina que não apresentou diferenças em seus níveis de produção em nenhum dos sistemas de cocultura avaliados.

5.6. Análise da expressão gênica de proteínas ABC, CCND1 e CCND2

5.6.1. Expressão gênica de proteínas ABC

Foi investigado também, como as células Lucena cocultivadas com CTM-HMO se comportam quanto a expressão gênica de suas proteínas ABC, quando comparadas às células Lucena cocultivadas com CTM-LMA. Para essa investigação, foi realizado um *array* dos genes das proteínas transportadoras ABC por PCR em tempo real, comparando a expressão das proteínas ABC das células Lucena/CTM-LMA (referência) e as células Lucena/CTM-HMO (figura 09).

Figura 09. *Array* da expressão gênica das proteínas ABC de células Lucena cocultivadas com CTM-HMO, tendo como referência (valor zero) células Lucena cocultivadas com CTM-LMA



Dados apresentados em log de RQ (*relative quantification*). Valores do log de RQ \geq 0,30 representam hiperexpressão das proteínas ABC e valores \leq -0,30 indicam inibição da expressão dessas proteínas. Análise realizada com o *software GraphPad Prism* 9.3.0. Fonte: de autoria própria.

Hiperexpressão gênica se refere a valores de RQ (log) maiores ou iguais a 0,30 e a inibição gênica a valores menores ou iguais a -0,30 (Stutzbach, 2015). Observa-se, portanto, que houve a hiperexpressão dos genes das proteínas transportadoras ABCA1, ABCB11, ABCC11 e ABCE1, acompanhada da inibição da expressão dos genes das proteínas transportadoras ABCC3, ABCC9, ABCD3 e ABCG4 nas células Lucena cocultivadas com CTM-HMO em comparação às cocultivadas com CTM-LMA.

5.6.2. Expressão gênica de CCND1 e CCND2

Foi avaliada a expressão dos genes *CCND1* e *CCND2* nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO, sendo os dados obtidos observado na figura 10.

Para o gene CCND1 (figura 10 A), não foi observada nenhuma diferença significante entre as células K562 controle e as coculturas K562/CTM-LMA (0,00 e 0,04 respectivamente, p = 0,934) e K562/CTM-HMO (0,00 e 0,43 respectivamente, p = 0,059), tampouco entre as coculturas K562/CTM-LMA e K562/CTM-HMO (0,04 e 0,43 respectivamente, p = 0,125). Para as células Lucena, não houve diferença significante na expressão do gene CCND1 entre as células Lucena controle e a cocultura Lucena/CTM-LMA (0,00 e 0,00 respectivamente, p > 0,999). No entanto, houve hiperexpressão desse quando comparamos а gene cocultura Lucena/CTM-HMO à cultura Lucena controle ($0,35 \in 0,00$ respectivamente, p = 0,017) e à cocultura Lucena/CTM-LMA (0,35 e 0,00 respectivamente, p = 0,035).

Para o gene CCND2 (figura 10 B), houve inibição da expressão desse gene na cocultura de células K562/CTM-LMA quando comparada à cultura K562 controle (-0,31 e 0,00 respectivamente, p = 0,011). No entanto, não houve diferença significante da expressão do gene CCND2 quando comparamos a cultura K562 controle e a cocultura K562/CTM-HMO (0,00 e -0,20 respectivamente, p = 0,122) ou coculturas K562/CTM-LMA e K562/CTM-HMO (-0,31 entre as е -0,20 respectivamente, p = 0,544). Para as células Lucena, nenhuma diferença significante foi observada na expressão do gene CCND2 entre as células Lucena controle e as coculturas Lucena/CTM-LMA (0,00 e -0,17 p = 0,229) e Lucena/CTM-HMO (0,00 e 0,06 respectivamente, p = 0,821), tampouco entre as duas coculturas (-0,17 e 0,06 respectivamente, p = 0,125).

Figura 10. Expressão dos genes da ciclina D1 (*CCND1*) e ciclina D2 (*CCND2*) nas células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO



A) Expressão gênica de *CCND1* em células K562 e Lucena controles e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO (K562: Controle n = 8; CTM-LMA n = 6; CTM-HMO n = 6; Lucena: Controle n = 10; CTM-LMA n = 6; CTM-HMO n = 6). Realizado teste de ANOVA (K562 p = 0,055; Lucena p = 0,014) e pós teste de Tukey para comparação de grupos; B) Expressão gênica de *CCND2* em células K562 e Lucena controles e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO (K562 e Lucena: Controle n = 10; CTM-LMA n = 6; CTM-HMO n = 6). Realizado teste de ANOVA (K562 p = 0,011; Lucena p = 0,123) e pós teste de Tukey para comparação de grupos; Dados apresentados em log de RQ (*relative quantification*) como média e erro padrão (SEM). Foram considerados estatisticamente significantes valores de p ≤ 0,050 (*). Análises realizadas no *software GraphPad Prism 9.3.0.* CTM-LMA: células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes com leucemia mieloide aguda; CTM-HMO: células-tronco mesenquimais de medula

Portanto, observou-se a hiperexpressão do gene *CCND1* nas células Lucena cocultivadas com CTM-HMO e a inibição da expressão do gene *CCND2* nas células K562 cocultivadas com CTM-LMA.

5.7. Análise do ciclo celular das células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO

Por fim, verificamos se havia alterações no ciclo celular das células K562 e Lucena quando cocultivadas com as CTM-LMA e CTM-HMO, conforme dados apresentados na figura 11.

Comparando a cultura K562 controle com as coculturas, observou-se aumento de 70 % na fase G0/G1 da cocultura K562/CTM-LMA (41,48 % e 66,18 % respectivamente, p < 0.001) e aumento de 34 % nessa mesma fase da cocultura K562/CTM-HMO (41,48 % e 55,76 % respectivamente, p = 0,023). No entanto, não há diferença significante quando comparamos a fase G0/G1 entre as coculturas K562/CTM-LMA e K562/CTM-HMO (66,18 % e 55,76 % respectivamente, p = 0,139). Na fase S, quando comparamos o a cultura K562 controle com as coculturas, observamos redução de 62 % na cocultura K562/CTM-LMA (46,31 % e 19,38 % respectivamente, p < 0,001) e redução de 44 % na cocultura K562/CTM-HMO (46,31 % 27,13 % respectivamente, p = 0,001), porém, não há diferença significante entre as coculturas K562/CTM-LMA e K562/CTM-HMO (19,38 % e 27,13 % respectivamente, p = 0,252). Para a fase G2/M, observamos aumento de 38 % dessa fase quando comparamos a cocultura K562/CTM-HMO à cultura K562 controle (16,91% e 12,26 % respectivamente, p = 0,036). No entanto, não foram encontradas diferenças significantes quando comparamos a cultura K562 controle com a cocultura K562/CTM-LMA (12,26 % e 14,55 % respectivamente, p = 0,391), tampouco entre as coculturas K562/CTM-LMA e K562/CTM-HMO (14,55 % e 16,91 % respectivamente, p = 0,416) (figura 11A).



Figura 11. Representação gráfica das porcentagens das fases do ciclo celular das células K562 e Lucena controle e cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO

A) K562; B) Lucena. Dados apresentados como porcentagem em média e erro padrão (SEM). K562 e Lucena: Controles n = 8; CTM-LMA n = 6; CTM-HMO n = 6. Realizado teste de ANOVA e pós teste de Tukey para comparação de grupos. Foram considerados estatisticamente significantes valores de p \leq 0,050. Símbolos diferentes em uma mesma fase do ciclo celular indicam diferenças estatísticas. Testes realizados com *software GraphPad Prism* 9.3.0. Fonte: de autoria própria.

Para as células Lucena, encontramos um padrão um pouco diferente. Na fase G0/G1, quando comparamos a cultura Lucena controle com as coculturas, observamos redução de 23 % dessa fase do ciclo celular na cocultura Lucena/CTM-LMA (54,72 % e 41,27 % respectivamente, p = 0,010) e aumento de 24 % na cocultura Lucena/CTM-HMO (54,72 % e 67,97 % respectivamente, p = 0,008). Quando comparamos as duas coculturas entre si, a fase G0/G1 da

cocultura Lucena/CTM-HMO é 62 % maior que a da cocultura Lucena/CTM-LMA (67,97 % e 41,92 % respectivamente, p < 0,001). Na fase S, quando comparamos a cultura Lucena controle com as coculturas, observamos aumento de 45 % dessa fase do ciclo celular na cocultura Lucena/CTM-LMA (33,76 % e 49,07 % respectivamente, p = 0,002) e diminuição de 31 % na cocultura Lucena/CTM-HMO (33,76 % e 23,38 % respectivamente, p = 0,028). Quando comparamos as duas coculturas entre si, a fase S da cocultura Lucena/CTM-LMA é aproximadamente 2 vezes maior que a da cocultura Lucena/CTM-HMO (49,07 % e 23,38 % respectivamente, p < 0,001). Já para a fase G2/M, não foram encontradas diferenças significantes na comparação da cultura Lucena controle com as coculturas Lucena/CTM-LMA (13,47 % e 9,76 % Lucena/CTM-HMO (13,47 % respectivamente, p = 0,483е е 11,34 % respectivamente, p = 0,782), tampouco na comparação entre as coculturas Lucena/CTM-LMA e Lucena/CTM-HMO (9,76 % e 11,34 % respectivamente, p = 0,886) (figura 11B).

Portanto, observamos aumento da fase G0/G1 nas coculturas das células K562 e Lucena cocultivadas tanto com as CTM-HMO quanto com as CTM-LMA, seguida por diminuição de fase S e aumento de fase G2/M. Para as células Lucena, observamos diminuição da fase G0/G1, acompanhada de aumento de fase S manutenção da fase G2/M na cocultura Lucena/CTM-LMA e aumento de fase G0/G1, acompanhado de diminuição de fase S e manutenção de fase G2/M na cocultura Lucena-CTM-HMO.

6. DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Esta tese teve como premissa o estudo da interação entre as células-tronco mesenquimais de medula óssea de indivíduos saudáveis e pacientes portadores de leucemia mieloide aguda e as células das linhagens leucêmicas K562 e Lucena, através de seu secretoma. Foram avaliados parâmetros relacionados à inibição do crescimento, morte celular por apoptose e necrose, ativação de caspases 3/7, modulação da produção de citocinas, alterações na expressão dos genes da ciclina D1 (*CCND1*) e ciclina D2 (*CCND2*), alterações no ciclo celular e na modulação da expressão de genes de resistência a múltiplas drogas das células leucêmicas. Para tanto, foi necessária a realização de coculturas, ou seja, a realização da cultura de ambos os tipos celulares (CTM e células leucêmicas) em um mesmo microambiente, porém, sem o contato direto célula-célula entre as diferentes linhagens.

O estudo das células-tronco é hoje uma das áreas de maior destaque na pesquisa biomédica, havendo diversas pesquisas em andamento, avaliando principalmente sua aplicação na medicina regenerativa, entre outras aplicações. Fato esse que pode ser verificado pela simples busca pelas palavras *"stem cell regenerative medicine"* no PubMed, que em junho de 2022 retornou 46.088 resultados à busca utilizando esses termos.

Uma das primeiras células-tronco a serem conhecidas e estudadas foram as células-tronco da medula óssea (Wright, 2000), porém, outras células-tronco, como as células-tronco mesenquimais, células-tronco de cordão umbilical e as células-tronco pluripotente induzidas vêm ganhando destaque em uma série de pesquisas (Gurusamy *et al.*, 2018). Acredita-se que o efeito terapêutico que as células-tronco de medula óssea desempenham, estaria ligado à secreção de fatores que induziriam um processo de regeneração natural do órgão afetado. Porém, o mecanismo pelo qual as células-tronco exercem sua ação terapêutica em algumas doenças não hematológicas não é plenamente conhecido, gerando controvérsias na comunidade científica (Pereira, 2008).

São encontramos dois tipos de células-tronco na medula óssea, sendo elas as células-tronco hematopoiéticas e as células-tronco mesenquimais. É sabido que as células-tronco mesenquimais são o ponto central da manutenção do nicho

hematopoiético, porém, essas células podem estar envolvidas no processo de proteção das células tumorais ao efeito da quimioterapia (Chandran *et al.*, 2015, Diaz De La Guardia *et al.*, 2017) ou em casos de recidiva (Zhu *et al.*, 2015).

Há indícios sugerindo que o microambiente da medula óssea apresente participação importante na resistência à terapia e na recidiva das leucemias (Chandran *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2017). Portanto, estudamos nesta tese a ação entre as células-tronco mesenquimais da medula óssea de doadores saudáveis e de pacientes portadores de LMA sobre as células leucêmicas, sendo utilizadas duas linhagens parentais, K562 e Lucena.

