

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Avaliação dos efeitos modulatórios da hematopoese no envelhecimento: papel das
células tronco mesenquimais medulares

Carlos Eduardo da Silva Gonçalves

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área de Fisiopatologia

Avaliação dos efeitos modulatórios da hematopoese no envelhecimento: papel das
células tronco mesenquimais medulares

Carlos Eduardo da Silva Gonçalves

Versão Original

Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Orientador: Prof. Dr Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

Gonçalves, Carlos Eduardo da Silva

G635a Avaliação dos efeitos modulatórios da hematopoese no envelhecimento: papel das células tronco mesenquimais medulares / Carlos Eduardo da Silva Gonçalves. - São Paulo, 2022.

111 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio

1. Envelhecimento. 2. Célula tronco mesenquimal.
3. Hematopoese. 4. Microambiente hematopoético. I.
T. II. Fock, Ricardo Ambrósio, orientador.

Carlos Eduardo da Silva Gonçalves

Avaliação dos efeitos modulatórios da hematopoese no envelhecimento: papel das células
tronco mesenquimais medulares

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, _____ de _____

*“A esperança enxerga o invisível, sente o intangível, e conquista o impossível.”
Hellen Keller*

DEDICATÓRIA

À minha mãe, **Rita**, por tornar meus sonhos possíveis.

À minha irmã, **Ana**, por ser uma fonte de inspiração.

Ao meu irmão, **Maurício**, por me dar a certeza de que a nossa mãe está sob bons cuidados.

Aos meus avós, **Carlos** (*in memoriam*) e **Conceição**, pelo carinho, apoio e ensinamentos.

DEDICATÓRIA

Ao **Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock**, orientador deste trabalho, minha admiração meus mais profundos agradecimentos, pela sua confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e por ser um verdadeiro exemplo de excelência em ensino e pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), em nome de seu diretor, Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz.

À Comissão de Pós-Graduação (CPG) da FCF-USP em nome de seu presidente, Prof. Dr. Mauricio Yonamine.

À Comissão Coordenadora de Programa (CCP) do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia da FCF-USP, em nome de sua presidente, Prof. Tit. Sandra Helena Poliselli Farsky.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia da FCF-USP, em nome de sua presidente, Prof. Tit. Sandra Helena Poliselli Farsky.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia, pela paciência e disponibilidade para ajudar.

À chefia do Departamento de Análises Clínicas (FBC) da FCF-USP, em nome da Prof. Dr. Irene da Silva Soares.

À Prof. Dra. Primavera Borelli, por ser uma referência em hematologia e por todos os seus ensinamentos no laboratório e em sala de aula.

Aos professores Dr. João Agostinho Machado-Neto, Dr. Edgar Julian Paredes Gamero, e à Prof. Dr. Sabrina Epiphanyo pelas suas contribuições durante o exame de qualificação.

Ao Edson Naoto Makiyama, pelo apoio técnico e pelos momentos de amizade e descontração.

À Sumara de Freitas, amiga e aluna de mestrado do Laboratório de Hematologia Clínica e Experimental, pela sua amizade e companheirismo durante a nossa trajetória.

Às demais amigas e companhias de pós-graduação do Laboratório de Hematologia Clínica e Experimental da FCF-USP, Juliana, Luciene, Rosana e Beatriz.

À Renaira Oliveira da Silva, pelas suas contribuições no projeto.

Aos meus amigos Jorge Antônio e Larissa Almeida, pelos momentos de apoio e descontração fornecidos ao longo do mestrado.

Ao meu estimado amigo Ediberto Nunes, por ter sido minha porta de entrada para a hematologia durante minha graduação e por todo o seu incentivo, apoio e carinho.

Aos meus amigos da Iquiririm, pelos bons momentos de risadas, descontração e suporte.

À agência de fomento CNPq, pela concessão de bolsa (Processo 130474/2021-5).

Por fim, à todas as demais amigas que perduraram até então e contribuíram na minha formação social.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 ENVELHECIMENTO E SUA FUNDAMENTAÇÃO BIOLÓGICA	18
2.1.1 Alterações Genômicas	18
2.1.2 Desregulação de Sinalização Celular	19
2.1.3 Senescência Celular	19
2.1.4 Exaustão de Células-Tronco	19
2.1.5 Alterações na Comunicação Intercelular	20
2.2 FORMAÇÃO DO TECIDO SANGUÍNEO: HEMATOPOESE.....	20
2.2.1 Hierarquia Hematopoética.....	20
2.2.2 Regulação da Hematopoese.....	23
2.3 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA REGULAÇÃO DA HEMATOPOESE.....	25
2.4 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NA HEMATOPOESE.....	27
2.5 LINHAGEM CELULAR MURÍNICA DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (C1498)	30
3. OBJETIVOS.....	33
3.1 OBJETIVO GERAL.....	33
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAIS.....	34
4.2 MÉTODOS	34
4.2.1 Sangue Total e Soro	34
4.2.2 Mielograma e Imunofenotipagem Medular	35
4.2.3 Coleta, Isolamento e Caracterização de CTMs	36
4.2.4 Avaliação de Citocinas Produzidas por CTMs	38
4.2.5 Expressão Relativa de RNAm de CTMs	38
4.2.6 Efeitos das CTMs sobre a Proliferação Celular de C1498	39
4.2.7 Efeitos das CTMs Sobre a Migração Celular de Células C1498.....	39
4.2.8 Efeito de CTMs Sobre a Regulação Hematopoética de Células C1498.....	40
4.2.9 Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS.....	42
5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO.....	42
5.1.1 Consumo de Ração	42
5.1.2 Consumo de Proteína.....	42

5.1.3 Variação de Massa Corpórea	43
5.2 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA	44
5.2.1 Proteínas Totais.....	44
5.2.2 Albumina	44
5.2.3 Uréia	45
5.2.4 Creatinina	46
5.2.5 Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT).....	46
5.2.6 Colesterol.....	47
5.2.7 Triglicerídeos	48
5.3 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	49
5.3.1 Hemograma	49
5.3.2 Mielograma.....	49
5.4 CITOMETRIA DE FLUXO	50
5.4.1 Imunofenotipagem de Células do Sangue Periférico	50
5.4.2 Imunofenotipagem de Células da Medula Óssea	53
5.4.3 Imunofenotipagem de CTMs.....	59
5.5 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE AS CTMs.....	63
5.5.1 Produção de Citocinas pelas CTMs.....	63
5.5.2 Expressão de Genes Envolvidos na Regulação de CTMs	64
5.6 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NA REGULAÇÃO DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS PELAS CTMs	68
5.6.1 Efeito das CTMs Sobre a Proliferação Celular da Linhagem C1498.....	68
5.6.2 Efeitos das CTMs Sobre a Migração Celular da Linhagem C1498	68
5.6.3 Efeitos das CTMs Sobre a Expressão Gênica da Linhagem C1498.....	69
6. DISCUSSÃO	74
7. CONCLUSÃO.....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
ANEXOS.....	108

RESUMO

GONÇALVES, C. E. S. **Avaliação dos Efeitos Modulatórios da Hematopoese no Envelhecimento: Papel das Células Tronco Mesenquimais Medulares**. 2022. 111p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2022.

O envelhecimento é um processo fisiológico que traz consigo uma série de alterações no organismo que se estendem até o nível molecular. Diante disto, este é um processo complexo que afeta diversos tecidos, sendo um deles o hematopoético, local onde, através de interações da Célula Tronco Hematopoética (CTH) com o ambiente ao seu redor, incluindo a Célula Tronco Mesenquimal (CTM), ocorre a hematopoese. Embora já sejam descritas na literatura algumas alterações na medula óssea consequentes do envelhecimento, os mecanismos por trás de tais mudanças permanecem elusivas, principalmente no âmbito das interações celulares ocorrentes na medula óssea. Portanto, este trabalho buscou investigar como o envelhecimento afeta a regulação hematopoética no contexto de sua relação com as CTMs medulares. Para esta pesquisa, foram utilizados camundongos machos isogênicos da linhagem C57BL/6, dividindo-os em grupos conforme sua idade: jovens (3 – 5 meses) e idosos (18 – 19 meses). Foi realizada a caracterização do modelo através de aspectos físicos como consumo proteico, variação de peso, entre outros, seguido de avaliação bioquímica e hematológica. Adicionalmente, foram coletadas células medulares e, posteriormente, realizado o isolamento das CTMs. Para estudar a relação destas células com a hematopoese, foram realizados ensaios *in vitro* utilizando a linhagem celular leucêmica C1498 (TIB-49™, ATCC®) mantidas em contato com o sobrenadante das CTMs isoladas. Quanto aos parâmetros bioquímicos, os animais idosos apresentaram menores níveis de albumina, aspartato alanina transferase (ALT) e de triglicerídeos quando comparados aos animais jovens. Contrariamente, os animais idosos apresentaram um maior nível de colesterol. Na avaliação hematológica, foi constatado pelo hemograma que os animais idosos apresentaram valores comparáveis aos animais jovens, todavia, o mielograma mostrou menor celularidade geral, seguido de menor número de células da linhagem eritroide e maior número de precursores granulocíticos. Através da imunofenotipagem, foi revelado um maior número de CTHs e de precursores grânulos-monocíticos na medula de animais idosos quando comparado aos jovens, e uma menor frequência de progenitores linfoides. Na imunofenotipagem de sangue periférico de animais idosos houve uma redução no número de linfócitos B e de eritrócitos, e aumento na população de células *natural killers*. Na imunofenotipagem de CTMs, o marcador CD73 apresentou menor expressão nos animais idosos. Avaliando o secretoma destas células estromais, foram encontrados no sobrenadante de CTMs de animais idosos aumentos significativos nas concentrações de CXCL12 e SCF e redução de IL-11. No âmbito molecular, as CTMs de animais idosos apresentaram aumento na expressão de *Akt1*, *Nos* e *Ppar-γ*, e redução na expressão de *Csf3* e *Cdh2*. Adicionalmente, quando comparado a ação das CTMs de animais idosos em relação as CTMs de animais jovens, observou-se que CTMs de animais idosos foram capazes de aumentar a expressão de *Sox2*, *Pou5f1* e *Nanog* e diminuir a expressão de *Cdkn1a* de células da linhagem C1498. O sobrenadante de CTMs de animais idosos também resultou na maior proliferação e migração de células da linhagem C1498. Portanto, levando em consideração a importância das CTMs sobre a regulação do sistema hematopoético, pode-se concluir que, no envelhecimento, as CTMs criam um ambiente propício para a proliferação celular no qual a manutenção da pluripotência é estimulada, o que pode acarretar em uma desregulação do sítio hematopoético quando habitado por células malignas.

Palavras-Chave: Envelhecimento, Célula Tronco Mesenquimal, Hematopoese, Microambiente Hematopoético.

ABSTRACT

GONÇALVES, C. E. S. **Evaluation of the Modulatory Effects of Hematopoiesis during Aging: Role of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells**. 2022. 111p. Dissertation (Master's Degree) – School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2022.