As células K562 são derivadas de uma paciente acometida pela leucemia mieloide crônica em crise blástica e apesentam sensibilidade à vincristina. Já as células Lucena, são provenientes da linhagem K562 tratada com doses crescentes de vincristina até a seleção de uma linhagem com fenótipo MDR. Como resultado dessa seleção, as células Lucena apresentam hiperexpressão do gene *ABCB1*, ligado à produção da P-gp, um dos principais genes associados ao fenótipo MDR (Moreira *et al.*, 2014). A linhagem Lucena apresenta uma expressão do gene *ABCB1* cerca de 1400 vezes maior que sua linhagem parental K562 (Moreira *et al.*, 2014; Carrett-Dias *et al.*, 2016). Dessa forma, dispomos de duas linhagens leucêmicas parentais, sendo uma sensível e a outra resistente a quimioterapia, que nos permitiram uma adequada comparação dos resultados obtidos.

Foram utilizadas células-tronco mesenquimais de pacientes com LMA e as células K562 e Lucena, que são originadas de uma paciente com LMC. Embora nessa situação tenhamos dois tipos distintos de leucemia, vale lembrar que as células K562 e Lucena são originadas de uma paciente com LMC em crise blástica.

A diferenciação entre uma leucemia mieloide crônica em crise blástica primária e uma leucemia mieloide aguda positiva para o cromossomo Philadelphia é um desafio, requerendo uma criteriosa análise clínica, molecular e citológica (Pastoret; Houot, 2017; Liu *et al.*, 2019). Essa dificuldade se deve a possibilidade desses dois tipos de leucemia apresentarem algumas alterações genéticas em comum como a trissomia do cromossomo 8, por exemplo (Calabretta; Perrotti, 2004). Há muitas características semelhantes entre a LMA e a crise blástica da LMC. Entre essas semelhanças temos a presença de porcentagem ≥ 20 % blastos circulantes ou na medula óssea, além de mais de uma mutação genética associada às células leucêmicas nesses casos (Arber *et al.*, 2016). Mesmo que mais raros, há casos de LMA Ph+, sendo esses casos muito semelhantes e difíceis de distinguir dos casos de LMC em crise blástica. Para essa distinção são necessários uma série de exames citogenéticos e um histórico clínico detalhado do paciente para se determinar ao certo o tipo de leucemia. Além disso, mesmo sendo de tipos diferentes, ambas compartilham uma agressividade clínica semelhante (Soupir *et al.*, 2007).

Portanto, embora tenhamos trabalhado com células de dois tipos distintos de leucemia, temos um mesmo comportamento clínico agressivo das células de LMA e LMC em crise blástica, isso porque a crise blástica pode ser considerada como uma agudização da LMC, onde essa passa a se assemelhar a uma leucemia aguda (Biggs; Zhang, 2018). Como o objetivo desta tese foi avaliar o comportamento do secretoma das CTM saudáveis e originadas de pacientes portadores de leucemia mieloide aguda sobre as células leucêmicas K562 e Lucena, consideramos viável o modelo experimental adotado, visto as células serem de tipos de leucemia comparáveis em sua agressividade e gravidade clínica.

Um fator chave na condução de nossos experimentos foi a caracterização das células utilizadas. As CTM-HMO e CTM-LMA foram previamente isoladas e caracterizadas pelo grupo de pesquisa, obedecendo todos os critérios mínimos estabelecidos para que essas fossem consideradas células-tronco mesenquimais (Paz *et al.*, 2019). Quanto as células das linhagens K562 e Lucena, devido a essas linhagens terem passado por um processo de adaptação ao cultivo em meio DMEM *Low*, após o período de adaptação as células foram caracterizadas de acordo com seu perfil de STR. Os resultados obtidos (tabela 03) apontaram uma correspondência de 100 % entre o perfil de STR da linhagem K562 adaptada ao cultivo em meio DMEM *Low* e o perfil de STR apresentado nas fichas técnicas do ATCC e do BCRJ para essa linhagem celular. Para a linhagem Lucena, adaptada ao cultivo em meio DMEM *Low*, a correspondência foi de 86 % ente seu perfil de STR e o perfil de STR apresentado na ficha técnica do BCRJ para essa linhagem celular. Tendo em vista que as células são consideradas validadas quando seu perfil de STR apresenta correspondência > 80 % com a referência (Rubocki *et al.*, 2000), as células K562 e Lucena adaptadas

ao cultivo em meio DMEM *Low* foram consideradas validadas e aptas à realização dos experimentos.

Após as etapas de padronização e validação das linhagens celulares e dos procedimentos para a análise das células K562 e Lucena utilizando a plataforma de HCS, foi dado seguimento à condução dos experimentos para a realização desta tese.

Lozzio e Lozzio (1979) demonstraram que na cocultura entre CTM-HMO e células K562, as células-tronco mesenquimais reduzem a proliferação das células K562 (Lozio; Lozio, 1979). De forma semelhante ao encontrado por Lozzio e Lozzio, nossos resultados evidenciaram uma redução significante da proliferação tanto das células K562 quanto das células Lucena cocultivadas com as CTM-HMO (figura 4). Nos chamou a atenção que a linhagem Lucena, que é sabidamente uma linhagem resistente (MDR), sofreu uma redução significante em sua proliferação equiparada à linhagem K562 quando em cocultura com as CTM-HMO. Esse achado nos mostrou que o secretoma das CTM-HMO pode exercer sua ação tanto nas células leucêmicas sensíveis quanto nas resistentes à quimioterapia.

Por outro lado, quando as células leucêmicas foram cocultivadas com as CTM-LMA, observamos que não houve uma redução significante da proliferação das células K562 e Lucena. Dessa forma, observamos que o secretoma das CTM-LMA não apresenta a mesma ação que o secretoma das CTM-HMO sobre as células leucêmicas, não sendo capaz de reduzir a proliferação dessas células.

Fica evidente que as CTM-HMO, quando em cocultura com as células leucêmicas K562 ou Lucena, promovem a inibição da proliferação das células leucêmicas, enquanto esse efeito não é observado com as coculturas entre as células leucêmicas e as CTM-LMA.

Observamos que a inibição da proliferação das células K562 e Lucena, quando cocultivadas com as CTM-HMO (figura 4), está associada com uma significante redução da viabilidade dessas células (figura 5). Mais uma vez, podemos observar que o secretoma das CTM-HMO exerceu ação semelhante tanto nas células leucêmicas sensíveis quanto nas células leucêmicas resistentes, reduzindo significantemente a viabilidade de ambas. O mesmo não ocorreu quando as células K562 foram cocultivadas com as CTM-LMA, não havendo diferença significante na

viabilidade dessas células nessa cocultura em relação a seu controle, porém, curiosamente observamos redução na viabilidade das células Lucena cocultivadas com CTM-LMA frente a seu controle. No caso das células K562, observamos ainda uma redução significante da viabilidade dessas células quando comparamos as coculturas K562/CTM-HMO e K562/CTM-LMA, mostrando uma redução da viabilidade das células K562 quando essas foram cocultivadas com as CTM-HMO. No entanto, o mesmo não ocorreu com as células Lucena.

Devido à redução da viabilidade das células K562 e Lucena relatada acima, investigamos o tipo de morte celular envolvida nesse processo, avaliando a apoptose (figura 6), ativação de caspases 3/7 (figura 7) e necrose (figura 8).

Nossos achados mostraram que tanto as células K562, quanto as células Lucena, quando cocultivadas com CTM-HMO, apresentaram um aumento significante da morte celular por apoptose e necrose, além do aumento da ativação das caspases 3/7. O mesmo não foi observado quando essas células foram cocultivadas com CTM-LMA. Apesar de observarmos redução da viabilidade das células Lucena cocultivadas com CTM-LMA, não observamos redução da viabilidade das células K562 cocultivadas com CTM-LMA. De forma muito interessante, observamos que as células leucêmicas K562 e Lucena não apresentam aumento significante da apoptose quando cocultivadas com CTM-LMA, porém, apresentam um aumento marcante da ativação das caspases 3/7. Conceitualmente, essa ativação de caspases efetoras está intimamente ligada à apoptose, no entanto, algumas células podem sobreviver à ativação da caspase 3 desde que o estímulo seja transitório ou subletal em relação ao tempo (Tang et al., 2012). Esse processo de reversão da apoptose é chamado de anastase e pode proteger a célula de um dano permanente pela exposição a um agente agressor transiente, ou ter implicações oncológicas, sendo um mecanismo de escape das células tumorais frente ao tratamento quimioterápico e até mesmo radioterápico (Ding et al., 2016; Sun et al., 2017). Dessa forma, podemos supor que o secretoma das CTM-LMA possui a presença, ou ausência de algum fator que protege as células leucêmicas, enquanto o secretoma das CTM-HMO leva as células leucêmicas à apoptose.

Nossos experimentos demonstraram que o secretoma das CTM-HMO promoveu a inibição da proliferação, associada à redução da viabilidade e consequente aumento da apoptose, necrose e ativação de caspases 3/7 na linhagem K562, assim como na linhagem resistente Lucena. A literatura apresenta alguns trabalhos utilizando diferentes fontes de CTM que demonstraram resultados semelhantes ao que encontramos em relação às coculturas com células K562, como por exemplo o trabalho de Fonseka e colaboradores (2013) utilizando CTM derivadas do sangue de cordão umbilical (FONSEKA *et al.*, 2013) e o trabalho de Huwaikem e colaboradores (2021) utilizando CTM derivadas da geleia de Wharton (Huwaikem *et al.*, 2021).

Estudos recentes têm demonstrado que as células leucêmicas induzem alterações nas CTM, fazendo com que essas gerem um microambiente propício para seu desenvolvimento (Jafarzadeh *et al.*, 2019). Esse fato é coerente com os resultados encontrados quando realizamos as coculturas das células leucêmicas com as CTM-LMA. Nesse caso, não foram observadas diferenças significantes quanto a proliferação, viabilidade, apoptose e necrose das células leucêmicas K562 e Lucena quando comparamos as coculturas aos seus controles.

As CTM-LMA de diferentes doadores, quando em cultura, apresentam características heterogêneas. Algumas dessas culturas apresentam características semelhantes às culturas de CTM-HMO, outras não apresentam células aderentes e outras, apesar de apresentarem células aderentes, desempenham um crescimento muito lento (Chandran *et al.*, 2015).

As CTM-HMO e as CTM-LMA demonstraram a mesma capacidade expansiva de células precursoras hematopoiéticas (CD34+, CD38+). No entanto, as CTM-LMA demonstraram uma baixa capacidade suportiva à geração de células mais diferenciadas (CD34-, CD38+) em comparação às CTM-HMO (Chandran *et al.*, 2015). Essa característica demonstra que as CTM-LMA tem um grande déficit em sua capacidade de promover a expansão de células progenitoras hematopoiéticas funcionais (CD34+) e efetivamente atenuam o desenvolvimento hematopoiético normal (Conforti *et al.*, 2013; Chandran *et al.*, 2015; Geyh *et al.*, 2016; Le *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2017), sendo o mesmo observado nos casos de leucemia linfoide aguda (Vicente López *et al.*, 2014). A expressão dos genes reguladores da quiescência celular (*ANGPT1* e *SPP1*) se mostra aumentada nas CTM-LMA. Esse achado explicaria o porquê dessas células inibirem a proliferação e diferenciação das células-tronco hematopoiéticas (Chandran *et al.*, 2015). Uma expansão significante de

células hematopoiéticas CD45+ se mostrou presente quando estas estavam em cocultura com CTM-HMO. No entanto, não houve uma expansão significante das células hematopoiéticas CD45+ quando essas foram cocultivadas com as CTM-LMA (Chandran *et al.*, 2015).

Dessa forma, pode-se dizer que as CTM-LMA sofreram uma "reprogramação" para manterem a quiescência das células progenitoras hematopoiéticas, dessa forma, limitando sua contribuição para a hematopoese normal na medula óssea e promovendo a expansão das células leucêmicas (Chandran *et al.*, 2015; Geyh *et al.*, 2016; Le *et al.*, 2016). Essa informação justifica a ausência de diferença significante entre a viabilidade (figura 05), apoptose (figura 6) e necrose (figura 08) quando as células K562 e Lucena são cocultivadas com as CTM-LMA, em relação a seus controles.

As CTM-LMA exibem alta clonogenicidade e potencial imunossupressor e anti-inflamatório *in vitro*, quando comparadas às células-tronco mesenquimais derivadas de indivíduos saudáveis. Diaz De La Guardia e colaboradores (2017) demonstraram que a produção das principais citocinas pró-inflamatórias (INF- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-8) é significantemente inibida pelas CTM-LMA. Ainda nesse contexto, os níveis da citocina inflamatória IL-6 permanecem inalterados e a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 é aumentada nas CTM-LMA de baixo e alto risco. Isso confirma a atividade imunossupressora e anti-inflamatória que células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de indivíduos portadores de leucemia mieloide aguda possuem, promovendo a inibição da proliferação de linfócitos e modulando a secreção de citocinas. Além disso, altas concentrações de IL-10 estão ligadas a uma menor sobrevida dos indivíduos portadores de leucemia mieloide aguda (Diaz De La Guardia *et al.*, 2017).

Apesar dos critérios para classificarmos uma célula como sendo uma célula-tronco mesenquimal, observamos que nem todas as células-tronco mesenquimais são iguais em sua potencialidade, indicando que são populações celulares heterogêneas. Isso fica evidente com os diferentes perfis de expressão de proteínas e citocinas encontrados em células-tronco mesenquimais obtidas de diferentes fontes (Lv *et al.*, 2014).

Alguns estudos sugerem que a capacidade de as células-tronco mesenquimais repararem lesões pode não estar relacionada à sua transdiferenciação em células próprias do tecido lesado ou na fusão celular, mas sim na secreção de fatores solúveis que podem alterar o microambiente tecidual. Foi demonstrado, *in vitro*, que células-tronco mesenquimais são capazes de produzir vários fatores com ações biológicas como angiogênese, secreção de peptídeos neuroreguladores e citocinas críticas para processos inflamatórios e de reparação tecidual (Ohishi; Schipani, 2009).

Além dos fatores solúveis (citocinas e quimiocinas, por exemplo), as células-tronco mesenquimais produzem vesículas extracelulares, que compreendem os corpos apoptóticos (>1000 nm), microvesículas (100-1000 nm) e exossomos (30-200 nm) (Harrell *et al.*, 2019a e Harrell *et al.*, 2019b). Essas vesículas extracelulares (microvesículas e exossomos) possuem fatores parácrinos e podem contribuir com ações terapêuticas tanto quanto as próprias células-tronco mesenquimais, despertando seu interesse na medicina regenerativa (Cha *et al.*, 2018). Essas vesículas extracelulares possuem, em geral, tamanho inferior aos poros da membrana dos *inserts* que utilizamos (0,4 μ m = 400 nm), portanto, podem ter contribuído com os resultados encontrados em nossos experimentos, uma vez que fazem parte do secretoma das CTM.

Sabendo que a ação das CTM sobre as células leucêmicas poderia se dar por ação de vesículas extracelulares e citocinas, realizamos um *array* de citocinas nas coculturas entre as células K562 e Lucena cocultivadas com as CTM-LMA e CTM-HMO.

O array de citocinas (tabela 04) foi capaz de detectar a produção de 6 citocinas nas coculturas estudadas, apresentando padrões diferentes para as coculturas das células K562 e Lucena com as CTM-LMA e CTM-HMO. Para as células K562, observamos que as coculturas com CTM-HMO apresentaram um aumento significante na produção de CCL2/MCP-1, associado a redução na produção de IL-6 e IL-8 e uma manutenção nos níveis de CXCL12/SDF-1, MIF e Serpin E1/PAI-1, quando comparadas às coculturas com CTM-LMA. A linhagem Lucena cocultivada com CTM-HMO apresentou um aumento na produção de CCL2/MCP1, IL-6, IL-8 e Serpin E1/PAI-1, associado à redução de CCL2/MCP1, IL-6, IL-8 e Serpin E1/PAI-1, associado à redução da produção de CXCL12/SDF-1 e manutenção dos níveis de MIF, quando comparado à cocultura com CTM-LMA.

O CCL2/MCP-1 está relacionado ao crescimento, adesão, proliferação, sobrevivência e mobilidade celular, além da transdução de proteínas em diversas células (O'Hayre *et al.*, 2008). Além das várias funções do CCL2/MCP-1 nas células, sua expressão está associada à diversos fatores (Kumar; Boss, 2000). Níveis elevados de CCL2/MCP-1 são relacionados a um melhor prognóstico em alguns tipos de câncer, como por exemplo no melanoma (Gazzaniga *at al.*, 2007) e no câncer de pâncreas (MONTI *et al.*, 2003). Apesar das implicações do CCL2/MCP-1 nas leucemias não serem plenamente conhecidas (Macanas-Pirard *et al.*, 2017), alterações em sua produção nas células leucêmicas podem causar inibição da proliferação dessas células por alterações no ciclo celular com parada na fase G1, mediada pelo *CCND1* (Wu *et al.*, 2018).

O CXCL12/SDF-1 é uma citocina atuante na mobilização de células-tronco hematopoiéticas, no desenvolvimento fetal, na migração de linfócitos *naive*, sendo amplamente produzida em tecidos normais (Rossi; Zlotnik, 2000; Balkwill, 2004). Não encontramos diferença nos níveis de CXCL-12/SDF-1 entre as coculturas K562/CTM-LMA e K562/CTM-HMO, porém, encontramos diminuição dos níveis dessa citocina na cocultura Lucena/CTM-HMO quando comparada à cocultura Lucena/CTM-LMA. O CXCL12/SDF-1 é uma citocina que se liga ao receptor CXCR4 (*CXC chemokine receptor 4*), que é amplamente expresso em células leucêmicas e atua na promoção do crescimento, além de ter ação antiapoptótica nessas células (Cho; Kim; Konopleva, 2017). A diminuição da expressão dessa citocina pode, ainda, tornar as células leucêmicas mais sensíveis à quimioterapia por tirá-las de seu estado quiescente (Agarwal *et al.*, 2019).

A IL-6 é uma citocina inflamatória que exerce ação sobre diversos processos biológicos, inclusive sobre o câncer (Trikha *et al.*, 2003), além de ser amplamente produzida pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea (Kiselevskii *et al*, 2021). Em casos de câncer, a inibição da IL-6 pode promover a eliminação das células tumorais sensíveis, promovendo o estabelecimento de um nicho livre das células doentes. Porém, outros clones das células tumorais podem iniciar sua proliferação pela ação de outros fatores de crescimento (Rossi *et al.*, 2015). Por outro lado, a IL-6 parece estar envolvida com a indiferenciação das CTM, aumentando a proliferação e protegendo essas células da apoptose (Pricola *et al.*, 2009).

A IL-8 é, também, uma citocina inflamatória, que pode ser produzida pelas células-tronco mesenquimais da medula óssea mediante um estímulo inflamatório (Baggiolini; Clark-Lewis, 1992; Kiselevskii *et al*, 2021). Em casos de LMA, os exossomos produzidos pelas células leucêmicas podem estimular a produção de IL-8 pelas CTM da medula óssea, favorecendo, dessa forma, o desenvolvimento de resistência ao tratamento (Chen *et al.*, 2019).

Avaliando os resultados encontrados, observamos uma relação interessante entre as coculturas das células K562 e Lucena com as CTM-LMA e CTM-HMO. Houve uma diminuição dos níveis de IL-6 e IL-8 na cocultura K562/CTM-HMO em relação à cocultura K562/CTM-LMA, porém, houve um aumento nos níveis de IL-6 e IL-8 na cocultura Lucena/CTM-HMO em relação à cocultura Lucena/CTM-HMO em relação à cocultura Lucena/CTM-LMA. Wu e colaboradores (2020) demonstraram que os níveis de IL-6 e IL-8 estão aumentados em células de LMA resistentes, onde a IL-8 estaria ligada à proliferação e resistência dessas células e a IL-6 desempenharia papel importante na sobrevivência e também na resistência das células leucêmicas (Wu *et al.*, 2020). Dessa forma, visto que o secretoma das CTM desempenha um papel importante no microambiente das leucemias na medula óssea, podendo ser considerada um ponto chave na progressão dessa doença (Ma *et al.*, 2019), podemos supor que as CTM-HMO reagem de forma diferente na modulação da produção de citocinas quando em contato com células leucêmicas sensíveis (K562) ou resistentes (Lucena).

MIF é uma citocina constitutiva, ubíqua, multipotente e pró-inflamatória. Essa citocina é secretada por células envolvidas em diversos processos fisiológicos, inclusive na resposta imune (Sumaiya *et al.*, 2022). As CTM (Palumbo *et al.*, 2014) e as células K562 (Georgouli *et al.*, 2016) estão ente as células produtoras de MIF. MIF foi a única citocina que não apresentou alterações em seus níveis tanto nas coculturas das células K562 com CTM-LMA e CTM-HMO quanto para as coculturas de célula Lucena com CTM-LMA e CTM-HMO. Interessantemente, Xia e Hou (2018) demonstraram que MIF pode proteger e recuperar as CTM da senescência induzida pela doxorrubicina (Xia; Hou, 2018), enquanto Liu e colaboradores (2020) demonstraram a existência de MIF nos exossomos produzidos pelas CTM da medula óssea e que esses desempenham papel parácrino e atuam na sobrevivência e no rejuvenescimento das CTM (Liu *et al.*, 2020a). Esses achados justificam os níveis balanceados de MIF em nossas coculturas.

Serpin E1/PAI-1 é uma citocina envolvida negativamente com a sobrevida das CTM, se relacionando com a apoptose e desprendimento das CTM da matriz, (Copland *et al.*, 2009) e curiosamente, essa citocina teve seus níveis diminuídos na cocultura Lucena/CTM-LMA.

Existe uma modulação na produção de citocinas por parte das CTM da medula óssea durante o curso das leucemias, favorecendo a manutenção e progressão da doença (Sharma *et al.*, 2019). Nossos resultados demonstraram que ocorreu uma alteração significante nos perfis de produção de citocinas quando as células leucêmicas (K562 e Lucena) são cocultivadas com as CTM-HMO. Pôde-se observar, também, que esses perfis de produção de citocinas são diferentes para as células sensíveis (K562) e resistentes (Lucena), porém, favorecem, de alguma forma, o combate das células leucêmicas.

O fenótipo de resistência a múltiplas drogas das células tumorais está relacionado à função e regulação das proteínas ABC. A ativação dessas proteínas pode estar ligada a mudanças na atividade do sistema de proteção e no sinal de transdução envolvidos na regulação, proliferação, diferenciação e apoptose em diferentes tipos celulares. A resistência a múltiplas drogas é um mecanismo de proteção das células e a superfamília das proteínas do cassete de ligação de ATP (proteínas ABC) é composta por aproximadamente 300 proteínas transportadoras, onde os humanos expressam sete subfamílias dessas proteínas (Marques *et al.*, 2010).

Foi realizado um *array* da expressão gênica das proteínas ABC nas células Lucena/CTM-LMA (referência) e Lucena/CTM-HMO (amostra) (figura 9) para explorar a modulação na expressão dessas proteínas promovida nas células Lucena por ação das CTM. Dessa forma, observamos que ocorreu a hiperexpressão dos genes *ABCA1*, *ABCB11*, *ABCC11* e *ABCE1* e a inibição da expressão dos genes *ABCC3*, *ABCC9*, *ABCD3*, *ABCG4* das células Lucena/CTM-HMO comparados às células Lucena/CTM-LMA.

ABCA1, também conhecida como CERP (do termo em inglês *cholesterol efflux regulatory protein*) (Luciani *at al.*, 1994), atua como uma bomba, no efluxo de colesterol na via de remoção de lipídios celulares (Schmitz; Langmann, 2001). A

deficiência na expressão do gene *ABCA1* está ligada ao avanço de desordens mieloproliferativas (Viaud *et al.*, 2020), portanto, acreditamos que a hiperexpressão desse gene poderia contribuir para explicar os achados relacionados à inibição da proliferação das células leucêmicas (K562 e Lucena) quando em cocultura com as CTM-HMO.

ABCA11, também conhecida como BSEP (do termo em inglês *bile salt export pump*) ou sPgp (do termo em inglês *sister of P-glycoprotein*), é membro da subfamília *MDR/TAP*. A proteína codificada pelo gene *ABCA11* é a principal responsável pelo transporte de taurocolato e outros conjugados de colato, principalmente dos hepatócitos para a bile (Stieger *et al.*, 2007). A deficiência na expressão do gene *ABCA11* pode ser associada com casos de câncer hepático, porém, sem que a via específica seja conhecida (Wang et al., 2021). Portanto, como a deficiência nesse gene está ligada a casos de câncer hepático, acreditamos que a hiperexpressão desse gene poderia contribuir com a explicação para os achados encontrados quando as células leucêmicas (K562 e Lucena) foram cocultivadas com as CTM-HMO, como por exemplo na redução da proliferação e viabilidade dessa células.