Aging is a physiological process in which occurs a series of alterations in an organism that extend to a molecular level. It is a complex process that affects various tissues, one of them being the bone marrow, where through the interactions of the hematopoietic stem cell (CTH) with its surrounding environment, including with the mesenchymal stem cell (CTM), hematopoiesis takes place. Although some aging-associated alterations in the bone marrow can be found described in the literature, the mechanisms behind said changes remain elusive, especially when regarding the cellular interactions present inside the bone marrow. Therefore, this research aimed to investigate how aging affects the regulation of hematopoiesis in the context of its interactions with bone marrow-derived CTMs. For this investigation, male isogenic C57BL/6 mice were used as animal models. These were separated in two groups according to their age: young (3 – 5 months) and aged (18 – 19 months). The animal models were characterized by their physical properties such as protein intake and weight variation, followed by biochemical and hematological evaluation. Bone marrow cells were obtained and identified through immunophenotyping, thus isolating different cell populations, including the CTMs. To study the relationship between these cells and hematopoiesis, *in vitro* assays were conducted utilizing the leukemic cell lineage C1498 (TIB-49™, ATCC®) maintained in contact with the supernatant of isolated CTMs. By their biochemical profile, aged mice showed lower levels of albumin, alanine-aspartate transferase (ALT) and triglycerides compared to the young group. In contrast, aged mice had a higher cholesterol level. Hematological evaluation by total blood count showed similar results between the two groups, however, the myelogram revealed that the aged animals had lower cellularity, with less frequent cells from the erythroid lineage, with an increase in granulocytic precursors. Through immunophenotyping, it was also revealed that aged mice have higher numbers of hematopoietic stem cells, while also being noted a reduced population of lymphoid progenitors. An increase in the granulomonocytic progenitors was also found. Immunophenotyping peripheral blood cells of aged mice revealed reduced numbers of B lymphocytes and erythrocytes, and an increased natural killer cell population. Additionally, the cell surface marker CD73 was found to be less expressed in aged mice CTMs. The secretome of these stromal cells obtained from aged mice showed higher levels of CXCL12 and SCF, and lower levels of IL-11 when compared to the young counterparts. At a molecular level, CTMs obtained from aged mice expressed more *Akt1*, *Nos* and *Ppar-γ*, while the expression of *Csf3* and *Cdh2* was reduced. Additionally, when comparing the effects of aged mice CTMs with young mice CTMs, it was observed that the first expressed were capable of increasing the expression of *Sox2*, *Pou5f1* and *Nanog*, while decreasing *Cdkn1a* expression in the C1498 cell lineage. The supernatant obtained from aged mice also favored the proliferation and cell migration of the C1498 cell line. Thus, considering the importance that CTMs have over the hematopoietic system, we can conclude that, in aging, CTMs create a special environment which favors cell proliferation and maintenance of pluripotency, which can result in a dysregulation of the hematopoietic tissue when malignant cells are present.

Keywords: Aging, Mesenchymal Stem Cell, Hematopoiesis, Bone Marrow Microenvironment.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
CAR	Células Reticulares Abundantes em CXCL12
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	DNA complementar
CLP	Progenitor Linfoide Comum
CMP	Progenitor Mieloide Comum
CTH	Célula Tronco Hematopoética
CTM	Célula Tronco Estromal ou Mesenquimal
CXCL12	Fator Derivado de Células Estromais
CXCR4	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
FoxO	<i>Foxhead O</i>
G-CSF	Fator Estimulador de Colônias Granulocíticas
GFI	<i>Growth Factor Independence 1</i>
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GMP	Progenitor Grânulo-Monocítico
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC95%	Intervalo de Confiança 95%
IGF1R	<i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i>
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon Gamma
JAK-STAT	<i>Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
LepR ⁺	Receptor de Leptina
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LT-CTH	Célula Tronco Hematopoética <i>Long-Term</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEP	Progenitor Megacariocítico-Eritroide
MPP	Progenitor Multipotente
MPP4/LMPP	<i>Lymphoid Biased Multipotent Progenitor</i>
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
Nes	Nestina
NF κ B	fator transcricional nuclear kappa B
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução Tampão Fosfato Salina
PPAR- γ	<i>Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma</i>
PU.1	<i>Purine-rich Box1</i>
SASP	<i>Senescence Associated Secretory Phenotype</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SCL	<i>Stem Cell Leukemia</i>
SLAMF	<i>Signaling Lymphocytic Activation Molecule Family</i>
ST-CTH	Célula Tronco Hematopoética <i>Short-Term</i>
TNF α	Fator de Necrose Tumoral Alfa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de anticorpos utilizados e populações estudadas.....	35
Tabela 2. Resultados do hemograma.....	49
Tabela 3. Resultados do mielograma.....	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo Hierárquico da Hematopoese.....	22
Figura 2. Micrografia óptica de blastos leucêmicos da linhagem C1498.....	31
Figura 3. Ilustração demonstrando como o sistema para avaliar migração celular foi montado.....	40
Figura 4. Consumo de ração entre animais.	42
Figura 5. Consumo de proteína entre animais.	43
Figura 6. Variação de massa corporal entre animais.	43
Figura 7. Níveis de proteínas totais nos animais.	44
Figura 8. Níveis sorológicos médios de Albumina sérica.	45
Figura 9. Níveis séricos médios de Ureia.	45
Figura 10. Valores médios de creatinina sérica.	46
Figura 11. Valores médios de AST e ALT séricas.....	47
Figura 12. Mensuração dos níveis séricos de colesterol.....	48
Figura 13. Valores médios de triglicerídeos.	48
Figura 14. Estratégia de análise de populações celulares do sangue periférico.	51
Figura 15. Estratégia de análise para granulócitos e monócitos de sangue periférico.	52
Figura 16. Populações celulares do sangue periférico analisadas através de citometria de fluxo.....	53
Figura 17. Estratégia de análise para obtenção da população de CTH residentes na medula óssea de animais.	54
Figura 18. Estratégia de análise de populações de células precursoras e maduras na medula óssea de animais.	55
Figura 19. Estratégia de análise de populações de células linfoides de animais.....	56
Figura 20. Populações celulares da medula óssea analisadas através de citometria de fluxo.....	58
Figura 21. Populações celulares da medula óssea analisadas através de citometria de fluxo.	59
Figura 22. Estratégia de análise por imunofenotipagem para obtenção de populações de CTM de animais.....	60
Figura 23. Quantificação de marcadores de superfície utilizados para caracterizar as CTM de animais.....	62
Figura 24. Quantificação de fatores solúveis produzidos por CTMs obtidas de animais.	64
Figura 25. Resultados de expressão gênica para genes relacionados com as vias de sinalização mTOR e AKT.....	65
Figura 26. Resultado de expressão gênica para o gene <i>Nos</i>	65
Figura 27. Resultado de expressão gênica para genes <i>sp7</i> , <i>Ppar-γ</i> e <i>Angpt1</i>	66
Figura 28. Resultado de expressão gênica para o gene <i>Csf3</i>	67
Figura 29. Resultado de expressão gênica para o gene <i>Cdh2</i>	67
Figura 30. Efeitos de CTMs sobre a proliferação da linhagem celular C1498.	68
Figura 31. Efeitos de CTMs sobre a migração da linhagem celular C1498.....	69
Figura 32. Resultados de expressão gênica para os genes <i>Sox2</i> , <i>Nanog</i> e <i>Pou5f1</i>	70
Figura 33. Resultados de expressão gênica para o gene <i>Cdkn1a</i>	71
Figura 34. Resultados de expressão gênica para os genes <i>Spi1</i> , <i>Gata3</i> , <i>Cebpa</i> , <i>Stat3</i> , <i>Cxcr4</i> , <i>Ccne1</i> e <i>Akt</i>	73

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Ao longo da vida, o ser humano estabelece relações com o mundo ao seu redor e, durante maior parte desse tempo, apresenta uma certa estabilidade em sua saúde. Porém, com o passar do tempo, esta estabilidade enfraquece, surgindo problemas de saúde comuns em grupos de faixas etárias mais avançadas. Por trás destas mudanças, estão ocorrendo diversos processos celulares e moleculares que alteram a função do organismo, trazendo assim as características do envelhecimento (FERRUCCI *et al*, 2020).

Com o avanço do conhecimento, o homem conseguiu prolongar significativamente o seu tempo de vida. Diante disto, atualmente o mundo vive uma expansão frenética no número de pessoas idosas (FERRUCCI *et al*, 2020). De acordo com a Organização das Nações Unidas, a expectativa de vida subiu 3,6 anos durante o período dos anos 2000 a 2005 e no período de 2010 a 2015. Este processo de envelhecimento populacional vem ocorrendo mais rapidamente em países em desenvolvimento (ONU, 2017.; HU; LEI; ZHAO, 2020).

No Brasil, de acordo com o último censo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a população brasileira apresentou um crescimento na expectativa de vida de 5,8 anos entre o período de 1991 (média de 24,8 anos) a 2010 (média de 30,6 anos) e é esperado que essa expectativa cresça ainda mais nos próximos estudos demográficos (IBGE, 2010). No ano de 2043, estima-se que 25% da população tenha idade superior a 60 anos de idade, enquanto que populações mais jovens tenham uma menor proporção, evidenciando assim o processo de “inversão de pirâmide” das faixas etárias (IBGE, 2019).

Como dito anteriormente, isto traz consigo uma população com maior convivência em problemas crônicos de saúde, inevitavelmente criando uma carga sobre o sistema de saúde local, além também de afetar a economia (FERRUCCI *et al*, 2020.; HU; LEI; ZHAO, 2020).

Através do ponto de vista biológico, o envelhecimento provém de um acúmulo de alterações celulares e genômicas características, apresentando até mesmo origens similares com processos neoplásicos. De acordo com López-Otín *et al* (2013), as propriedades que definem o envelhecimento são: instabilidade genômica, atrito de telômeros, alterações epigenéticas, perda de proteostase, sensibilidade a nutrientes desregulada, disfunção mitocondrial, senescência celular, exaustão de células-tronco e alteração nas comunicações intercelulares.

O sistema hematopoético é responsável por originar todos os componentes celulares do sangue através do processo chamado de hematopoese, realizado por uma célula chamada de Célula-Tronco Hematopoética (CTH) na medula óssea, sendo definida pela sua capacidade de diferenciação e auto-renovação. Este é um tecido altamente organizado e renovável que

depende destes fatores para manter o equilíbrio e funcionalidade das diversas linhagens originadas, atendendo assim as variadas demandas do organismo em situações específicas (VAN GASTEL & SCADDEN, 2021).

Um dos componentes do sistema hematopoético com significativo papel regulatório sobre a hematopoese é uma célula denominada Célula-Tronco Estromal ou Mesenquimal (CTM), que compõe o estroma no qual o tecido medular é sustentado. Esta célula, primeiramente descrita por Friedstein et al (1970) possui a capacidade de se diferenciar em outras linhagens celulares estromais, além também de influenciar a CTH diretamente sob a secreção de fatores solúveis, participando assim sobre a regulação hematopoética (LIN *et al*, 2019).

Devido a sua elevada renovação e pela sua alta heterogeneidade, o sistema hematopoético é bastante suscetível a alterações fisiopatológicas. Com o envelhecimento não é diferente, a literatura descreve bem alterações no âmbito metabólico das CTH que consequentemente afetam a hematopoese. Sabe-se que indivíduos idosos apresentam um *bias* ou “vício” maior em se diferenciar para a linhagem mieloide, enquanto que há a redução no número de células pertencentes à linhagem linfoide (GUSTAFSSON & SCADDEN, 2019).

Igualmente, o estroma medular também é alterado no envelhecimento, envolvendo desde alterações fenotípicas entre seus componentes até a degeneração de regiões do microambiente medular, influenciando o funcionamento de células que dependem das interações com esse meio (MATTEINI; MULAW; FLORIAN, 2021).

Portanto, sabendo-se que as CTM compõem o estroma medular e exercem funções regulatórias diretas sobre a funcionalidade da CTH, consequentemente influenciando toda a hematopoese, e que suas funções podem se alterar mediante o envelhecimento, esta pesquisa buscou estudar aspectos na modulação da hematopoese no envelhecimento, dando ênfase no papel assumido pelas CTM nesse processo.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENVELHECIMENTO E SUA FUNDAMENTAÇÃO BIOLÓGICA

O envelhecimento é um processo natural do organismo pela perda graduação de função dos tecidos orgânicos, aumentando o risco de doenças crônicas, com as mais comuns sendo diabetes, acidente vascular cerebral isquêmico, câncer e doenças cardíacas variadas. (YU *et al*, 2021).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a faixa etária que definem um cidadão como idoso varia entre países em desenvolvimento e em desenvolvimento: para nações desenvolvidas, considera-se idoso o indivíduo com idade igual ou superior a 60 anos, enquanto que países em desenvolvimento deve-se considerar idoso aquele que apresentar idade igual ou superior a 65 anos (OMS, 2015).

Naturalmente, a maior longevidade de vida que acompanha o avanço científico consequentemente aumenta a prevalência destas doenças associadas à idade na sociedade, criando um grupo populacional distinto de outras faixas etárias que necessita de uma atenção diferenciada (FERRUCCI *et al*, 2020.; HU; LEI; ZHAO, 2020.; YU *et al*, 2021). Em comparação, no ano de 2019, 6% da população mundial se enquadrava no grupo etário com idade maior ou igual a 65 anos, sendo estimado que esse percentual cresça para 16% em 2050 (YU *et al*, 2021).

Portanto, como o envelhecimento tende a afetar o mundo inteiro, sempre houve interesse em buscar o porquê desse processo ocorrer, se há maneiras de ele ser revertido e em compreender a sua base biológica. Como descrito por López-Otín (2013), o envelhecimento decorre de uma série de alterações celulares e moleculares, algumas dessas serão brevemente descritas em sequência, destacando as quais foram estudadas nesta pesquisa

2.1.1 Alterações Genômicas

A maior longevidade na vida se reflete no nível celular. Desta maneira, com as células do organismo apresentando mais tempo de vida, há maior predisposição de defeitos genéticos, comprometendo a estabilidade genômica como um todo. Ademais, conforme o ser humano envelhece, o processo de reparo do DNA tende a apresentar falhas, afetando múltiplas vias transcricionais e a expressão de diversos genes (LI *et al*, 2021).

Além disso, existem situações em que o dano ao DNA pode ser amplificado, como na presença de mutações somáticas, aneuploidia cromossômica e outros tipos de mutações. Estas alterações também ocorrem diretamente na mitocôndria celular, onde mutações no DNA mitocondrial envelhecido contribuem para a instabilidade genômica (TIWARI & WILSON, 2019.; KAUPPILA *et al*, 2019.; LI *et al*, 2021).

2.1.2 Desregulação de Sinalização Celular

Acredita-se que as vias de sinalização relacionadas com sensibilidade a nutrientes, como a via *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR) estejam associadas com longevidade (PAPADOLI *et al*, 2019).

O envelhecimento pode afetar a hematopoese em várias formas, sendo uma delas o declínio na funcionalidade da CTH e de seus progenitores (GUSTAFSSON & SCADDEN, 2019). Investigando estas alterações no sistema hematopoético, Ramalingam *et al* (2020) demonstraram que o envelhecimento leva a uma diminuição na sinalização da via mTOR entre as células endoteliais medulares, sendo assim um contribuinte para alterações vistas na hematopoese.

2.1.3 Senescência Celular

O processo de senescência envolve a parada irreversível da proliferação celular, aumento na produção de proteínas, resistência à apoptose e alterações na atividade metabólica celular (TCHKONIA & KIRKLAND, 2018.; HERNANDEZ-SEGURA *et al*, 2018.; LI *et al*, 2021).

Células senescentes tendem a se acumular nos tecidos com o envelhecimento, tornando-se em fatores patogênicos para doenças crônicas como a osteoporose e em doenças vasculares, por exemplo (TCHKONIA & KIRKLAND, 2018). De maneira similar, as CTM sofrem alterações morfológicas, em sua capacidade de proliferação e diferenciação, e também no padrão de secreção de substâncias solúveis, adquirindo o *Senescence-Associated Secretory Phenotype* (SASP), o que também pode influenciar no funcionamento do tecido hematopoético (ZHOU *et al*, 2020).

2.1.4 Exaustão de Células-Tronco

A existência de Células-Tronco em tecidos é a base para a manutenção da homeostasia. Gradativamente, as células-tronco vão perdendo o seu potencial ou *stemness*, impactando sua

capacidade de renovar o tecido o qual elas pertencem. Deste modo, a exaustão de células-tronco consiste na perda de função ou na redução no número dessas células (VILAS *et al*, 2018.; LENGEFELD *et al*, 2021.; LI *et al*, 2021).

Genes envolvidos na pluripotência celular podem estar relacionados na relação entre a exaustão de células-tronco com o envelhecimento. Vilas et al (2018) verificaram que, em camundongos com depleção induzida de células-tronco capilares Sox2⁺, eram observados pelos acinzentados, quifose e redução na massa gordurosa, todos sendo sinais de envelhecimento precoce. Portanto, a exaustão de células-tronco se encaixa como uma característica definitiva do envelhecimento.

2.1.5 Alterações na Comunicação Intercelular

Mudanças na comunicação entre células também pode ser um fator contribuinte para algumas alterações presentes no envelhecimento. Através deste processo, a sinalização entre células regula o metabolismo celular através de vias neuroendócrinas, endócrinas e neuronais (LI *et al*, 2021).

No sistema hematopoético, a comunicação entre células também continua de extrema relevância. Um destaque nesse sistema é a importância de vesículas extracelulares que medeiam comunicações entre células. Estas vesículas, na medula óssea, podem estar envolvidas no direcionamento de linhagem dos progenitores hematopoéticos, com evidências também demonstrando que elas podem influenciar a capacidade de diferenciação de CTMs provindas de tecidos adiposos (GOLDBERG, 2021).

Ademais, conforme dito anteriormente, no envelhecimento há a presença de uma inflamação crônica relacionada à secreção de citocinas pró-inflamatórias (JANG *et al*, 2018). Esta inflamação estimula a via do fator transcricional nuclear kappa B (NF-κB), sustentando assim o *inflammaging* (LEONARDI *et al*, 2018)

2.2 FORMAÇÃO DO TECIDO SANGUÍNEO: HEMATOPOESE

2.2.1 Hierarquia Hematopoética

A formação do tecido sanguíneo ocorre na medula óssea através de um processo chamado hematopoese. Neste contexto, a CTH será a principal atuante para formar células pertencentes à linhagem mieloide (eritrócitos, plaquetas, granulócitos e monócitos) e à linhagem linfóide (linfócitos B, T e células *natural killers*). Diante disto, o processo hematopoético respeita uma hierarquia maturativa no qual a CTH depende de inúmeras

interações com o microambiente medular para regular uma balança entre auto-renovação e diferenciação, de modo que essa célula mantenha sua plasticidade e, ao mesmo tempo, não prolifere descontroladamente (HASTREITER *et al*, 2020.; PINHO & FRENETTE, 2019.; COMAZZETTO; SHEN; MORRISON, 2021).

Partindo da descoberta da CTH, foi proposto um modelo hierárquico na hematopoese para estabelecer a relação entre essa célula e suas progênes, criando assim uma esquematização com as principais etapas de maturação celular, seguindo a partir de uma célula menos diferenciada (CTH), para progenitores de característica multipotente (MPP), oligopotente e, enfim, unipotente, que irão originar suas respectivas células maduras (ZHANG *et al*, 2018).

Embora o termo CTH seja usado para se referir a um único tipo celular, o desenvolvimento de novas tecnologias tem mostrado como essa população apresenta uma elevada heterogeneidade durante a hematopoese, refletindo assim como a sua capacidade de diferenciação e de comprometimento com linhagens específicas vai se desenvolvendo ao longo do processo maturativo celular (HAAS; TRUMPP; MILSOM, 2018.; ZHANG *et al*, 2022). A **figura 1** representa uma esquematização da hematopoese e dos marcadores fenotípicos baseados em *clusters of differentiation* (CD) utilizados para identificar diferentes populações hematopoéticas em humanos e em camundongos.