ABCC11, também conhecida como MRP8 (do termo em inglês *multidrug resistance-related protein* 8) atua em processos fisiológicos envolvendo esteroides conjugados, ácidos biliares e nucleotídeos cíclicos (Pastor-Anglada *et al.*, 2004; Kruh *et al.*, 2007). O gene *ABCC11* está envolvido, no efluxo de drogas análogas a nucleotídeos (Guo *et al.*, 2003; Pastor-Anglada *et al.*, 2004) e na resistência à fluoropirimidina utilizada no tratamento da leucemia linfocítica crônica (Pastor-Anglada *et al.*, 2004). A hiperexpressão do gene *ABCC11* encontrada na cocultura Lucena/CTM-HMO pode estar relacionada com o aumento do efluxo de nucleotídeos da célula leucêmica, com possíveis implicações nas alterações observadas em seu ciclo celular.

ABCE1, também conhecida como RLI (do termo em inglês *RNase L inhibitor*), está envolvida em eventos biológicos como nas infecções virais, na proliferação celular, além de possuir ação antiapoptótica (Tian *et al.*, 2016). O gene *ABCE1* pode ter participação no desenvolvimento do fenótipo MDR nas células K562 resistentes à adriamicina (Wuxiao *et al.*, 2020). A hiperexpressão desse gene, encontrada na

cocultura Lucena/CTM-HMO, poderia estar ligada a uma tentativa da célula leucêmica se proteger da ação do secretoma das CTM-HMO.

ABCC3, também é conhecida como MRP3, ou ainda, como transportador de ânions orgânicos 3, sendo responsável pelo transporte de sais biliares (Hirohashi *et al.*, 2000) e pelo efluxo de algumas drogas como a doxorrubicina (Balaji *et al.*, 2016) e o etoposídeo (Lagas *et al.*, 2010). A hiperexpressão do gene *ABCC3* pode ser encontrada na crise blástica da LMC com recidiva (Radich *et al.*, 2006). Esse gene é um dos responsáveis pela falha no tratamento da LMC com o imatinibe, uma vez que ele promove o efluxo dessa droga (Giannoudis *et al.*, 2014). O gene *ABCC3* é considerado um alvo em potencial no tratamento de alguns tipos de câncer (Seborova *et al.*, 2021), portanto, sua inibição, encontrada na cocultura Lucena/CTM-HMO, provavelmente está relacionada com a perda da resistência das células Lucena frente ao secretoma das CTM-HMO, culminando nos efeitos de redução proliferação e viabilidade dessas células mencionados anteriormente.

ABCC9, também conhecida como SUR2 (do termo em inglês *sulfonylurea receptor* 2), é responsável pela formação de canais de potássio sensíveis ao ATP (Bryan *et al.*, 2007). O gene *ABCC9* é expresso por células leucêmicas CD34⁺/CD38⁻, porém, a frequência com que esse gene é detectado é muito pequena (De Grouw *et al.*, 2006). Como o gene *ABCC9* está relacionado aos canais de potássio sensíveis ao ATP, acreditamos que sua inibição nas células Lucena cocultivadas com CTM-HMO possa levar a uma alteração na expressão desses canais, resultando em um possível desbalanço eletrolítico dessas células, o que resultaria nos efeitos de redução proliferação e viabilidade mencionados anteriormente.

ABCD3 está envolvida no transporte de acil-CoA de cadeia ramificada em peroxissomos (Kawaguchi; Morita, 2016), podendo ainda ter participação na regulação da apoptose e do ciclo celular (Zhang *et al.* 2020). A expressão do gene *ABCD3* é inibida em pacientes com LMC tratados por 12 meses com nilotinibe (Trojani *et al.*, 2019), portanto, podemos supor que o secretoma das CTM-HMO atuou sobre as células Lucena inibindo a expressão desse gene, contribuindo para os resultados obtidos quanto a redução da proliferação e viabilidade das células leucêmicas, semelhante ao esperado no tratamento com nilotinibe.

ABCG4 participa no transporte de colesterol, oxisteróis e dos intermediários da síntese do colesterol (Yang *et al.*, 2021). O gene *ABCG4* está relacionado à resistência a certas drogas, provavelmente por promover alterações no pH ao redor das células tumorais (Zhang *et al.*, 2008). Como o gene *ABCG4* também está relacionado à resistência a certas drogas, sua inibição, conforme observamos na cocultura Lucena/CTM-HMO, pode favorecer a diminuição da proliferação e viabilidade das células Lucena frente à ação do secretoma das CTM-HMO.

Além da expressão das proteínas ABC, avaliamos a expressão gênica das ciclinas D1 e D2 (*CCND1* e *CCND2*) pelas células K562 e Lucena cocultivadas com CTM-LMA e CTM-HMO (figura 10). Observamos aumento da expressão de *CCND1* nas células Lucena cocultivadas com CTM-HMO e a inibição de *CCND2* nas células K562 cocultivadas com CTM-LMA.

As células humanas expressam 3 tipos de ciclinas: *CCND1*, *CCND2* e *CCND3*, responsáveis pela regulação das quinases dependentes de ciclina 4 e 6 (CDK4 e CDK6), sendo, dessa forma, intimamente ligadas ao controle da progressão da fase G1 à fase S do ciclo celular (Poon, 2016; Qie; Diehl, 2016).

A hiperexpressão de *CCND1* pode promover a interrupção da proliferação celular (Wilhide *et al.*, 1995), portanto, poderia justificar os resultados encontrados quanto à diminuição da proliferação das células Lucena quando cocultivadas com CTM-HMO. Por outro lado, a hiperexpressão de *CCND2* pode ser associada a um aumento da proliferação das células leucêmicas (Song *et al.*, 2004), portanto, sua inibição justificaria a diminuição da proliferação dessas células (Chen *et al.*, 2012).

Esses achados nos fazem supor que embora haja a diminuição da proliferação das células K562 e Lucena quando cocultivadas com as CTM-HMO, os mecanismos envolvidos são diferentes entre as células sensíveis (K562) e resistentes (Lucena), porém, ambos afetando o ciclo celular.

O ciclo celular é composto por um conjunto de fases ao qual uma célula passa para sua duplicação. Ele está dividido em 4 fases, sendo elas:

 G1: fase em que a célula acumula os nutrientes necessários para a replicação do DNA (primeiro "gap");

- 2. S: fase em que ocorre a replicação do DNA;
- G2: fase essencial para garantir a precisa replicação do DNA (segundo "gap");
- 4. M: fase em que ocorre a segregação do DNA e a divisão celular.

Existe também a fase G0, uma fase não cíclica, porém reversível. Nessa fase as células estão em estado quiescente, ocorrendo principalmente após a mitose ou em estados de diferenciação terminal (Schafer, 1998; Sherr *et al.*, 2016; Wenzel; Singh, 2018).

Há no ciclo celular os chamados "*checkpoints*", responsáveis por evitar a replicação de células com alguma falha na duplicação do DNA. Esses "*checkpoints*" estão presentes nas fases G1/S, G2/M e metáfase/anáfase, sendo regulados pelos complexos das ciclinas-CDK (Murray, 1994; Wenzel; Singh, 2018).

Observamos em nossos experimentos que houve um aumento da fase G0/G1 e diminuição da fase S nas células K562 e Lucena quando cocultivadas com as CTM-HMO (figura 10), podendo esses achados serem relacionados à diminuição da proliferação e viabilidade das células leucêmicas nessa condição de cocultura. Outros estudos utilizando células leucêmicas corroboram que a parada do ciclo celular na fase G0/G1 pode apresentar ação antitumoral, como por exemplo os promovidos pelos derivados da 2,4-dinitrobenzenesulfonamida sobre células de leucemia aguda (Alves Almeida *et al.*, 2021), do TH-39 sobre células K562 (ZHU *et al.*, 2016), Mere-15 sobre célula K562 (Liu *et al.*, 2012) e tio-CI-IB-MECA sobre células de leucemia promielocítica humana HL-60 (Lee *et al.*, 2005). Da mesma forma, o aumento da fase G2/M das células K562 cocultivadas com CTM-HMO pode estar envolvido com o aumento da apoptose dessas células, assim como reportado por Liu e colaboradores (2019) com os testes do fármaco LW-213 sobre células K562 (Liu *et al.*, 2020b).

Observamos também que as células Lucena quando cocultivadas com CTM-LMA têm redução da sua fase G0/G1, com aumento acentuado de fase S e manutenção da fase G2/M, mostrando que de certa forma o secretoma das CTM-LMA parece promover a proteção e a proliferação das células leucêmicas.

Estima-se que a concentração de CTMs na medula óssea seja de 1 em 10.000 células nucleadas (Williams; Hare, 2011), no entanto, utilizamos na condução

dos experimentos dessa tese uma proporção inicial de 1 CTM para 5 células leucêmicas (K562 ou Lucena). Embora essa não seja uma condição encontrada fisiologicamente, ela se justifica na proposição de terapias utilizando o secretoma das CTM. Essa proposição se dá pelo fato que uma linhagem de CTM produtora de secretoma combatente às leucemias poderia ser selecionada, isolada e cultivada em laboratório. O secretoma dessas células poderia ser purificado, sendo então utilizado no tratamento de leucemias, outras doenças hematológicas e possivelmente outros tipos de câncer.

7. CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

O secretoma produzido pelas CTM-HMO foi capaz de diminuir a proliferação de células K562 (sensíveis à quimioterapia) e Lucena (resistentes à quimioterapia), associado à diminuição da viabilidade dessas células pelo aumento dos índices de apoptose, necrose e ativação de caspases 3/7. A ação do secretoma das CTM-HMO foi capaz, também, de promover alterações nos perfis de produção de citocinas e modular a expressão das ciclinas D1 e D2 e proteínas ABC nessas células, além de implicar em alterações em seu ciclo celular. Porém, o mesmo não foi observado quando as células leucêmicas foram cocultivadas com as CTM-LMA.

Nossos achados demonstram que as CTM-LMA perdem a capacidade de combater as células leucêmicas, tornando-se permissivas ao seu desenvolvimento. No entanto, as CTM-HMO combatem as células leucêmicas K562 e Lucena com a mesma eficiência, mostrando que mesmo as células resistentes podem ser afetadas por sua ação.

O secretoma produzido pelas CTM de doadores saudáveis tem grande potencial para ser explorado como uma terapia auxiliar no tratamento das leucemias. A imortalização de linhagens de CTM produtoras de secretoma ativo e sua exploração comercial em prol da saúde pública pode ser considerada.

8. TRABALHOS PUBLICADOS

8. TRABALHOS PUBLICADOS

de Freitas FA, Levy D, Reichert CO, Cunha-Neto E, Kalil J, Bydlowski SP. Effects of Oxysterols on Immune Cells and Related Diseases. Cells. 2022;11(8):1251. doi: 10.3390/cells11081251.

de Freitas FA, Levy D, Zarrouk A, Lizard G, Bydlowski SP. Impact of Oxysterols on Cell Death, Proliferation, and Differentiation Induction: Current Status. Cells. 2021;10(9):2301. doi: 10.3390/cells10092301.

Reichert CO, **de Freitas FA**, Levy D, Bydlowski SP. Oxysterols and mesenchymal stem cell biology. Vitam Horm. 2021;116:409-436. doi: 10.1016/bs.vh.2021.02.004.

Reichert CO, **de Freitas FA**, Sampaio-Silva J, Rokita-Rosa L, Barros PL, Levy D, Bydlowski SP. Ferroptosis Mechanisms Involved in Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci. 2020;21(22):8765. doi: 10.3390/ijms21228765.

Paz JL, Levy D, Oliveira BA, de Melo TC, **de Freitas FA**, Reichert CO, Rodrigues A, Pereira J, Bydlowski SP. 7-Ketocholesterol Promotes Oxiapoptophagy in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell from Patients with Acute Myeloid Leukemia. Cells. 2019;8(5):482. doi: 10.3390/cells8050482.

Levy D, de Melo TC, Oliveira BA, Paz JL, **de Freitas FA**, Reichert CO, Rodrigues A, Bydlowski SP. 7-Ketocholesterol and cholestane-triol increase expression of SMO and LXRα signaling pathways in a human breast cancer cell line. Biochem Biophys Rep. 2018;19:100604. doi: 10.1016/j.bbrep.2018.12.008.

9. REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS¹

Adamska A, Falasca M. ATP-binding cassette transporters in progression and clinical outcome of pancreatic cancer: What is the way forward? World J Gastroenterol. 2018;24(29):3222-3238. doi: 10.3748/wjg.v24.i29.3222.

Afanasyev BV, Elstner EE, Zander ARA. J. Friedenstein, founder of the mesenchymal stem cell concept. Cell Ther Transplant. 2009;1(3):35-38. doi: 10.3205/ctt-2009-en-000029.01.

Agarwal P, Isringhausen S, Li H, Paterson AJ, He J, Gomariz Á, Nagasawa T, Nombela-Arrieta C, Bhatia R. Mesenchymal Niche-Specific Expression of Cxcl12 Controls Quiescence of Treatment-Resistant Leukemia Stem Cells. Cell Stem Cell. 2019;24(5):769-784.e6. doi: 10.1016/j.stem.2019.02.018. Erratum in: Cell Stem Cell. 2020;26(1):123.

Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA. An introduction to stem cells. J Pathol. 2002;197(4):419-23. doi: 10.1002/path.1187.

Alvarado-Velez M, Enam SF, Mehta N, Lyon JG, LaPlaca MC, Bellamkonda RV. Immuno-suppressive hydrogels enhance allogeneic MSC survival after transplantation in the injured brain. Biomaterials. 2021;266:120419. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120419.

Alves Almeida P, Schmitz de Souza LF, Franzoni Maioral M, Otto Walter L, Fischer Duarte B, Mattos Santos-Pirath Í, Bauer Speer D, Sens L, Tizziani T, Sena de Oliveira A, Nunes RJ, Santos-Silva MC. Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction by a New 2,4-Dinitrobenzenesulfonamide Derivative In Acute Leukemia Cells. J Pharm Pharm Sci. 2021;24:23-36. doi: 10.18433/jpps31349.

American Cancer Society. Cancer A-Z, Acute Myeloid Leukemia (AML) in adults, Early detection, diagnosis, and types, Types of AML, Acute Myeloid Leukemia (AML) Subtypes and Prognostic Factors. [Internet] última atualização 21 de agosto de 2018 [citado em 30 de dezembro de 2020]. Disponível em:

¹ De acordo com estilo Vancouver.

https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosisstaging/how-classified.html.

Anreddy N, Gupta P, Kathawala RJ, Patel A, Wurpel JN, Chen ZS. Tyrosine kinase inhibitors as reversal agents for ABC transporter mediated drug resistance. Molecules. 2014;19(9):13848-77. doi: 10.3390/molecules190913848.

Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405. doi: 10.1182/blood-2016-03-643544. Epub 2016 Apr 11.

ATCC. American Type Culture Collection [Internet]. Home, Cell Products, Human Cells, CCL-243, Quality control specifications [citado em 20 de julho de 2022]. Disponível em: <u>https://www.atcc.org/products/ccl-243#specifications</u>.

Atoui R, Chiu RC. Concise review: immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells in cellular transplantation: update, controversies, and unknowns. Stem Cells Transl Med. 2012;1(3):200-5. doi: 10.5966/sctm.2011-0012.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. FEBS Lett. 1992;307(1):97-101. doi: 10.1016/0014-5793(92)80909-z.

Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. J Tissue Eng Regen Med. 2008;2(4):169-83. doi: 10.1002/term.83.

Balaji SA, Udupa N, Chamallamudi MR, Gupta V, Rangarajan A. Role of the Drug Transporter ABCC3 in Breast Cancer Chemoresistance. PLoS One. 2016;11(5):e0155013. doi: 10.1371/journal.pone.0155013.

Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptorCXCR4.SeminCancerBiol.2004;14(3):171-9.doi: 10.1016/j.semcancer.2003.10.003.

BCRJ. Banco de células do Rio de Janeiro [Internet]. Home, k562-leukemia-human, Clique aqui para fazer o download do PDF [citado em 02 de fevereiro de 2020]. Disponível em: <u>http://bcrj.org.br/enupalsnapshot/K-562.pdf</u>.^(a)

BCRJ. Banco de células do Rio de Janeiro [Internet]. Home, k562-lucena-leukemiahuman, Clique aqui para fazer o download do PDF [citado em 02 de fevereiro de 2020]. Disponível em: <u>http://bcrj.org.br/enupalsnapshot/K-562%20LUCENA.pdf</u>.^(b)

Biggs JR, Zhang D-E. Chapter 16 - Molecular Basis of Lymphoid and Myeloid Diseases. In: Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. Essential Concepts in Molecular Pathology. San Diego: Academic Press; 2010. p. 189-203.

Bispo JAB, Pinheiro PS, Kobetz EK. Epidemiology and Etiology of Leukemia and Lymphoma. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020;10(6):a034819. doi: 10.1101/cshperspect.a034819.

Bollmann PW, Giglio AD. Chronic myeloid leukemia: past, present, future. Einstein (Sao Paulo). 2011;9(2):236-43. English, Portuguese. doi: 10.1590/S1679-45082011RB2022.

Borella G, Da Ros A, Borile G, Porcù E, Tregnago C, Benetton M, Marchetti A, Bisio V, Montini B, Michielotto B, Cani A, Leszl A, Campodoni E, Sandri M, Montesi M, Bresolin S, Cairo S, Buldini B, Locatelli F, Pigazzi M. Targeting the plasticity of mesenchymal stromal cells to reroute the course of acute myeloid leukemia. Blood. 2021;138(7):557-570. doi: 10.1182/blood.2020009845.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2015.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2017.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2019.

Bryan J, Muñoz A, Zhang X, Düfer M, Drews G, Krippeit-Drews P, Aguilar-Bryan L. ABCC8 and ABCC9: ABC transporters that regulate K+ channels. Pflugers Arch. 2007;453(5):703-718. doi: 10.1007/s00424-006-0116-z.

Calabretta B, Perrotti D. The biology of CML blast crisis. Blood. 2004;103(11):4010-22. doi: 10.1182/blood-2003-12-4111.

Cancer Research UK. Home, Health professional, Data and Statistics, Cancer Statistics, Worldwide cancer statistics [Internet] [citado em 15 de fevereiro de 2020]. Disponível em: <u>http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer#heading-Zero</u>.

Carrett-Dias M, Almeida LK, Pereira JL, Almeida DV, Filgueira DM, Marins LF, Votto AP, Trindade GS. Cell differentiation and the multiple drug resistance phenotype in human erythroleukemic cells. Leuk Res. 2016;42:13-20. doi: 10.1016/j.leukres.2016.01.008.

CDC. Center for Disease Control and Prevention. CDC, Cancer Home, Leukemia [Internet] [citado em 05 de janeiro de 2018]. Disponível em: <u>http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.3322/caac.21387/full</u>.

Cha JM, Shin EK, Sung JH, Moon GJ, Kim EH, Cho YH, Park HD, Bae H, Kim J, Bang OY. Efficient scalable production of therapeutic microvesicles derived from human mesenchymal stem cells. Sci Rep. 2018;8(1):1171. doi: 10.1038/s41598-018-19211-6.

Chandran P, Le Y, Li Y, Sabloff M, Mehic J, Rosu-Myles M, Allan DS. Mesenchymal stromal cells from patients with acute myeloid leukemia have altered capacity to expand differentiated hematopoietic progenitors. Leuk Res. 2015;39(4):486-493. doi: 10.1016/j.leukres.2015.01.013.

Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. Hum Gene Ther. 2010;21(9):1045-56. doi: 10.1089/hum.2010.115.

Chen BB, Glasser JR, Coon TA, Zou C, Miller HL, Fenton M, McDyer JF, Boyiadzis M, Mallampalli RK. F-box protein FBXL2 targets cyclin D2 for ubiquitination and degradation to inhibit leukemic cell proliferation. Blood. 2012;119(13):3132-3141. doi: 10.1182/blood-2011-06-358911.

Chen T, Zhang G, Kong L, Xu S, Wang Y, Dong M. Leukemia-derived exosomes induced IL-8 production in bone marrow stromal cells to protect the leukemia cells against chemotherapy. Life Sci. 2019;221:187-195. doi: 10.1016/j.lfs.2019.02.003.

Cho BS, Kim HJ, Konopleva M. Targeting the CXCL12/CXCR4 axis in acute myeloid leukemia: from bench to bedside. Korean J Intern Med. 2017;32(2):248-257. doi: 10.3904/kjim.2016.244.

Conforti A, Biagini S, Del Bufalo F, Sirleto P, Angioni A, Starc N, Li Pira G, Moretta F, Proia A, Contoli B, Genovese S, Ciardi C, Avanzini MA, Rosti V, Lo-Coco F, Locatelli F, Bernardo ME. Biological, functional and genetic characterization of bone marrowderived mesenchymal stromal cells from pediatric patients affected by acute lymphoblastic leukemia. PLoS One. 2013;8(11):e76989. doi: 10.1371/journal.pone.0076989.

Copland IB, Lord-Dufour S, Cuerquis J, Coutu DL, Annabi B, Wang E, Galipeau J. Improved autograft survival of mesenchymal stromal cells by plasminogen activator inhibitor 1 inhibition. Stem Cells. 2009;27(2):467-477. doi: 10.1634/stemcells.2008-0520.

Daflon-Yunes N, Pinto-Silva FE, Vidal RS, Novis BF, Berguetti T, Lopes RR, Polycarpo C, Rumjanek VM. Characterization of a multidrug-resistant chronic myeloid leukemia cell line presenting multiple resistance mechanisms. Mol Cell Biochem. 2013;383(1-2):123-135. doi: 10.1007/s11010-013-1761-0.

De Grouw EP, Raaijmakers MH, Boezeman JB, van der Reijden BA, van de Locht LT, de Witte TJ, Jansen JH, Raymakers RA. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38- cells. Leukemia. 2006;20(4):750-754. doi: 10.1038/sj.leu.2404131.

Delgado NF, Levy D, Bydlowski SP, Ruiz JLM. Interação das Células troncos Mesenquinais humanas e seus derivados sobre células tumorais de origem Hematológico in vitro. Rev. Bras. de Iniciação Científica (RBIC), 2018;5(2):124-139. Edição Especial Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). Disponível em: https://periodicos.itp.ifsp.edu.br/index.php/IC/article/view/1213.
Diaz De La Guardia R, Lopez-Millan B, Lavoie JR, Bueno C, Castaño J, Gómez-Casares M, Vives S, Palomo L, Juan M, Delgado J, Blanco ML, Nomdedeu J, Chaparro A, Fuster JL, Anguita E, Rosu-Myles M, Menéndez P. Detailed Characterization of Mesenchymal Stem/Stromal Cells from a Large Cohort of AML Patients Demonstrates a Definitive Link to Treatment Outcomes. Stem Cell Reports. 2017;8(6):1573-1586. doi: 10.1016/j.stemcr.2017.04.019.

Ding AX, Sun G, Argaw YG, Wong JO, Easwaran S, Montell DJ. CasExpress reveals widespread and diverse patterns of cell survival of caspase-3 activation during development in vivo. eLife. 2016;5:e10936. doi: 10.7554/eLife.10936.

Du Y, Chen B. Detection approaches for multidrug resistance genes of leukemia. Drug Des Devel Ther. 2017;11:1255-1261. doi: 10.2147/DDDT.S134529.

El-Awady R, Saleh E, Hashim A, Soliman N, Dallah A, Elrasheed A, Elakraa G. The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. Front Pharmacol. 2017;7:535. doi: 10.3389/fphar.2016.00535.

EMADI, A.; LAW, J.Y. Manual MSD. Profissional, hematologia e oncologia, leucemia, leucemia mieloide crônica (LMC). [Internet] última atualização em dezembro de 2018 [citado em 08 de janeiro de 2021]. Disponível em: <u>https://www.msdmanuals.com/pt-pt/profissional/hematologia-e-oncologia/leucemia/leucemia-mieloide-cr%C3%B4nica-lmc</u>.

Ferrara F. New agents for acute myeloid leukemia: is it time for targeted therapies? Expert Opin Investig Drugs. 2012;21(2):179-89. doi: 10.1517/13543784.2012.646082.

Fiegl M. Epidemiology, pathogenesis, and etiology of acute leukemia. In: Hiddemann W, editor. Handbook of Acute Leukemia. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 3-13.

Fonseka M, Ramasamy R, Tan BC, Seow HF. Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells (hUCB-MSC) inhibit the proliferation of K562 (human erythromyeloblastoid leukaemic cell line). Cell Biol Int. 2012;36(9):793-801. doi: 10.1042/CBI20110595.

Freireich EJ, Wiernik PH, Steensma DP. The leukemias: a half-century of discovery. J Clin Oncol. 2014;32(31):3463-3469. doi: 10.1200/JCO.2014.57.1034.

Furtado VF, Santos GR, de Carvalho DS, Staziaki PV, Pasquini R, Funke VA. Accelerated phase chronic myeloid leukemia: evaluation of clinical criteria as predictors of survival, major cytogenetic response and progression to blast phase. Rev Bras Hematol Hemoter. 2015;37(5):341-347. doi: 10.1016/j.bjhh.2015.07.004.

Gazzaniga S, Bravo AI, Guglielmotti A, van Rooijen N, Maschi F, Vecchi A, Mantovani A, Mordoh J, Wainstok R. Targeting tumor-associated macrophages and inhibition of MCP-1 reduce angiogenesis and tumor growth in a human melanoma xenograft. J Invest Dermatol. 2007;127(8):2031-2041. doi: 10.1038/sj.jid.5700827.