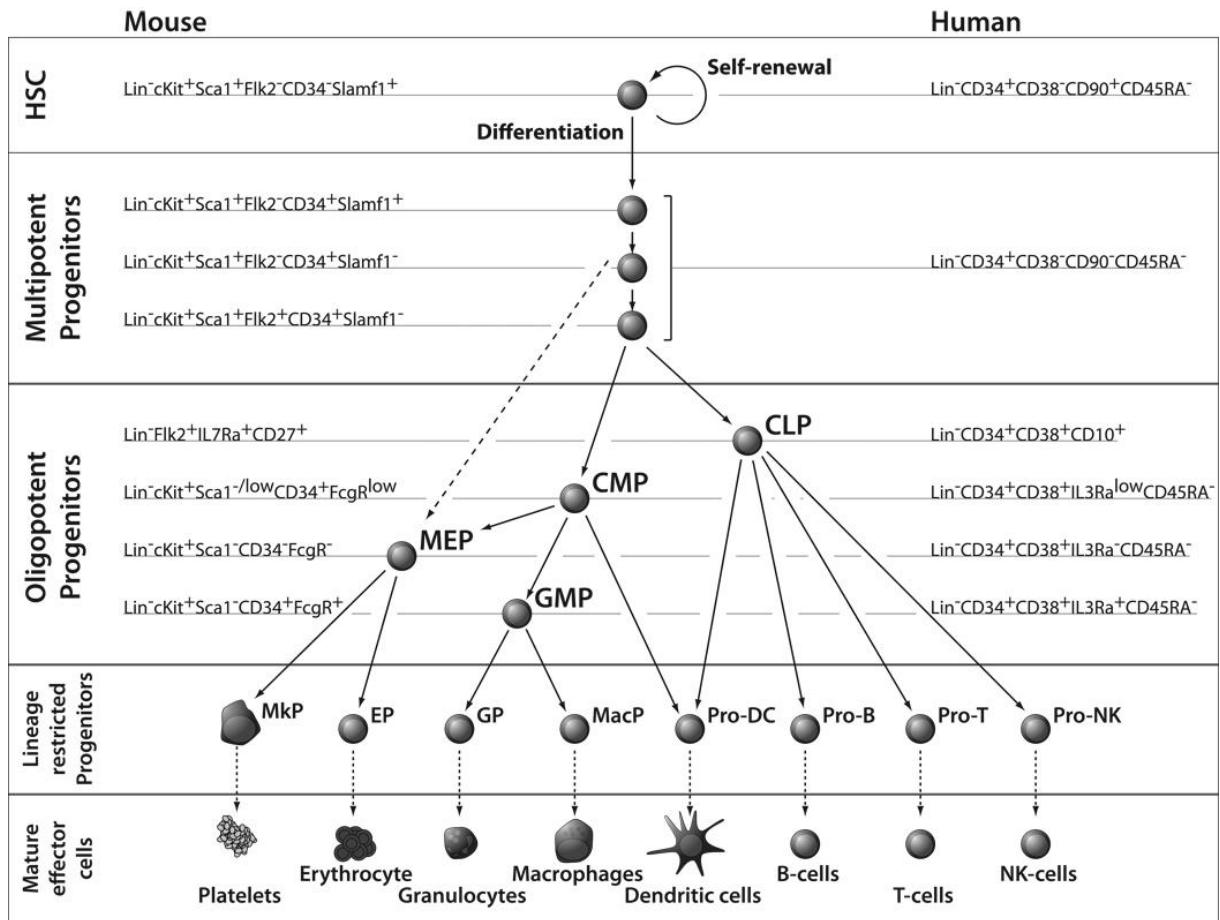


Figura 1. Modelo Hierárquico da Hematopoese com a divisão de precursores hematopoéticos e seus respectivos marcadores utilizados para isolamento de células hematopoéticas em modelos murinos e em humanos. Legenda: MEP: Progenitor Megacariocítico-Eritroide, CMP: Progenitor Mieloide Comum, GMP: Progenitor Grânulo-Monocítico, MkP: Progenitor Megacariocítico, EP: Progenitor-Eritróide, GP: Progenitor Granulocítico, MacP: Progenitor de Macrófagos, Pro-DC: Progenitor de Células Dendríticas, Pro-B: Progenitor de Linfócitos B, Pro-T: Progenitor de Linfócitos T, Pro-NK: Progenitor de Células *Natural Killers* Adaptado de Seita e Weissman, 2010.

Classicamente, os marcadores de superfície mais utilizados para o isolamento de CTH costumam ser o CD34, Sca-1, c-Kit, marcadores *signaling lymphocytic activation molecule* (SLAMF/CD150), entre outros (IKUTA & WEISSMAN, 1992; OKADA *et al*, 1992; OSAWA *et al*, 1996; KIEL *et al*, 2005; OGURO; DING; MORRISON, 2013; CHENG; ZHENG; CHENG, 2020).

Segundo o modelo proposto por Seita & Weissman (2010), as CTH podem ser subdivididas em dois grupos com base na sua expressão de CD34: um grupo CD34⁻ chamado de *long-term* (LT)-CTH, e um grupo CD34⁺ chamado *short-term* (ST)-CTH. O grupo LT-CTH, formado por células quiescentes, compreende a fração mais rara de CTHs presentes na medula óssea, as quais apresentam maior capacidade de reconstituição da medula. Em contraste, as ST-

CTHs possuem menor capacidade de reconstituição e são progênies das LT-CTHs (CHENG; ZHENG; CHENG, 2020).

Após o estado de ST-CTH, a diferenciação segue para o estado de MPP, no qual a célula perde seu potencial de auto-renovação (YANG *et al*, 2005.; CHENG; ZHENG; CHENG, 2020). Introduzindo os marcadores CD135 (Flk2/Flt3) e as proteínas SLAMF, fez-se possível identificar também subtipos de células em estado de MPP: uma fração com tendência a se diferenciar para MEP, chamada de MPP2 (Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺CD34⁺CD48⁺CD150⁺), uma com maior afinidade para o estado de GMP, chamada de MPP3 (Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺CD34⁺CD38⁺) e, por fim, uma com maior potencial linfoide, denominada como MPP4/LMPP (*Lymphoid-biased Multipotent Progenitor*, Lin⁻c-kit⁺Sca-1⁺CD34⁺CD48⁺CD135⁺) (WILSON *et al*, 2008.; KIEL *et al*, 2005.; ADOLFSSON *et al*, 2001.; ADOLFSSON *et al*, 2005.; PIETRAS *et al*, 2015.; ARINOBU *et al*, 2007.; OGURO; DING; MORRISON, 2013.; AURRAND-LIONS & MANCINI, 2018).

Deixando o perfil de MPP, a hierarquia hematopoética pode seguir duas linhagens diferentes, a linhagem linfoide, através do Progenitor Linfoide Comum (CLP, Lin⁻Il7r^{low}c-Kit⁺Sca-1⁺) ou a mieloide, por meio do Progenitor Mieloide Comum (CMP, Lin⁻Il7r^c-kit⁺Sca-1⁻CD34⁺CD16/32^{low}). Outros descendentes da linhagem mieloide incluem o Progenitor Megacariocítico-Eritroide (MEP, Lin⁻Il7r^c-Kit⁺Sca-1⁻CD34⁻CD16/32^{low}) e Progenitor Grânulo-Monocítico (GMP, Lin⁻Il7r^c-Kit⁺Sca-1⁻CD34⁻CD16/32^{high}), que irão originar células de potencial restrito a suas linhagens específicas (KONDO *et al.*, 1997; AKASHI *et al.*, 1999; WEISSMAN, 2000; BRYDER *et al.*, 2006; WEISSMAN & SHIZURU, 2008; HASTREITER, 2020).

2.2.2 Regulação da Hematopoese

Dentro da medula óssea, ocorre a produção de bilhões de células sanguíneas diariamente, podendo haver alterações na intensidade dessa produção conforme a demanda do organismo. Por se tratar de um tecido com elevado *turnover*, o sistema hematopoético depende de um emaranhado de interações celulares envolvendo a CTH, fatores de crescimento, fatores transcricionais, moléculas de adesão, e também interações com outras células não hematopoéticas presentes na medula óssea (ZHU & EMERSON, 2002.; ROBB, 2007.; METCALF, 2008.; ZHANG & LODISH, 2008.; SEITA & WEISSMAN, 2010.; CHENG; ZHENG; CHENG, 2020.; KAUSHANSKY & ZHAN, 2018)

O estudo do conjunto destas interações definiu o conceito de “nichos hematopoéticos”, microrregiões existentes na medula óssea primeiramente descritas por Schofield (1978) com o

papel de regular a função da CTH através de interações celulares e fatores solúveis secretados por células que formam esses microambientes. Amostras histológicas da medula óssea de adultos revelaram que as CTHs costumam estar associadas com células de origem mesenquimal, com o endotélio sinusoidal, e também com arteríolas (CRANE; JEFFERY; MORRISON, 2017.; BONAVIDA *et al*, 2018).

Entre os componentes do sistema estromal, existem as CTMs, células não hematopoéticas derivadas do mesoderma com capacidade adipogênica, osteogênica e condrogênica *in vitro*. No contexto hematopoético, a população de CTM é heterogênea, com sua maioria estando localizada na região perivascular, estando associadas com arteríolas ou vasos sinusoidais, onde serão produtoras de fatores tais como o fator derivado de células estromais (CXCL12) e o *stem cell factor* (SCF) (KFOURY & SCADDEN, 2015.; BARYAWNO *et al*, 2019). O papel das CTMs sobre a regulação da hematopoese será discutido de forma mais completa no item 2.3.

O CXCL12 é um fator que apresenta papéis diferentes dependendo de sua origem. Quando secretado por osteoblastos, o CXCL12 regula a manutenção de progenitores linfoides, e não de CTHs. Contrariamente, quando produzido por células estromais perivascular, o CXCL12 está envolvido na manutenção e mobilização de CTHs (DING & MORRISON, 2013.; LEE; KIM; CHO, 2020). A interação do CXCL12 com o seu receptor C-X-C *chemokine receptor type 4* (CXCR4) também vem sendo explorada no tratamento farmacológico contra processos malignos, visto que foi encontrada uma ampla expressão de CXCL12 em tumores, e pela sua atividade sobre a proliferação e migração celular, assim como em processos metastáticos (ZHOU *et al*, 2019).

As células endoteliais arteriolas da medula óssea são responsáveis por quase toda a secreção de SCF provinda do endotélio, enquanto que as células endoteliais sinusoidais produzem esse fator em pequena quantidade. Na literatura, é evidenciado que o SCF oriundo de células endoteliais arteriolas possui a capacidade de promover a recuperação de CTHs em situações de ablação da medula (XU *et al*, 2018.; MAN *et al*, 2021). Adicionalmente, o SCF também é produzido por células estromais perivascular e, nesse caso, mostra-se também indispensável para as populações de progenitores hematopoéticos, além das CTHs (DING *et al*, 2012.; ASADA *et al*, 2017.; COMAZZETTO *et al*, 2019.; TRINH & BROXMEYER, 2021).

Além de fatores solúveis, o bom funcionamento do sistema hematopoético depende também de fatores transcricionais que irão regular a CTH no âmbito do seu ciclo celular, linhagem de diferenciação, auto-renovação e entre outros. Vários destes já foram identificados na manutenção do equilíbrio entre renovação e diferenciação, como por exemplo, *stem cell*

leukemia, growth factor Independence-1, purine-rich box1 (PU.1 ou Spi1) e *foxhead O* são responsáveis por manter a CTH em quiescência (ZHU & EMERSON, 2002.; HUCK *et al*, 2014.; MANN *et al*, 2022).

Para o direcionamento de linhagens, existem fatores como os da família GATA, composta por GATA-1, GATA-2 e GATA-3, onde o GATA-1 restringe o desenvolvimento da CTH para uma linhagem específica, como o CMP e CLP. O fator GATA-2 exerce sua atividade nas primeiras etapas de desenvolvimento de CTHs, sendo substituído pelo GATA-1. Por fim, o GATA-3 é enriquecido na fração de LT-CTHs, com sua atividade envolvendo a via MAPK-p38a. (MARTIN & ORKIN, 1990.; TRAINOR *et al*, 1996.; GAO *et al*, 2015.; WHYATT *et al*, 1997.; RYLSKI *et al*, 2003.; BRESNICK *et al*, 2010.; SUZUKI *et al*, 2013.; YOSHIDA & GEORGOPOULOS, 2013.; MANN *et al*, 2022). Além disto, o GATA-3 também é importante no desenvolvimento imunológico, visto que ele também regula a formação de células linfoides inatas tipo 2 (KRABBENDAM *et al*, 2018).

2.3 CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS NA REGULAÇÃO DA HEMATOPOESE

As CTM compõem o sistema estromal, sendo essas células não-hematopoéticas com o papel de fornecer sustento ao sistema hematopoético (LIN *et al*, 2019). Embora essas células possuam esta importância sob a formação do sangue, elas são encontradas em proporções extremamente baixas na medula óssea, compreendendo somente 0.01 a 0.001% das células mononucleares presentes (MAISO *et al*, 2021).

Somado a isto, a inexistência de marcadores de superfície específicos para esta população dificulta a padronização de formas de a identificar. Diante disto, a *International Society for Cellular Therapy* definiu critérios mínimos para possibilitar a comparação de CTMs entre estudos diferentes, sendo os critérios: aderir ao plástico em condições normais de cultura celular, apresentar positividade ($\geq 95\%$) para os marcadores CD105, CD73 e CD90, apresentar marcação negativa ($\leq 2\%$) para os marcadores CD34, CD45, CD14/CD11b, CD79a/CD19 e HLA-DR, e apresentar capacidade de se diferenciar em osteócitos, adipócitos e condrócitos *in vitro*, sobre os estímulos apropriados (MAISO *et al*, 2021.; NIKOLITS *et al*, 2021).

A importância das CTMs para o microambiente medular é observada *in vitro* e *in vivo*, sendo capazes de reconstituir um nicho funcional, expressando e produzindo citocinas, além também de produzir outros fatores importantes para o funcionamento das CTHs. Através destas substâncias, as CTMs modulam a hematopoese e, por isso, são utilizadas em culturas bi e tridimensionais *in vitro* ou em co-culturas *ex vivo* para replicar o microambiente da medula

óssea (MUGURUMA *et al*, 2006.; PONTIKOGLOU *et al*, 2011.; JAKUBIKOVA *et al*, 2016.; KAMGA *et al*, 2021).

Um exemplo da importância das CTMs sobre a regulação hematopoética é a sua participação na via de sinalização Notch, implicada na manutenção do *stemness* das CTHs. Na literatura, são descritos 4 receptores tipo Notch e seus ligantes em CTMs, com o principal sendo o Jagged1, com outros podendo serem expressos dependendo do tipo de estudo. Isto demonstra o potencial autócrino desta via de sinalização (MORIYAMA *et al*, 2018.; ZHANG *et al*, 2019). Conforme a CTM obtém as características de senescência celular, algo que se obtém após um determinado número de passagens, a expressão de Notch reduz, servindo de exemplo da relação dessa via de sinalização com o envelhecimento em CTMs (MUTYABA *et al*, 2014.; KAMGA *et al*, 2021).

O funcionamento das CTMs sobre a regulação hematopoética também é afetado na patogênese de diversas doenças hematológicas. Hayashi *et al* (2022) demonstraram isto em seu estudo sobre a síndrome mielodisplásica e sua relação com o microambiente da medula óssea. Como nesta doença há menor presença de tecido ósseo consequente de uma menor formação, e não reabsorção óssea, e que essa menor formação ocorre pela interação de células mielodisplásicas e leucêmicas com as CTMs, há a supressão do potencial osteogênico dessas células estromais. É importante ressaltar que células da linhagem óssea também são reguladoras da hematopoese, e ainda neste estudo, os autores confirmam que a diferenciação de CTMs para essa linhagem é essencial para recuperar a integridade da hematopoese.

Uma das dificuldades por trás da realização de transplantes medulares é a falha no processo de *engraftment* (“enxertamento”) que pode ocorrer. Isto depende não só da quantidade de CTHs transplantadas, mas como também da funcionalidade do microambiente medular (SANCHEZ-GUIJO *et al*, 2005.; PRECIADO *et al*, 2018).

Buscando melhorar o rendimento no transplante de células tronco, Preciado *et al* (2021) estudaram mecanismos por trás das CTM com potencial de influenciar nesse processo. A partir disto, os autores verificaram que a co-administração de CTM humanas com superexpressão de fator indutível por hipóxia 1 α aumentavam o rendimento de *engraftment* de células humanas CD34⁺ *in vivo*, sendo também visto um aumento significativo na expressão de CD34, CXCR4 e no gene codificante da integrina alfa 4 nas células mantidas em co-cultura com CTMs apresentando a superexpressão. Adicionalmente, células CD34⁺ mantidas nesta mesma co-cultura apresentarem maior potencial clonogênico. Isto sugere um potencial aplicabilidade das CTMs no âmbito do transplante medular.

Existem diversas populações de CTMs no microambiente medular, e essas também são populações heterogêneas com papéis distintos na regulação hematopoética. Entre estas, estão incluídas as células reticulares ricas em CXCL12 (CAR) e as células que expressam receptor para leptina (LepR⁺), que se sobrepõem com células marcadas com *green-fluorescent protein* (GFP) sob *promoter* de nestina (Nes-GFP⁺) (SUGIYAMA *et al*, 2006.; MENDEZ-FERRER *et al*, 2010.; DING *et al*, 2012.; MABUCHI *et al*, 2021).

Através de análises por imagem, foi revelado que células estromais emitindo um forte sinal de GFP entre as células Nes-GFP⁺ eram associadas com arteríolas medulares, enquanto que as células estromais com sinal fraco de GFP (LepR-Cre⁺) estavam associadas com capilares sinusoidais. O papel distinto dessas células sobre a hematopoese foi evidenciado através da depleção de genes codificantes de SCF ou de CXCL12 na fração Nes-GFP⁺, que resultou no esgotamento de CTHs na medula óssea. A remoção do gene de SCF em células LepR-Cre/tdTomato⁺ apenas reduziu o número de CTHs, enquanto que a remoção do gene *Cxcl12* resultou na redução e alteração de localização da população de CTHs (KUNISAKI *et al*, 2013.; DING *et al*, 2012.; OGURO *et al*, 2012.; OGURO *et al*, 2013.; ASADA *et al*, 2017.; MABUCHI *et al*, 2021).

2.4 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NA HEMATOPOESE

Conforme o envelhecimento, muitas mudanças ocorrem na medula óssea. Diferenças entre a medula óssea nos extremos de idade já foram descritas em modelos animais e em humanos, essas alterações envolvendo a celularidade da medula, diferenciação de linhagens, composição celular, e o funcionamento das CTH (GROARKE & YOUNG, 2019). Em 1987, seriam feitas uma das observações mais antigas do ambiente medular em relação ao envelhecimento, onde usando coelhos como modelo animal foram identificadas alterações histológicas, um menor número de osteoblastos e menor frequência de células hematopoéticas, assim como uma maior predominância de espaços “vazios”, menor fluxo sanguíneo, redução na formação óssea e a degeneração do tecido gorduroso da medula (KITA; KAWAI; HIROHATA, 1987).

Alterações na série vermelha são conhecidas entre idosos, sendo a anemia prevalente em 11% dos homens e 10% das mulheres com 65 anos ou mais. A partir desta faixa etária, as etiologias comuns para o desenvolvimento da anemia incluem a inflamação, doença renal crônica, deficiências nutricionais, e distúrbios clonais, como a síndrome mielodisplásica (GURALNIK *et al*, 2004.; GROARKE & YOUNG, 2019).

Além da série vermelha, o envelhecimento do sistema hematopoético também é representado pelo comprometimento dos sistemas imune adaptativos e inatos, gerando uma maior susceptibilidade a infecções e ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas, assim como o de doenças autoimunes (DORSHKIND; MONTECINO-RODRIGUEZ; SIGNER, 2009. HAQ & MCELHANEY, 2014.; KOVTONYUK *et al*, 2016). Sabe-se que a produção de células B diminui progressivamente conforme o avanço na idade do indivíduo, enquanto que o repertório de células B de memória cresce. A diversidade dessas células B também diminui, havendo também uma menor afinidade dos anticorpos. Como parte do sistema imunológico, também são vistas alterações nas células T e *Natural Killers* (KOVTONYUK *et al*, 2016).

Sobre as CTH, foi mostrado que com o passar dos anos, essas células CD34-Flt3⁻ aumentam a expressão de CD150, resultando na expansão do *pool* de CTH com tendência a se diferenciar para a linhagem mieloide (CHALLEN *et al*, 2010.; ROSSI *et al*, 2005.; BEERMAN *et al*, 2010.; KOVTONYUK *et al*, 2016). Esta tendência em se diferenciar para a linhagem mieloide pode ser um fator que comprometa o desenvolvimento de outros progenitores, modelos animais com idade avançada mostraram uma menor frequência de CLP, enquanto havia um aumento em GMP. A diminuição nesses progenitores acompanha uma redução na linfopoese de células B e no funcionamento desses progenitores linfóides, coincidindo com alterações no processo de sinalização celular (ROSSI *et al*, 2005.; KOVTONYUK *et al*, 2016).

Kuranda *et al* (2011) estudando os efeitos do envelhecimento na população celular da medula óssea mostrou que no ambiente hematopoético de indivíduos com mais de 70 anos há um aumento na proporção de células multipotentes CD34⁺CD38⁻, adicionalmente, foi visto que progenitores mielóides com perfil de imunofenotipagem CD34⁺CD38⁺CD90⁻CD45RA^{+/-}CD10⁻ e CD34⁺CD33⁺ persistem nos mesmos níveis. Em concordância com o postulado na literatura acerca da redução na população linfocitária, os autores também identificaram uma redução de células CD34⁺CD38⁺CD90⁻CD45RA⁺CD10⁺ e CD34⁺CD19⁺, sendo identificadas como progenitores linfóides do tipo B.

O envelhecimento de células hematopoéticas também é associado com um acúmulo de mudanças genéticas e epigenéticas, alterações no microambiente tanto de células maduras como imaturas, e alterações sistêmicas como a inflamação, sendo propostos mecanismos sobre como essas alterações podem favorecer o desenvolvimento de doenças hematológicas malignas (HENRY; MARUSYK; DEGREGORI, 2011).

Os mecanismos moleculares por trás do envelhecimento de CTH ainda são pouco compreendidos. O perfil de expressão gênica de CTH isoladas de modelos murínicos jovens e velhos mostram uma regulação altamente controlada de grupos de genes responsáveis por

linhagens específicas de maneira consistente com as mudanças funcionais que ocorrem conforme o envelhecimento das CTH (ROSSI *et al*, 2005.; GAZIT; WEISSMAN; ROSSI, 2008).

Como exemplo da importância dos mecanismos epigenéticos, tem-se a dinâmica da interação DNA-histona, sendo a metilação do DNA e acetilação de histona modificações epigenéticas proeminentes que regulam a diferenciação celular. Através estudos *ex vivo* foi sugerido que os inibidores de histona-deacetilases podem retardar a perda do potencial das células tronco *in vitro* e aumentar a capacidade de “enxertamento” (BUG *et al*, 2005.; YOUNG *et al*, 2004.; GAZIT; WEISSMAN; ROSSI, 2008).

Não diferentemente, o nicho hematopoético também está sujeito a alterações ao longo do envelhecimento. O envelhecimento do nicho afeta células tronco diretamente através de modificações na adesão celular e na secreção de moléculas sinalizadoras (NAKAMURA-ISHIZU & SUDA, 2014). A partir disto, a literatura descreve que CTH idosas expressam baixos níveis de integrina $\alpha 4$, integrina $\alpha 5$ e VCAM-1, enquanto eleva os níveis de P-selectina e integrina $\alpha 6$ quando comparado a células mais jovens (ROSSI *et al*, 2005.; GEIGER; KOEHLER; GUNZER, 2007.; NAKAMURA-ISHIZU & SUDA, 2014).

Análises *in vivo* da medula óssea de camundongos jovens e idosos mostraram que as CTH mais velhas se encontram mais distantes do endóstio do que os progenitores mais jovens, indicando a presença de mudanças extrínsecas na composição do nicho relacionadas com a idade, potencialmente impactando o funcionamento dessas CTH (KOEHLER *et al*, 2009.; HENRY; MARUSYK; DEGREGORI, 2011).