Georgouli M, Papadimitriou L, Glymenaki M, Patsaki V, Athanassakis I. Expression of MIF and CD74 in leukemic cell lines: correlation to DR expression destiny. Biol Chem. 2016;397(6):519-528. doi: 10.1515/hsz-2015-0280.

Geyh S, Rodríguez-Paredes M, Jäger P, Khandanpour C, Cadeddu RP, Gutekunst J, Wilk CM, Fenk R, Zilkens C, Hermsen D, Germing U, Kobbe G, Lyko F, Haas R, Schroeder T. Functional inhibition of mesenchymal stromal cells in acute myeloid leukemia. Leukemia. 2016;30(3):683-391. doi: 10.1038/leu.2015.325.

Giannoudis A, Davies A, Harris RJ, Lucas CM, Pirmohamed M, Clark RE. The clinical significance of ABCC3 as an imatinib transporter in chronic myeloid leukaemia. Leukemia. 2014;28(6):1360-1363. doi: 10.1038/leu.2014.38.

Guo Y, Kotova E, Chen ZS, Lee K, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Kruh GD. MRP8, ATP-binding cassette C11 (ABCC11), is a cyclic nucleotide efflux pump and a resistance factor for fluoropyrimidines 2',3'-dideoxycytidine and 9'-(2'-phosphonylmethoxyethyl)adenine. J Biol Chem. 2003;278(32):29509-29514. doi: 10.1074/jbc.M304059200.

Gurusamy N, Alsayari A, Rajasingh S, Rajasingh J. Adult Stem Cells for Regenerative Therapy. Prog Mol Biol Transl Sci. 2018;160:1-22. doi: 10.1016/bs.pmbts.2018.07.009. Harrell CR, Fellabaum C, Jovicic N, Djonov V, Arsenijevic N, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Secretome. Cells. 2019;8(5):467. doi: 10.3390/cells8050467.^(b)

Harrell CR, Jankovic MG, Fellabaum C, Volarevic A, Djonov V, Arsenijevic A, Volarevic V. Molecular Mechanisms Responsible for Anti-inflammatory and Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cell-Derived Factors. Adv Exp Med Biol. 2019;1084:187-206. doi: 10.1007/5584_2018_306.^(a)

Hehlmann R, Voskanyan A, Lauseker M, Pfirrmann M, Kalmanti L, Rinaldetti S, Kohlbrenner K, Haferlach C, Schlegelberger B, Fabarius A, Seifarth W, Spieß B, Wuchter P, Krause S, Kolb HJ, Neubauer A, Hossfeld DK, Nerl C, Gratwohl A, Baerlocher GM, Burchert A, Brümmendorf TH, Hasford J, Hochhaus A, Saußele S, Baccarani M; SAKK and the German CML Study Group. High-risk additional chromosomal abnormalities at low blast counts herald death by CML. Leukemia. 2020;34(8):2074-2086. doi: 10.1038/s41375-020-0826-9. Erratum in: Leukemia. 2020;34(10):2823.

Hehlmann R. How I treat CML blast crisis. Blood. 2012;120(4):737-747. doi: 10.1182/blood-2012-03-380147.

Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. Nature. 1985;315(6022):758-761. doi: 10.1038/315758a0.

Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H, Sugiyama Y. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). J Biol Chem. 2000;275(4):2905-2910. doi: 10.1074/jbc.275.4.2905.

Hmadcha A, Martin-Montalvo A, Gauthier BR, Soria B, Capilla-Gonzalez V. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Cancer Therapy. Front Bioeng Biotechnol. 2020;8:43. doi: 10.3389/fbioe.2020.00043.

Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, Mahon FX, Janssen JJWM, Hjorth-Hansen H, Richter J, Buske C; ESMO Guidelines Committee. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol.

2017;28(suppl_4):iv41-iv51. doi: 10.1093/annonc/mdx219. Erratum in: Ann Oncol. 2018;29(Suppl 4):iv261. Erratum in: Ann Oncol. 2018;29 Suppl 4:iv261.

Huwaikem MAH, Kalamegam G, Alrefaei G, Ahmed F, Kadam R, Qadah T, Sait KHW, Pushparaj PN. Human Wharton's Jelly Stem Cell Secretions Inhibit Human Leukemic Cell Line K562 in vitro by Inducing Cell Cycle Arrest and Apoptosis. Front Cell Dev Biol. 2021;9:614988. doi: 10.3389/fcell.2021.614988.

ISSCR. International Society for Stem Cell Research. A Closer Look At Stem Cells, Learn About Stem Cells, Types of Stem Cells [Internet] [acesso em 15 de fevereiro de 2020]. Dispónível em: <u>http://www.closerlookatstemcells.org/learn-about-stem-cells/types-of-stem-cells</u>.

ISSCR. International Society for Stem Cell Research. Stem Cell Facts [Intenet] [acesso em 04 de janeiro de 2018]. Dispónível em: <u>http://www.closerlookatstemcells.org/docs/default-source/patient-resources/stem-cell-facts.pdf?sfvrsn=4</u>.

Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. Am J Hematol. 2016;91(2):252-265. doi: 10.1002/ajh.24275.

Jafarzadeh N, Safari Z, Pornour M, Amirizadeh N, Forouzandeh Moghadam M, Sadeghizadeh M. Alteration of cellular and immune-related properties of bone marrow mesenchymal stem cells and macrophages by K562 chronic myeloid leukemia cell derived exosomes. J Cell Physiol. 2019;234(4):3697-3710. doi: 10.1002/jcp.27142.

Janjetovic S, Asemissen AM, Dicker F, Binder M, Dierlamm J, Bokemeyer C, Schafhausen P. Fulminant blast crisis with de novo 11q23 rearrangement in a Philadelphia-positive CML patient undergoing treatment with dasatinib. Tumori. 2019;105(6):NP8-NP11. doi: 10.1177/0300891619839473.

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin. 2011;61(2):69-90. doi: 10.3322/caac.20107. Erratum in: CA Cancer J Clin. 2011;61(2):134.

Juliusson G, Hough R. Leukemia. Prog Tumor Res. 2016;43:87-100. doi: 10.1159/000447076.

Kampen KR. The discovery and early understanding of leukemia. Leuk Res. 2012;36(1):6-13. doi: 10.1016/j.leukres.2011.09.028.

Kawaguchi K, Morita M. ABC Transporter Subfamily D: Distinct Differences in Behavior between ABCD1-3 and ABCD4 in Subcellular Localization, Function, and Human Disease. Biomed Res Int. 2016;2016:6786245. doi: 10.1155/2016/6786245.

Kiselevskii MV, Vlasenko RY, Stepanyan NG, Shubina IZ, Sitdikova SM, Kirgizov KI, Varfolomeeva SR. Secretome of Mesenchymal Bone Marrow Stem Cells: Is It Immunosuppressive or Proinflammatory? Bull Exp Biol Med. 2021;172(2):250-253. doi: 10.1007/s10517-021-05371-5.

Kruh GD, Guo Y, Hopper-Borge E, Belinsky MG, Chen ZS. ABCC10, ABCC11, and ABCC12. Pflugers Arch. 2007;453(5):675-684. doi: 10.1007/s00424-006-0114-1.

Kumar SN, Boss JM. Site A of the MCP-1 distal regulatory region functions as a transcriptional modulator through the transcription factor NF1. Mol Immunol. 2000;37(11):623-632. doi: 10.1016/s0161-5890(00)00097-3.

Lagas JS, Fan L, Wagenaar E, Vlaming ML, van Tellingen O, Beijnen JH, Schinkel AH. P-glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide. Clin Cancer Res. 2010;16(1):130-140. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1321.

Le Y, Fraineau S, Chandran P, Sabloff M, Brand M, Lavoie JR, Gagne R, Rosu-Myles M, Yauk CL, Richardson RB, Allan DS. Adipogenic Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow and Their Hematopoietic Supportive Role: Towards Understanding the Permissive Marrow Microenvironment in Acute Myeloid Leukemia. Stem Cell Rev Rep. 2016;12(2):235-244. doi: 10.1007/s12015-015-9639-z.

Lee EJ, Min HY, Chung HJ, Park EJ, Shin DH, Jeong LS, Lee SK. A novel adenosine analog, thio-CI-IB-MECA, induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. Biochem Pharmacol. 2005;70(6):918-924. doi: 10.1016/j.bcp.2005.06.017.

Lee KD. Applications of mesenchymal stem cells: an updated review. Chang Gung Med J. 2008;31(3):228-236.

Liu K, Hu J, Wang X, Li L. Chronic myeloid leukemia blast crisis presented with AML of t(9;22) and t(3;14) mimicking acute lymphocytic leukemia. J Clin Lab Anal. 2019;33(8):e22961. doi: 10.1002/jcla.22961.

Liu M, Zhao X, Zhao J, Xiao L, Liu H, Wang C, Cheng L, Wu N, Lin X. Induction of apoptosis, G_0/G_1 phase arrest and microtubule disassembly in K562 leukemia cells by Mere15, a novel polypeptide from Meretrix meretrix Linnaeus. Mar Drugs. 2012;10(11):2596-2607. doi: 10.3390/md10112596.

Liu X, Hu P, Li H, Yu XX, Wang XY, Qing YJ, Wang ZY, Wang HZ, Zhu MY, Guo QL, Hui H. LW-213, a newly synthesized flavonoid, induces G2/M phase arrest and apoptosis in chronic myeloid leukemia. Acta Pharmacol Sin. 2020;41(2):249-259. doi: 10.1038/s41401-019-0270-4.^(b)

Liu X, Li X, Zhu W, Zhang Y, Hong Y, Liang X, Fan B, Zhao H, He H, Zhang F. Exosomes from mesenchymal stem cells overexpressing MIF enhance myocardial repair. J Cell Physiol. 2020;235(11):8010-8022. doi: 10.1002/jcp.29456.^(a)

LLS. Leukemia and Lymphoma Society. Facts and Statistics [Internet] [citado em 05 de janeiro de 2018]. Disponível em: <u>https://www.lls.org/http%3A/llsorg.prod.acquia-sites.com/facts-and-statistics/facts-and-statistics-overview/facts-and-statistics.</u>

Lozzio BB, Lozzio CB. Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. Leuk Res. 1979;3(6):363-370. doi: 10.1016/0145-2126(79)90033-x.

Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. Blood. 1975;45(3):321-334.

Luciani MF, Denizot F, Savary S, Mattei MG, Chimini G. Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9. Genomics. 1994;21(1):150-159. doi: 10.1006/geno.1994.1237.

Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY. Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. Stem Cells. 2014;32(6):1408-1419. doi: 10.1002/stem.1681.

Ma Z, Zhao X, Deng M, Huang Z, Wang J, Wu Y, Cui D, Liu Y, Liu R, Ouyang G. Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell-Derived Periostin Promotes B-ALL Progression by Modulating CCL2 in Leukemia Cells. Cell Rep. 2019;26(6):1533-1543.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.01.034.

Macanas-Pirard P, Quezada T, Navarrete L, Broekhuizen R, Leisewitz A, Nervi B, Ramírez PA. The CCL2/CCR2 Axis Affects Transmigration and Proliferation but Not Resistance to Chemotherapy of Acute Myeloid Leukemia Cells. PLoS One. 2017;12(1):e0168888. doi: 10.1371/journal.pone.0168888.

Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. J Biomed Sci. 2003;10(2):228-241. doi: 10.1007/BF02256058.

Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipek C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. N Engl J Med. 2009;361(11):1058-1066. doi: 10.1056/NEJMoa0903840.

Maria Ruiz JL, Levy D, Bydlowski SP. Mesencchymal Stem Cells: Sources and Properties in Regenerative Medicine. J Hematol Transfus. 2014;2(3):1029.

Marques DS, Sandrini JZ, Boyle RT, Marins LF, Trindade GS. Relationships between multidrug resistance (MDR) and stem cell markers in human chronic myeloid leukemia cell lines. Leuk Res. 2010;34(6):757-762. doi: 10.1016/j.leukres.2009.11.004.

Martins LM, Mesner PW, Kottke TJ, Basi GS, Sinha S, Tung JS, Svingen PA, Madden BJ, Takahashi A, McCormick DJ, Earnshaw WC, Kaufmann SH. Comparison of

caspase activation and subcellular localization in HL-60 and K562 cells undergoing etoposide-induced apoptosis. Blood. 1997;90(11):4283-4296.

Monti P, Leone BE, Marchesi F, Balzano G, Zerbi A, Scaltrini F, Pasquali C, Calori G, Pessi F, Sperti C, Di Carlo V, Allavena P, Piemonti L. The CC chemokine MCP-1/CCL2 in pancreatic cancer progression: regulation of expression and potential mechanisms of antimalignant activity. Cancer Res. 2003;63(21):7451-61.