Ho *et al* (2019) compararam a remodelação de nichos hematopoéticos na medula óssea de camundongos mais velhos com mais novos e verificaram que os nichos (arteríolas, *transition zone vessels* e CTM expressando nestina) estavam reduzidos na superfície endosteal, enquanto capilares e células estromais que expressavam nestina expandiam nas áreas centrais (não endosteais) da medula óssea. O remodelamento do nicho está associado com um aumento em citocinas inflamatórias, como a IL-1A, IL-6, IFN- γ e IL-3, também sendo visto um aumento nas fibras nervosas noradrenérgicas do sistema nervoso simpático (RAAJIMAKERS, 2019).

Sendo conhecido o potencial de diferenciação das células estromais da medula óssea, Zhou *et al* (2008) testaram os efeitos da idade sobre a β -galactosidade, proliferação, apoptose, expressão de genes envolvidos na via p53 e na diferenciação e expressão gênica de osteoblastos. Neste estudo, os autores encontraram diminuições significativas na proliferação e diferenciação em osteoblastos, assim como um aumento na atividade de β -galactosidade, apoptose e na expressão dos genes da p53. Como as CTM são participantes ativos na regulação do ambiente

medular, pode-se sugerir que o envelhecimento também influencie no funcionamento do tecido hematopoético.

Contrariamente às células ósseas, estudos mostram que a adipogênese medular é aumentada conforme o envelhecimento. Primeiramente mostrado em 1994 com modelos murínicos SAMP6, foi achado que não somente esses animais apresentavam uma osteoblastogênese reduzida, como também um aumento no número de adipócitos maduros na medula óssea (TAKAHASHI *et al*, 1994.; BETHEL *et al*, 2013). Posteriormente, esse achado se repetiu em humanos, quando Justesen *et al* (2001) compararam biópsias ósseas, mostrando uma maior presença de tecido adiposo em indivíduos mais velhos.

Como mencionado anteriormente, nosso grupo já demonstrou uma relação entre a transformação adipogênica vista em um modelo de desnutrição proteica como um fator que leva a falência do sistema hematopoético, portanto, existe uma relação íntima entre o tecido adiposo com o funcionamento medular (CUNHA *et al*, 2013).

Em suma, o ambiente medular hematopoético é um sistema de alta importância para a homeostase do organismo e a literatura relata que ele também é suscetível a alterações conforme o envelhecimento da espécie. A alta complexidade e o pouco conhecimento por trás dos efeitos da idade na medula óssea são fatores que tornam necessário mais estudos na área para elucidar a dinâmica dos mecanismos regulatórios da hematopoese.

2.5 LINHAGEM CELULAR MURÍNICA DE LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA (C1498)

A leucemia mieloide aguda (LMA) é caracterizada como um distúrbio clonal maligno no qual células mieloides primitivas, possuindo defeitos genéticos, geram uma maturação e proliferação celular defeituosa (DRISS *et al.*, 2017). Estas células leucêmicas se acumulam no ambiente medular hematopoético, eventualmente causando defeitos na hematopoese, resultando em trombocitopenia, linfopenia e anemia. Nesta patologia, a disfunção pode afetar as vias de diferenciação granulocíticas, monocíticas, eritrocíticas ou megacariocíticas, além também de haver a invasão de células leucêmicas no tecido sanguíneo e em órgãos não-linfoides (FORTHUN *et al*, 2016; MOPIN; DRISS; BRINSTER, 2016).

Para melhor compreender a fisiopatologia da LMA, além de também ter potencial na busca de novas terapias, modelos de transplantes em animais baseados na injeção de blastos leucêmicos ou de linhagens celulares leucêmicas em camundongos imunocomprometidos se torna uma ferramenta valiosa nessa área (BRADNER & PINDELL, 1966; DRISS *et al*, 2017). Neste contexto, o modelo murínico de células C1498 (**figura 2**) tem sido usado por décadas como um modelo de leucemia aguda, desde o isolamento das células cancerígenas feito em

1941, realizado a partir de um camundongo fêmea C57BL/6 (H-2^b) com 10 meses de idade (MOPIN; DRISS; BRINSTER, 2016).

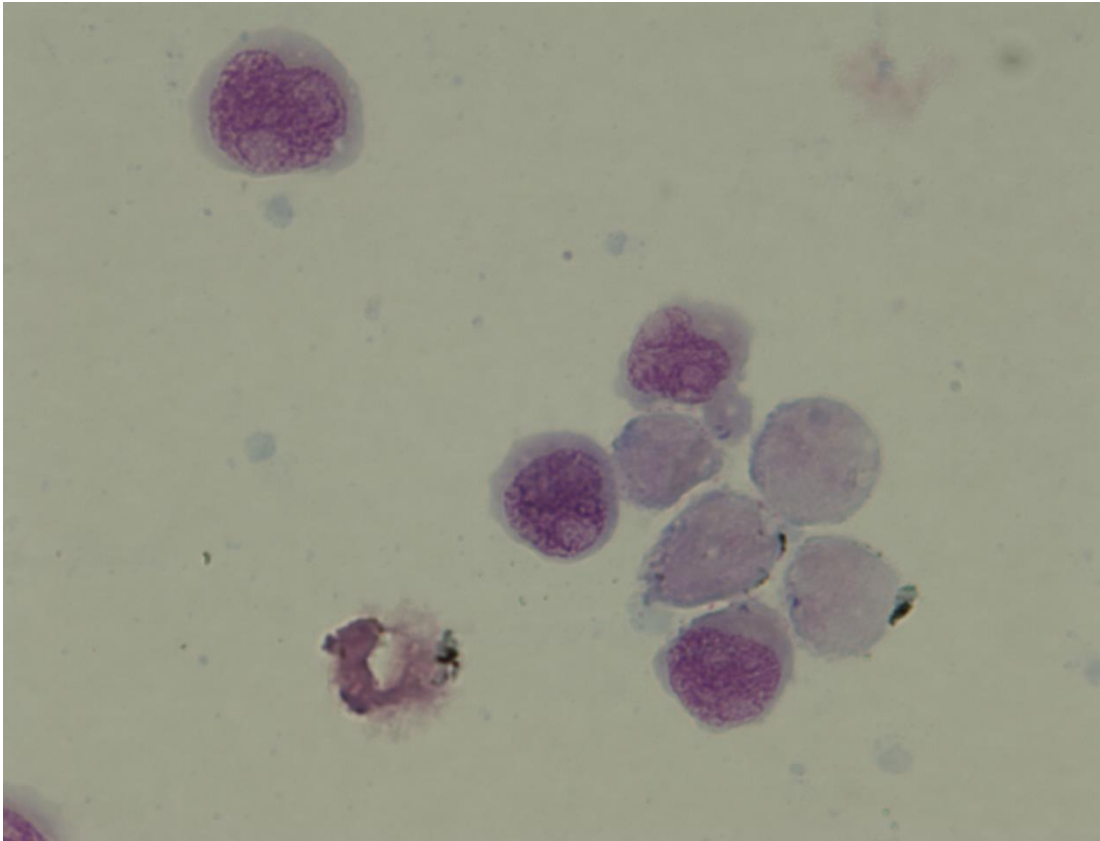


Figura 2. Micrografia óptica de blastos leucêmicos da linhagem C1498. Na foto, é possível notar a alta relação núcleo-citoplasma, cromatina frouxa, nucléolos evidentes e citoplasma sem a presença de grânulos, mostrando assim aspectos pertencentes à blastos da linhagem linfoide. Embora a célula apresente estes aspectos, a célula pertença à linhagem mieloide. Coloração: May-Grünwald-Giemsa. Aumento: 1000X.

Embora as células C1498 sejam conhecidas como de leucemia aguda, a natureza dessa neoplasia ainda não é inteiramente conhecida. Em modelo murínico, elas foram descritas como capazes de induzir leucemia granulocítica, mielomonocítica ou também de células *natural killers* (GOLDIE *et al*, 1953.; GRAHAM; WELCH; PATCHEN, 1975.; LABELLE & TRUITT, 2002). Partindo disto, Mopin, Driss e Brinster (2016) publicaram um protocolo para padronizar a caracterização da linhagem celular C1498, levando em consideração as limitações de técnicas como a imunofenotipagem por citometria de fluxo para essas células com poucos marcadores descritos na literatura.

Estudos mencionam a capacidade das células C1498 em inibir as células tronco hematopoéticas normais na medula óssea em murinos. Neste mesmo estudo de Quesenberry *et al.* (1978), foi notado uma diminuição na recuperação de progenitores granulocíticos quando

os blastos leucêmicos foram misturados com células de medula óssea normal em câmaras de difusão *in vitro*. Também foram notados efeitos inibitórios na produção de células diferenciadas puderam ser observados a partir de uma maior proporção de blastos para células normais, levando os autores a concluírem que as células leucêmicas inibem células normais da medula óssea a partir da liberação de uma substância inibitória difusível.

Nosso laboratório utilizou células C1498 para elucidar sobre o funcionamento de células tronco mesenquimais no ambiente hematopoético em situação de desnutrição proteica. Com base nisto, Hastreiter *et al.* (2021) investigou os efeitos dessa desnutrição na atividade regulatória do processo hematopoético de células tronco mesenquimais, sendo constatado que sobrenadantes de células tronco mesenquimais influenciavam na proliferação celular, visto que esses sobrenadantes obtidos de animais em desnutrição proteica aumentaram a proliferação de células C1498, bem como as modularam a partir da expressão do gene *Ccnd1*, responsável pela proteína ciclina D1, e também pela redução do gene *Cdkn1b*, que codifica a proteína p27, inibidora do ciclo celular.

Em outra pesquisa do nosso grupo utilizando células C1498, desta vez envolvendo células endoteliais medulares em condição de desnutrição proteica, verificou-se que o ciclo celular desses blastos estava alterado na desnutrição. Após 4 dias da infusão destas células, elas foram encontradas mais frequentemente na medula do grupo desnutrido quando comparado ao controle, porém, essas encontravam-se com menor capacidade proliferativa e, também de forma mais frequente, nas fases G₀ e G₁ do ciclo celular. Com isto, foi possível concluir que o ambiente hematopoético em situação de desnutrição proteica não é viável para sustentar a hematopoese (HASTREITER *et al.*, 2020).