Moreira MA, Bagni C, de Pinho MB, Mac-Cormick TM, dos Santos Mota M, Pinto-Silva FE, Daflon-Yunes N, Rumjanek VM. Changes in gene expression profile in two multidrug resistant cell lines derived from a same drug sensitive cell line. Leuk Res. 2014;38(8):983-987. doi: 10.1016/j.leukres.2014.06.001.

Murray A. Cell cycle checkpoints. Curr Opin Cell Biol. 1994;6(6):872-876. doi: 10.1016/0955-0674(94)90059-0.

Narang V, Sachdeva MUS, Bose P, Varma N, Malhotra P, Varma S. Immunophenotyping in chronic myeloid leukemia blast crisis: looking beyond morphology. Journal of Postgraduate Medicine, Education and Research, October-December 2016;50(4):181-184.

Nasef A, Ashammakhi N, Fouillard L. Immunomodulatory effect of mesenchymal stromal cells: possible mechanisms. Regen Med. 2008 Jul;3(4):531-546. doi: 10.2217/17460751.3.4.531.

NIH. U.S. National Institutes of Health. Home, General Information, Stem Cell Basics, Stem Cell Basics I [Internet] [citado em15 de fevereiro de 2020]. Disponível em: https://stemcells.nih.gov/info/basics/1.htm.

NIH. U.S. National Institutes of Health. Home, Introduction to Stem Cells, Stem Cell Basics [Internet] [citado em 12 de julho de 2022]. Disponível em: https://stemcells.nih.gov/info/basics/stc-basics/#stc-I.

O'Hayre M, Salanga CL, Handel TM, Allen SJ. Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment. Biochem J. 2008;409(3):635-649. doi: 10.1042/BJ20071493.

Ohishi M, Schipani E. Bone marrow mesenchymal stem cells. J Cell Biochem. 2009;109(2):277-282. doi: 10.1002/jcb.22399.

Palumbo S, Tsai TL, Li WJ. Macrophage migration inhibitory factor regulates AKT signaling in hypoxic culture to modulate senescence of human mesenchymal stem cells. Stem Cells Dev. 2014;23(8):852-865. doi: 10.1089/scd.2013.0294.

Pastor-Anglada M, Molina-Arcas M, Casado FJ, Bellosillo B, Colomer D, Gil J. Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia. 2004;18(3):385-393. doi: 10.1038/sj.leu.2403271.

Pastoret C, Houot R. "Chronic myelogenous leukemia in primary blast crisis" rather than "de novo BCR-ABL1-positive acute myeloid leukemia". Clin Case Rep. 2017;5(6):757-760. doi: 10.1002/ccr3.937.

Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, Levine RL. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2012;366(12):1079-1089. doi: 10.1056/NEJMoa1112304.

Paz JL, Levy D, Oliveira BA, de Melo TC, de Freitas FA, Reichert CO, Rodrigues A, Pereira J, Bydlowski SP. 7-Ketocholesterol Promotes Oxiapoptophagy in Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell from Patients with Acute Myeloid Leukemia. Cells. 2019;8(5):482. doi: 10.3390/cells8050482.

Pereira Lda V. A importância do uso das células tronco para a saúde pública [The importance of the use of stem cells for public health]. Cien Saude Colet. 2008;13(1):7-14. Portuguese. doi: 10.1590/s1413-81232008000100002.

Pers YM, Jorgensen C, Khoury M. Editorial: The Role of Metabolism in MSC-MediatedImmunomodulation.FrontImmunol.2021;12:751865.doi: 10.3389/fimmu.2021.751865.

Piller G. Leukaemia - a brief historical review from ancient times to 1950. Br J Haematol. 2001;112(2):282-292. doi: 10.1046/j.1365-2141.2001.02411.x.

Pleyer L, Valent P, Greil R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Normal and Dysplastic Hematopoiesis-Masters of Survival and Clonality? Int J Mol Sci. 2016;17(7):1009. doi: 10.3390/ijms17071009.

Podestà MA, Remuzzi G, Casiraghi F. Mesenchymal Stromal Cell Therapy in SolidOrganTransplantation.FrontImmunol.2021;11:618243.doi: 10.3389/fimmu.2020.618243.

Pokharel M. Leukemia: A Review Article. International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences. 2012;2(3):397-407.

Poon RY. Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. Methods Mol Biol. 2016;1342:3-19. doi: 10.1007/978-1-4939-2957-3_1.

Pricola KL, Kuhn NZ, Haleem-Smith H, Song Y, Tuan RS. Interleukin-6 maintains bone marrow-derived mesenchymal stem cell stemness by an ERK1/2-dependent mechanism. J Cell Biochem. 2009;108(3):577-588. doi: 10.1002/jcb.22289.

Qie S, Diehl JA. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. J Mol Med (Berl). 2016 Dec;94(12):1313-1326. doi: 10.1007/s00109-016-1475-3.

Radich JP, Dai H, Mao M, Oehler V, Schelter J, Druker B, Sawyers C, Shah N, Stock W, Willman CL, Friend S, Linsley PS. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(8):2794-2799. doi: 10.1073/pnas.0510423103.

Reichert CO, de Freitas FA, Levy D, Bydlowski SP. Oxysterols and mesenchymal stem cell biology. Vitam Horm. 2021;116:409-436. doi: 10.1016/bs.vh.2021.02.004.

Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. Annu Rev Immunol. 2000;18:217-242. doi: 10.1146/annurev.immunol.18.1.217.

Rossi JF, Lu ZY, Jourdan M, Klein B. Interleukin-6 as a therapeutic target. Clin Cancer Res. 2015;21(6):1248-1257. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2291.

Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature. 1973;243(5405):290-293. doi: 10.1038/243290a0.

Rubocki RJ, Duffy KJ, Shepard KL, McCue BJ, Shepherd SJ, Wisecarver JL. Loss of heterozygosity detected in a short tandem repeat (STR) locus commonly used for human DNA identification. J Forensic Sci. 2000;45(5):1087-1089.

Rumjanek VM, Trindade GS, Wagner-Souza K, de-Oliveira MC, Marques-Santos LF, Maia RC, Capella MA. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. An Acad Bras Cienc. 2001;73(1):57-69. doi: 10.1590/s0001-37652001000100007.

Rumjanek VM, Vidal RS, Maia RC. Multidrug resistance in chronic myeloid leukaemia: how much can we learn from MDR-CML cell lines? Biosci Rep. 2013;33(6):e00081. doi: 10.1042/BSR20130067.

Schafer KA. The cell cycle: a review. Vet Pathol. 1998;35(6):461-478. doi: 10.1177/030098589803500601.

Schmitz G, Langmann T. Structure, function and regulation of the ABC1 gene product. Curr Opin Lipidol. 2001;12(2):129-140. doi: 10.1097/00041433-200104000-00006.

Schwindt TT, Barnabe GF, Mello LEAM. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. J Bras Neurocirurg 2005;16(1):13-19. doi: 10.22290/jbnc.v16i1.505.

Seborova K, Kloudova-Spalenkova A, Koucka K, Holy P, Ehrlichova M, Wang C, Ojima I, Voleska I, Daniel P, Balusikova K, Jelinek M, Kovar J, Rob L, Hruda M, Mrhalova M, Soucek P, Vaclavikova R. The Role of TRIP6, ABCC3 and CPS1 Expression in Resistance of Ovarian Cancer to Taxanes. Int J Mol Sci. 2021;23(1):73. doi: 10.3390/ijms23010073.

Seth R, Singh A. Leukemias in Children. Indian J Pediatr. 2015;82(9):817-24. doi: 10.1007/s12098-015-1695-5.

Sharma M, Ross C, Srivastava S. Ally to adversary: mesenchymal stem cells and their transformation in leukaemia. Cancer Cell Int. 2019;19:139. doi: 10.1186/s12935-019-0855-5.

Sherr CJ, Beach D, Shapiro GI. Targeting CDK4 and CDK6: From Discovery to Therapy. Cancer Discov. 2016;6(4):353-367. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0894.

Song JM, Xu D, Fan EJ, Xu SR, Li D, Zhao CH. [Cyclin D2 expression in chronic myelogenous leukemia]. Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi. 2004;25(2):103-105.

Song N, Scholtemeijer M, Shah K. Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential. Trends Pharmacol Sci. 2020;41(9):653-664. doi: 10.1016/j.tips.2020.06.009.

Soupir CP, Vergilio JA, Dal Cin P, Muzikansky A, Kantarjian H, Jones D, Hasserjian RP. Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia: a rare aggressive leukemia with clinicopathologic features distinct from chronic myeloid leukemia in myeloid blast crisis. Am J Clin Pathol. 2007;127(4):642-650. doi: 10.1309/B4NVER1AJJ84CTUU.

Spitzwieser M, Pirker C, Koblmüller B, Pfeiler G, Hacker S, Berger W, Heffeter P, Cichna-Markl M. Promoter methylation patterns of ABCB1, ABCC1 and ABCG2 in human cancer cell lines, multidrug-resistant cell models and tumor, tumor-adjacent and tumor-distant tissues from breast cancer patients. Oncotarget. 2016;7(45):73347-73369. doi: 10.18632/oncotarget.12332.

Steady Health. History of leucemia [Internet] [citado em 15 de fevereiro de 2020]. Disponível em: <u>https://ic.steadyhealth.com/history-of-leukemia</u>.

Stieger B, Meier Y, Meier PJ. The bile salt export pump. Pflugers Arch. 2007;453(5):611-620. doi: 10.1007/s00424-006-0152-8.

Stutzbach, L. Perk Genetic Variation and Function in Progressive Supranuclear Palsy. Penn Libraries: University of Pennsylvania 2015 [Internet]. Dissertations available from ProQuest AAI3722781 [citado em 20 de junho de 2022]. Disponível em: https://repository.upenn.edu/dissertations/AAI3722781. Sumaiya K, Langford D, Natarajaseenivasan K, Shanmughapriya S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): A multifaceted cytokine regulated by genetic and physiological strategies. Pharmacol Ther. 2022;233:108024. doi: 10.1016/j.pharmthera.2021.108024.

Sun G, Guzman E, Balasanyan V, Conner CM, Wong K, Zhou HR, Kosik KS, Montell DJ. A molecular signature for anastasis, recovery from the brink of apoptotic cell death. J Cell Biol. 2017;216(10):3355-3368. doi: 10.1083/jcb.201706134.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. CA Cancer J Clin. 2021;71(3):209-249. doi: 10.3322/caac.21660.

Sylvester KG, Longaker MT. Stem cells: review and update. Arch Surg. 2004;139(1):93-99. doi: 10.1001/archsurg.139.1.93.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006;126(4):663-676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tang HL, Tang HM, Mak KH, Hu S, Wang SS, Wong KM, Wong CS, Wu HY, Law HT, Liu K, Talbot CC Jr, Lau WK, Montell DJ, Fung MC. Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. Mol Biol Cell. 2012;23(12):2240-2252. doi: 10.1091/mbc.E11-11-0926.

Tian Y, Tian X, Han X, Chen Y, Song CY, Jiang WJ, Tian DL. ABCE1 plays an essential role in lung cancer progression and metastasis. Tumour Biol. 2016;37(6):8375-8382. doi: 10.1007/s13277-015-4713-3.

Tomiyasu H, Watanabe M, Sugita K, Goto-Koshino Y, Fujino Y, Ohno K, Sugano S, Tsujimoto H. Regulations of ABCB1 and ABCG2 expression through MAPK pathways in acute lymphoblastic leukemia cell lines. Anticancer Res. 2013;33(12):5317-5323.

Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence. Clin Cancer Res. 2003;9(13):4653-4665.

Trimarco V, Ave E, Facco M, Chiodin G, Frezzato F, Martini V, Gattazzo C, Lessi F, Giorgi CA, Visentin A, Castelli M, Severin F, Zambello R, Piazza F, Semenzato G, Trentin L. Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia (CLL) tumor B cells and mesenchymal stromal cells (MSCs): implications for neoplastic cell survival. Oncotarget. 2015;6(39):42130-42149. doi: 10.18632/oncotarget.6239.

Trojani A, Pungolino E, Dal Molin A, Lodola M, Rossi G, D'Adda M, Perego A, Elena C, Turrini M, Borin L, Bucelli C, Malato S, Carraro MC, Spina F, Latargia ML, Artale S, Spedini P, Anghilieri M, Di Camillo B, Baruzzo G, De Canal G, Iurlo A, Morra E, Cairoli R. Nilotinib interferes with cell cycle, ABC transporters and JAK-STAT signaling pathway in CD34+/lin- cells of patients with chronic phase chronic myeloid leukemia after 12 months of treatment. PLoS One. 2019;14(7):e0218444. doi: 10.1371/journal.pone.0218444.

Tytgat O, Fauvart M, Stakenborg T, Deforce D, Van Nieuwerburgh F. STRide probes: Single-labeled short tandem repeat identification probes. Biosens Bioelectron. 2021;180:113135. doi: 10.1016/j.bios.2021.113135.

Viaud M, Abdel-Wahab O, Gall J, Ivanov S, Guinamard R, Sore S, Merlin J, Ayrault M, Guilbaud E, Jacquel A, Auberger P, Wang N, Levine RL, Tall AR, Yvan-Charvet L. ABCA1 Exerts Tumor-Suppressor Function in Myeloproliferative Neoplasms. Cell Rep. 2020;30(10):3397-3410.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.056.

Vicente López Á, Vázquez García MN, Melen GJ, Entrena Martínez A, Cubillo Moreno I, García-Castro J, Orellana MR, González AG. Mesenchymal stromal cells derived from the bone marrow of acute lymphoblastic leukemia patients show altered BMP4 production: correlations with the course of disease. PLoS One. 2014;9(1):e84496. doi: 10.1371/journal.pone.0084496.

Walsh MC. Moving from official to traceable methods. TrAC Trends in Analytical Chemistry. 1999;18(9):616-23.

Wang F, Wang XK, Shi CJ, Zhang H, Hu YP, Chen YF, Fu LW. Nilotinib enhances the efficacy of conventional chemotherapeutic drugs in CD34⁺CD38⁻ stem cells and ABC transporter overexpressing leukemia cells. Molecules. 2014;19(3):3356-3375. doi: 10.3390/molecules19033356.

Wang L, Luo Q, Zeng S, Lou Y, Li X, Hu M, Lu L, Liu Z. Disordered farnesoid X receptor signaling is associated with liver carcinogenesis in Abcb11-deficient mice. J Pathol. 2021;255(4):412-424. doi: 10.1002/path.5780.

Wang W, Bochtler T, Wuchter P, Manta L, He H, Eckstein V, Ho AD, Lutz C. Mesenchymal stromal cells contribute to quiescence of therapy-resistant leukemic cells in acute myeloid leukemia. Eur J Haematol. 2017;99(5):392-398. doi: 10.1111/ejh.12934.

WCRF International. World Cancer Research Fund Intenational - American Institute for Cancer Research [Internet]. Home, Cancer facts & figures, Worldwide cancer data [citado em 04 de janeiro de 2020]. Disponível em: <u>http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/worldwide-data</u>.

WCRF International. World Cancer Research Fund Intenational - American Institute for Cancer Research [internet]. Home, Cancer facts & figures, Worldwide cancer data [citado em 14 de junho de 2022]. Disponível em: <u>https://www.wcrf.org/cancer-trends/worldwide-cancer-data/</u>.

Wenzel ES, Singh ATK. Cell-cycle Checkpoints and Aneuploidy on the Path to Cancer. In Vivo. 2018;32(1):1-5. doi: 10.21873/invivo.11197.

WHO. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer, Cancer Today [Internet]. Home, Explore, Pie Chart, Graphic [citado em 12 de julho de 2022]. Disponível em: <u>https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&popul ations=900&key=total&sex=0&cancer=36&type=1&statistic=5&prevalence=0&popula tion_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=0&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0.</u>

Wilhide CC, Van Dang C, Dipersio J, Kenedy AA, Bray PF. Overexpression of cyclin D1 in the Dami megakaryocytic cell line causes growth arrest. Blood. 1995;86(1):294-304.

Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. Circ Res. 2011;109(8):923-940. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243147.

Wright NA. Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. Int J Exp Pathol. 2000;81(2):117-143. doi: 10.1046/j.1365-2613.2000.00146.x.

Wu CP, Calcagno AM, Ambudkar SV. Reversal of ABC drug transporter-mediated multidrug resistance in cancer cells: evaluation of current strategies. Curr Mol Pharmacol. 2008;1(2):93-105. doi: 10.2174/1874467210801020093.

Wu J, Zhang L, Feng Y, Khadka B, Fang Z, Liu J. HDAC8 promotes daunorubicin resistance of human acute myeloid leukemia cells via regulation of IL-6 and IL-8. Biol Chem. 2020;402(4):461-468. doi: 10.1515/hsz-2020-0196.

Wu S, Fu L. Tyrosine kinase inhibitors enhanced the efficacy of conventional chemotherapeutic agent in multidrug resistant cancer cells. Mol Cancer. 2018;17(1):25. doi: 10.1186/s12943-018-0775-3.

Wu SY, Yang J, Hong D, Xiao PF, Lu J, Gao L, Hu YX, Wang M, Shao XJ, Zhou CY, Li JQ, Pan J, Ling J, Gu WY, Chen RH, Hu SY. Suppressed CCL2 expression inhibits the proliferation of leukemia cells via the cell cycle protein Cyclin D1: preliminary in vitro data. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2018;22(17):5588-5596. doi: 10.26355/eurrev_201809_15823.

Wuxiao Z, Wang H, Su Q, Zhou H, Hu M, Tao S, Xu L, Chen Y, Hao X. MicroRNA-145 promotes the apoptosis of leukemic stem cells and enhances drug-resistant K562/ADM cell sensitivity to adriamycin via the regulation of ABCE1. Int J Mol Med. 2020;46(4):1289-1300. doi: 10.3892/ijmm.2020.4675.

Xia W, Hou M. Macrophage migration inhibitory factor rescues mesenchymal stem cells from doxorubicin-induced senescence though the PI3K-Akt signaling pathway. Int J Mol Med. 2018;41(2):1127-1137. doi: 10.3892/ijmm.2017.3282.

Yang A, Alrosan AZ, Sharpe LJ, Brown AJ, Callaghan R, Gelissen IC. Regulation of ABCG4 transporter expression by sterols and LXR ligands. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2021;1865(1):129769. doi: 10.1016/j.bbagen.2020.129769.

Zanetti SR, Romecin PA, Vinyoles M, Juan M, Fuster JL, Cámos M, Querol S, Delgado M, Menendez P. Bone marrow MSC from pediatric patients with B-ALL highly

immunosuppress T-cell responses but do not compromise CD19-CAR T-cell activity. J Immunother Cancer. 2020;8(2):e001419. doi: 10.1136/jitc-2020-001419.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature. 2003;425(6960):836-841. doi: 10.1038/nature02041.

Zhang Y, Zhang Y, Wang J, Yang J, Yang G. Abnormal expression of ABCD3 is an independent prognostic factor for colorectal cancer. Oncol Lett. 2020;19(5):3567-3577. doi: 10.3892/ol.2020.11463.

Zhang Z, Li X, Wang X, Zhou Y, Xu H, Wang J, Huang L, Tian Y, Cheng Q. [The expression of ABCG4, V-ATPase and clinic significance of their correlation with NSCLC.]. Zhongguo Fei Ai Za Zhi. 2008;11(5):691-5. Chinese. doi: 10.3779/j.issn.1009-3419.2008.05.023.

Zhu L, Wang Z, Zheng X, Ding L, Han D, Yan H, Guo Z, Wang H. Haploidentical hematopoietic stem cell transplant with umbilical cord-derived multipotent mesenchymal cell infusion for the treatment of high-risk acute leukemia in children. Leuk Lymphoma. 2015;56(5):1346-1352. doi: 10.3109/10428194.2014.939970.

Zhu Y, Wei W, Ye T, Liu Z, Liu L, Luo Y, Zhang L, Gao C, Wang N, Yu L. Small Molecule TH-39 Potentially Targets Hec1/Nek2 Interaction and Exhibits Antitumor Efficacy in K562 Cells via G0/G1 Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induction. Cell Physiol Biochem. 2016;40(1-2):297-308. doi: 10.1159/000452546.

10. ANEXOS

10. ANEXOS

Anexo 01. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa





PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Efeito das Células-Tronco Mesenquimais de medula óssea de indivíduos saudáveis e portadores de Leucemia Mieloide Aguda na expressão de genes de resistência a múltiplas drogas das linhagens hematológicas K562 e K562-Lucena

Pesquisador: Sergio Paulo Bydlowski Área Temática: Versão: 2 CAAE: 24060619.0.0000.0068 Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.728.644

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto que será desenvolvido como tese de Doutorado do aluno Fábio Alessandro de Freitas, sob orientação do Prof. Dr. Sérgio Paulo Bydlowski.

O projeto parte da hipótese de que, as células-tronco mesenquimais parecem estar envolvidas na proteção das células leucêmicas frente ao tratamento quimioterápico e que essa proteção se dá por alterações no ciclo celular das células leucêmicas ou pelo desenvolvimento de resistência dessas células frente aos fármacos utilizados no tratamento, resultando em manutenção de doença mínima ou em muitos casos de recidiva.

Assim, esse projeto visa estudar a interação das células-tronco mesenquimais e as células leucêmicas, buscando identificar os mecanismos de defesa oriundos dessa interação e consequentemente obter dados que possam auxiliar em uma terapia mais efetiva.

As Células-tronco mesenquimais de medula óssea de pacientes portadores de Leucemia Mieloide Aguda e Células-tronco mesenquimais de medula óssea de indivíduos saudáveis (controles) que serão usadas no projeto fazem parte do biorrepositório do Grupo de lípides, oxidação e biologia celular, Laboratório de Imunologia (LIM-19), cujo orientador é responsável. Assim, o pesquisador pede dispensa de TCLE, pois o material a ser avaliado já encontra-se no laboratório.

Endereço	: Rua Ovídio Pires de	Campos, 225 5º andar		
Bairro:	Cerqueira Cesar	CEP:	05.403-010	
UF: SP	Município:	SAO PAULO		
Telefone	(11)2661-7585	Fax: (11)2661-7585	E-mail:	cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Página 01 de 03



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

Continuação do Parecer: 3.728.644

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo geral da pesquisa é avaliar a interação entre as células-tronco mesenquimais de medula óssea, provenientes de indivíduos saudáveis e acometidos pela leucemia mielóide aguda, e as linhagens celulares K562 e K562-Lucena, verificando a expressão gênica referente à resistência a múltiplas drogas dessas linhagens.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco da pesquisa é mínimo uma vez que essas células já estão no biorrepositório do Grupo de Lípides, Oxidação e Biologia Celular do laboratório de Imunologia (LIM 19). Para minimizar o risco de quebra de anonimato, somente o pesquisador responsável tem

a identidade e os dados de cada indivíduo.

A pesquisa poderá trazer como benefício o aumento de conhecimento específico da interação das células tronco mesenquimais com a leucemia mieloide crônica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa interessante, de interesse para a área em questão. O pesquisador se compromete a arcar com os custos do projeto. Cronograma exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador encaminhou novas versões dos documentos, com descrição dos riscos, a caracterização dos grupos e detalhamento do orçamento, de maneira satisfatória.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar					
Bairro:	Cerqueira Cesar	CEP:	05.403-010		
UF: SP	Município:	SAO PAULO			
Telefone	: (11)2661-7585	Fax: (11)2661-7585	E-mail:	cappesq.adm@hc.fm.usp.br	

Página 02 de 03



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

Continuação do Parecer: 3.728.644

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1449350.pdf	12/11/2019 15:33:19		Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_encaminhamento.pdf	12/11/2019 15:32:25	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_corrigido_CAPEPESQ.pdf	12/11/2019 15:31:14	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_resumido_corrigido_CAPEPES Q.pdf	12/11/2019 15:30:59	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Orçamento	Declaracao_comprometimento_financia mento.pdf	22/10/2019 18:12:25	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Outros	Documento.pdf	22/10/2019 18:07:42	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Folha de Rosto	FRSERGIOBYDLOWSKI11140.pdf	22/10/2019 18:07:07	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Outros	Encaminhamento_cappesq.pdf	08/10/2019 16:23:14	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito
Cronograma	Cronograma_corrigido_LIM19.pdf	08/10/2019 15:11:46	Sergio Paulo Bydlowski	Aceito

Situação do Parecer: Aprovado Necessita Apreciação da CONEP: Não

SAO PAULO, 27 de Novembro de 2019

Assinado por: ALFREDO JOSE MANSUR (Coordenador(a))

Endereço	 Rua Ovídio Pires de 	Campos, 225 5º andar			
Bairro:	Cerqueira Cesar	CEP:	05.403-010		
UF: SP	Município:	SAO PAULO			
Telefone	(11)2661-7585	Fax: (11)2661-7585	E-mail:	cappesq.adm@hc.fm.usp.br	

Página 03 de 03

Anexo 02. Perfil de STR da amostra de células K562 adaptadas ao cultivo em meio DMEM *Low glucose*





Anexo 03. Perfil de STR da amostra de células K562-Lucena 1 adaptadas ao cultivo em meio DMEM *Low glucose*