Com o avanço de pesquisas na área do ambiente hematopoético, evidências tem mostrado que células leucêmicas possuem a capacidade de remodelar a medula, de modo que favoreça o desenvolvimento da doença maligna (SHAFAT *et al.*, 2017). Elucidando melhor o relacionamento entre células malignas com o estroma medular, Zhang *et al.* (2022) demonstraram que células de LMA, incluindo a C1498, alteram o metabolismo energético de CTMs, além de também alterar a capacidade de diferenciação das CTMs, proporcionando maior adipogênese com adipócitos, células que estão relacionadas com a proliferação e sobrevivência de blastos leucêmicos (SHAFAT *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Tendo em vista que as CTMs influenciam a regulação da hematopoese e que o envelhecimento afeta o organismo de diversas formas, este trabalho teve como objetivo investigar como o envelhecimento afeta a regulação da hematopoese através das CTMs.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil de camundongos jovens e idosos, com base nos seus padrões de consumo de ração, consumo proteico e pela variação de massa corporal;
- Investigar e comparar o perfil bioquímico (Proteínas totais, albumina, uréia, creatinina, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, colesterol e triglicerídios) e hematológico (hemograma e mielograma) entre animais jovens e idosos;
- Definir as populações celulares presentes na medula óssea dos animais jovens e idosos através da citometria de fluxo;
- Mensurar o secretoma e os níveis de expressão de RNAm, pelas CTM medulares de animais jovens e idosos, relacionados ao controle da hematopoese;
- Estudar os efeitos das CTM medulares de camundongos jovens e idosos sobre a hematopoese avaliando proliferação e migração celular;
- Avaliar os efeitos das CTM medulares dos grupos controle e idoso sobre a regulação hematopoética de células C1498, através da ampliação de genes envolvidos na regulação da hematopoese.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

Foram utilizados camundongos machos da linhagem C57BL/6, jovens (3 a 5 meses de idade) e idosos (18 e 19 meses de idade), todos isogênicos. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), protocolo CEUA n° 544.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Sangue Total e Soro

Os animais foram submetidos a anestesia utilizando cloridrato de quetamina (50 mg/Kg de massa corporal, Ketamina[®], Cristália) e cloridrato de xilazina (50 mg/Kg de massa corporal, Rompum[®], Bayer) por via intramuscular. Com isto, foi feita a coleta de sangue total com anticoagulante EDTA 10% para o hemograma e amostras foram também coletadas sem anticoagulante para obter o soro a fim de realizar as dosagens de proteínas totais, albumina, ureia, creatinina, AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase), colesterol e triglicerídeos. As determinações foram realizadas no aparelho automatizado COBAS c501 (ROCHE). O hemograma foi realizado no equipamento ABX Micros ABC Vet (Horiba ABX, Montpellier, França) e a contagem diferencial dos leucócitos foi realizada em extensões sanguíneas, coradas pela coloração de May Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947).

Com intuito de identificar as populações sanguíneas, parte das amostras mencionadas anteriormente foram utilizadas para realizar a imunofenotipagem de células. As amostras foram marcadas com anticorpos por 15 minutos, utilizando 10 µL de cada anticorpo para os tipos celulares. Estes anticorpos foram diluídos em uma proporção de 1:200 com PBS, 1% de Albumina e 0.05% de Azida. As amostras foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente sob proteção da luz. Em seguida, as células foram suspensas novamente em 180 µL de PBS para serem processadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur[™], BD Biosciences, CA, EUA). Neste, foram utilizados os lasers de argônio 488 nm e diodo 633 nm. A emissão da fluorescência foi captada nos canais correspondentes: Isotiocianato de Fluoresceína (FITC: FL-1), Ficoeritrina (PE: FL-2), Ficoeritrina/Cianina 7 (PECy7: FL-3) e Aloficocianina (APC: FL-4). Ao todo, foram capturados de 50.000 a 300.000 eventos. A análise dos dados obtidos através

da citometria foram analisados utilizando o programa FlowJo[®] 10 (Tree Star[®], Nova Iorque, EUA). Detalhes sobre os anticorpos utilizados podem ser encontrados na **tabela 1**.

4.2.2 Mielograma e Imunofenotipagem Medular

Após anestesiados conforme descrito anteriormente, os animais foram exsanguinados e submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Em seguida, o fêmur foi seccionado entre a articulação fêmur-íliaca e fêmur-tibial para lavagem da cavidade femural e das tíbias utilizando 2 mL de meio DMEM baixa glicose (Cultilab[®], Campinas, Brasil), a fim de obter a suspensão celular. Esta foi mantida em tubos Falcon no gelo para realização do mielograma e cultura celular. Uma alíquota deste material foi diluída em líquido de Turk para a contagem de células nucleadas na câmara de Neubauer. Lâminas de citocentrifugado (Incibrás[®], Brasil) foram confeccionadas e também coradas pelo método May-Grunwald-Giemsa modificado (ROSENFELD, 1947) para a contagem diferencial.

Para a identificação das diferentes populações de células hematopoéticas, foram utilizados anticorpos conjugados com os fluorocromos FITC, PE, PECy7 e APC, por quais foram analisadas 3×10^6 células/amostra. O preparo de amostras com os seus anticorpos seguiu conforme descrito no item 4.2.1, detalhes sobre os anticorpos utilizados para as populações de células medulares encontra-se disponível na **tabela 1**.

Na imunofenotipagem de células hematopoéticas, foram utilizados como marcadores uma variedade de anticorpos e um marcador de viabilidade (FVS780, BD Biosciences, Nova Jersey, EUA). As populações celulares avaliadas foram: CTH ($\text{Lin}^- \text{Flk2}^- \text{Thy1.1}^{\text{low}} \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+ \text{CD34}^-$), MPP ($\text{Lin}^- \text{Flk2}^- \text{Thy1.1}^{\text{low}} \text{Sca-1}^- \text{c-Kit}^+$), CLP ($\text{Lin}^- \text{Il7r}^{\text{low}} \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$), CMP ($\text{Lin}^- \text{Il7r}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{CD34}^+ \text{CD16/32}^{\text{low}}$), GMP ($\text{Lin}^- \text{Il7r}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{CD34}^+ \text{CD16/32}^{\text{high}}$), e MEP ($\text{Lin}^- \text{Il7r}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{CD34}^- \text{CD16/32}^{\text{low}}$).

ANTICORPOS	POPULAÇÃO
CD34 (RAM34, FITC), IL7 α (SB/199, FITC), Sca-1 (D7, FITC), CD11b (M1/70, FITC) CD3 (145-2C11, PE), CD11b (M1/70, PE), Ter119 (TER119, PE), Ly6G (RB6-8C5, PE), CD19 (MB19-1, PE), Flk2 (A2F10.1, PE), IL7 α (SB/199, PE) e Sca-1 (D7, PE) CD16/32 (2.4G2, PECy7), Thy1.1 (OX-7, PECy7) e Sca-1 (D7, PECy7) c-Kit (2B8, APC) e F4/80 (BM8, APC)	Linhagens Hematopoéticas

CD3 (145-2C11, FITC), CD4 (RM4-5, PE), CD8 (SK1, PE) B220 (RA3-6B2, PE), CD49b (DX5, APC), NK.1.1 (PK136, PE), CD11b (M1/70, FITC), F4/80 (BM8, APC), Gr-1 (RB6-8C5, PE)	Células do Sangue Periférico
CD14 (Sa2-8, PE), CD34 (RAM34, PE), CD45 (RA3-6B2, FITC), CD90 (PE), CD271 (C40-1457, FITC), CD73 (AD2, PE) e CD105 (266, FITC)	Célula Tronco Mesenquimal

Tabela 1: Relação de populações celulares estudadas e seus respectivos anticorpos utilizados na imunofenotipagem.

4.2.3 Coleta, Isolamento e Caracterização de CTMs

O isolamento das CTMs dos animais foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Friedstein et al (1976), baseada na capacidade dessas células possuem em aderir ao plástico em meio de cultura com baixa concentração de glicose, também livrando-as de outras células que necessitam de altas concentrações de glicose para sobreviver (COLTER *et al*, 2000). Após a obtenção das células da medula óssea, as CTMs dos animais pertencentes ao grupo controle e idoso foram isoladas e cultivadas em atmosfera umidificada (95%), a 37°C e 5% de CO₂. O crescimento e a morfologia das CTMs foram monitorados a cada 48 horas em microscópio invertido e o meio de cultura foi trocado no 3º, 7º e 14º dia após seu isolamento da medula óssea.

A caracterização destas células estromais foi feita por citometria de fluxo. Para a confirmação do fenótipo da CTM, as culturas celulares foram centrifugadas por 10 minutos a 300g em temperatura ambiente. Efetuada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular suspenso novamente em 400µL de PBS, pH 7,2 e com 2 a 5 µL de anticorpos para cada 1 x 10⁶ células/mL. Em seguida, foi realizada incubação por 20 minutos, em temperatura ambiente.

Posteriormente, o sedimento celular foi centrifugado por 10 minutos a 300g, na mesma temperatura. O sobrenadante então foi desprezado e o sedimento suspenso novamente em 500µL de PBS, sendo realizada a centrifugação por 10 minutos a 300g, em temperatura ambiente. Após uma nova lavagem, foram adicionados 400µL de PBS em pH 7,2 e realizadas as aquisições em citômetro de fluxo. A relação de anticorpos utilizados está disponível na **tabela 1**, sendo feito controle negativos por *fluorescence minus one* (FMO). Após a marcação com os

anticorpos, o perfil fenotípico dessas células foi obtido por citometria de fluxo (BD FACSCanto II[®], BECTON DICKSON, San Jose, EUA) e analisado pelo *software* FlowJo[®]10 (Tree Star Inc., Ashland, EUA).

Além da citometria, foi avaliada também a capacidade de diferenciação das CTMs (dados não mostrados) usando o *kit Mouse Mesenchymal Stem Cell Functional Identification* (Catálogo SC010 – R&D Systems, Abingdon, Reino Unido). As CTMs obtidas foram cultivadas em placas de 24 poços e submetidas a diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos (HASTREITER *et al*, 2021).

Para a linhagem adipocítica, $3,7 \times 10^4$ células foram semeadas nos poços e mantidas por 24 horas em meio de cultura fornecido com o *kit*. Passado o período, todo o meio de cultura foi removido e em seguida foram adicionados 500 μ L de meio α -MEM suplementado com 10% de SBF e 1% de suplemento adipogênico (fornecido com o *kit*) para induzir a diferenciação em adipócitos. A diferenciação foi confirmada através de imunocitoquímica com o anticorpo FABP4, fornecido no *kit*.

A diferenciação para a linhagem óssea (osteoblastos) foi feita através do cultivo de $7,4 \times 10^3$ células tratadas com 1 μ g/mL de fibronectina. Em seguida, foi mantido o cultivo com meio α -MEM conforme descrito anteriormente, dessa vez utilizando suplemento osteogênico fornecido com o *kit*. O período para diferenciação de CTMs em osteoblastos foi de 14 dias. Em seguida, foi avaliada a morfologia das células através de microscopia de contraste de fase com a coloração vermelho de alizarina, além de também confirmar a diferenciação por imunocitoquímica.

Para realizar a diferenciação em condrócitos, foram semeadas $2,5 \times 10^5$ células em tubos. Estas células foram cultivadas por 24 horas em meio fornecido com o *kit* e, passado o período, o meio foi removido para adicionar o meio de indução com suplemento condrogênico 1%. O período de diferenciação durou 21 dias. Em seguida, o pellet foi fixado com 4% paraformaldeído para criosecção. A morfologia do tecido formado foi avaliada pela coloração das criosecções com azul de toluidina.

Adicionalmente, as CTMs foram avaliadas quanto ao perfil de senescência celular (dados não mostrados. DA SILVA *et al*, 2022). Para isto, 1×10^5 CTMs/mL foram cultivadas durante 24h utilizando o *kit* de β -galactosidade (Cell Signaling Technology Inc, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

4.2.4 Avaliação de Citocinas Produzidas por CTMs

Para investigar se o envelhecimento é capaz de afetar as CTMs no âmbito de produção de citocinas envolvidas na regulação da hematopoese, foram coletados os sobrenadantes das mesmas para dosar a produção de CXCL12, SCF, IL-6, IL-11, NOS e IL-3 por ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (Quantikine® ELISA, R&D Systems, Abingdon, Reino Unido), seguindo as orientações do fabricante.

4.2.5 Expressão Relativa de mRNA de CTMs

Após o cultivo das CTM feito o preparo de amostras para análise de expressão relativa de RNA mensageiro (mRNA). Com isto, foi extraído o RNA total utilizando o kit de extração RNeasy (Qiagen, Germantown, MD, EUA), segundo as recomendações do fabricante. O RNA total foi transcrito reversamente em cDNA (DNA complementar) com o *kit* de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Estas amostras foram amplificadas no *TaqMan fast advanced master mix* (Applied Biosystems), utilizando o Rn18s (Mm03928990_g1) como controle interno. Como genes de interesse, foram adotados aqueles com relação no processo de regulação hematopoética: *sp7* (Mm04209856_m1), *Ppar-γ* (Mm01184322_m1), *Angpt1* (Mm00456503_m1), *Csf3* (Mm00432735_m1), *Nos* (Mm00440502_m1), *mTORC1* (00444968_m1), *Akt1* (Mm01331626_m1) e *Cdh2* (Mm01162497_m1).

A expressão gênica foi avaliada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR) utilizando o equipamento *Step One Plus™* (Applied Biosystems, Foster City, CA). O volume total de reação de 10 µL foi composto de 1,0 µL de cDNA, 5,0 µL de *TaqMan® Fast Universal Master Mix* (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA), 0,5 µL de cada iniciador (*sense* e *antisense*) marcado com sonda FAM e referência passiva ROX – e 3,5 µL de água livre de DNase e RNase. As condições de ciclagem foram: pré-incubação por 2,0 minutos a 50°C e por 20 segundos a 95°C para desnaturação das dupla-fitas de cDNA, seguido de 40 ciclos de 01 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C.

Os valores quantitativos da expressão gênica foram obtidos pelos valores do Ct, caracterizado pelo início da amplificação do produto de PCR. Para a quantificação da expressão gênica, foi empregado o método de quantificação relativa (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001) segundo a fórmula: Taxa de expressão relativa = $2^{-(\Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ calibrador})} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$. O ΔCt foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média geométrica dos Cts do controle endógeno para a normalização dos dados. A média geométrica do ΔCt das CTMs

do grupo controle foi utilizada como calibrador, empregada como base para resultados comparativos.

4.2.6 Efeitos das CTMs sobre a Proliferação Celular de C1498

Para avaliar os efeitos das CTMs sobre a proliferação celular, células da linhagem C1498 foram cultivadas na concentração de 2×10^5 /mL em placas de 24 poços com sobrenadante de CTMs e DMEM (baixa glicose, Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) suplementado com 10% SBF (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) e 0,1% penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) (Sigma Aldrich[®], St. Louis, USA). Após 24 horas de cultura as células foram coletadas e contadas manualmente em câmara de Neubauer. Os resultados foram atribuídos em porcentagem em relação ao número de células inicialmente semeadas.

4.2.7 Efeitos das CTMs Sobre a Migração Celular de Células C1498

Para avaliar os efeitos das CTMs sobre a migração de células C1498, foram cultivadas 1×10^6 células C1498 em placas de 24 poços contendo poços tipo *transwell* de 12mm de diâmetro e poro de 8 μ m. Na camada superior do *transwell*, foi adicionado a quantidade de células mencionada em 300 μ L de meio DMEM sem suplementação com soro bovino fetal. Na câmara inferior, foram adicionados 300 μ L de meio condicionado de CTMs ou DMEM sem SBF (controle negativo). A placa foi incubada durante 6 horas e, passado este período, as células que migraram para a camada inferior foram coletadas, coradas em azul de trypan e contadas em câmara de Neubauer. A **figura 3** ilustra o sistema experimental.

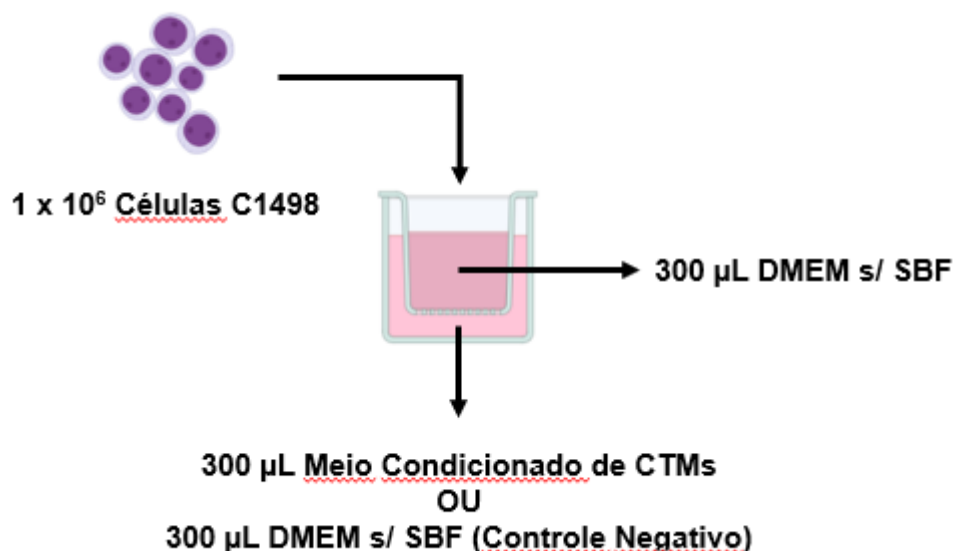


Figura 3. Ilustração demonstrando como o sistema para avaliar migração celular foi montado. Células foram colocadas em *transwells* com poro de 8µm e deixadas migrar por um período de 6 horas. Passado este período, as células na câmara inferior foram coletadas e contadas em câmara de Neubauer. Figura feita utilizando o BioRender®.

4.2.8 Efeito de CTMs Sobre a Regulação Hematopoética de Células C1498

Para avaliar a regulação das CTMs sobre as células C1498, foram preparadas culturas condicionadas de células C1498 (TIB-49™, ATCC®) com o sobrenadante de CTMs de ambos os grupos. Esta cultura condicionada foi incubada durante 24 horas utilizando 1 x 10⁶ células C1498/mL cultivadas em meio DMEM baixa glicose (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Vitrocell Embriolife, Campinas, Brasil), 100 UI/mL de penicilina G sódica (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) e 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, EUA) em placas de cultura de 24 poços. Passadas as 24 horas, o sobrenadante foi coletado para realizar a extração de RNA e transcrição desse em cDNA, conforme descrito anteriormente.

As amostras de cDNA foram amplificadas utilizando o *TaqMan Universal Master Mix* com os seguintes *primers*: *Ccne1* (Mm01266311_m1), *Cdkn1a* (Mm00432448_m1), *Sox2* (Mm03053810_s1), *Nanog* (Mm02019550_s1), *Pou5f1* (Mm03053917_g1), *Gata3* (Mm02019550_s1), *Spi1* (Mm02019550_s1), *Cxcr4* (Mm01292123_m1), *Cebpa* (Mm02019550_s1) e *Akt1* (Mm00437444_g1). O *Gapdh* (Mm99999915_g1) foi utilizado como controle endógeno e todos os primers foram adquiridos através da Applied Biosystems (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA).

A determinação da expressão dos avaliados foi feita por PCR em tempo real e comparados pelo método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, conforme descrito anteriormente.

4.2.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 9.1.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, EUA). Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva Normal (curva Gaussiana). Posteriormente, os dados obtidos foram comparados utilizando o teste T de Student. O nível de significância adotado para a análise estatística foi de 5% (p-valor < 0.05).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO MODELO

5.1.1 Consumo de Ração

Após a passagem dos dias de adaptação, os animais foram separados em grupo controle, composto por camundongos de idade entre 3 a 5 meses, e grupo idoso, constituído por animais com 18 e 19 meses de idade. A **figura 4** mostra o padrão de consumo de ração entre os grupos comparados. Durante o período do estudo, pode-se notar que não houve diferença significativa no consumo de ração entre animais jovens e idosos.

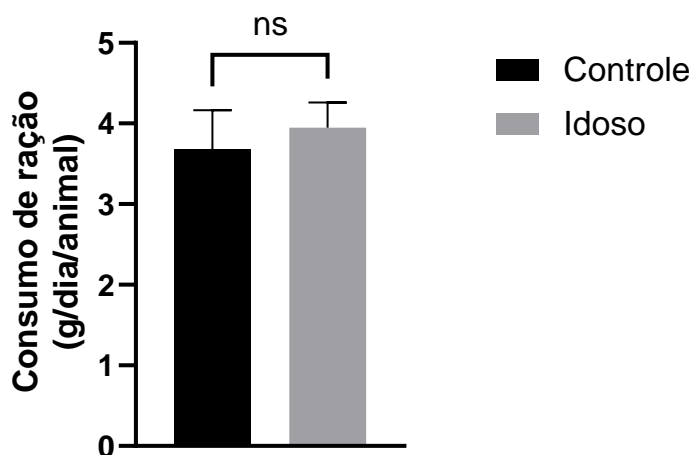


Figura 4. Consumo de ração entre animais dos grupos controle (n = 10) e idoso (n = 10) em gramas por dia. Variáveis não apresentaram diferença significativa quando comparadas pelo teste T de Student. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. ns: não significativo.

5.1.2 Consumo de Proteína

Durante o período do estudo, os animais do grupo controle e idoso ingeriram quantidades similares de proteína diariamente, não apresentando diferenças nos padrões de consumo proteico. A **figura 5** representa os níveis de consumo proteico nos grupos estudados. O cálculo de consumo proteico foi baseado na dosagem de proteínas em cada lote de ração utilizada.

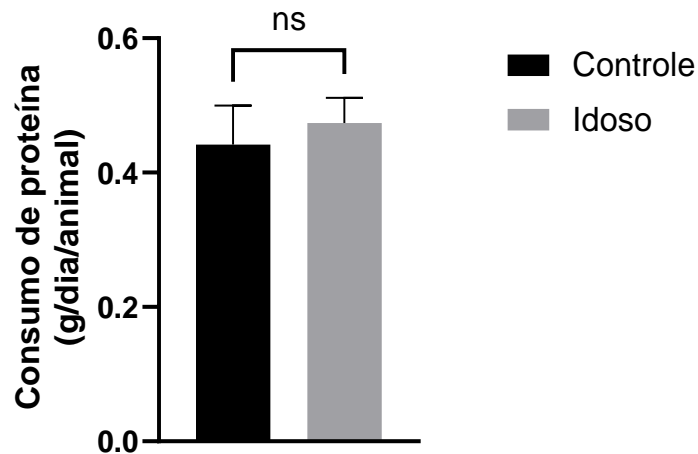


Figura 5. Consumo de proteína entre animais do grupo controle (n = 10) e idoso (n = 10). Variáveis não apresentaram diferença significativa quando comparadas pelo teste T de Student. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. ns: não significativo.

5.1.3 Variação de Massa Corpórea

Durante o acompanhamento dos animais, foi realizada o acompanhamento da massa corporal conforme o período de envelhecimento. A **figura 6** mostra o percentual de variação da massa corpórea dos animais através de uma relação entre o peso inicial do animal com a massa durante o experimento. De modo geral, não foi vista uma alteração significativa na variação da massa.

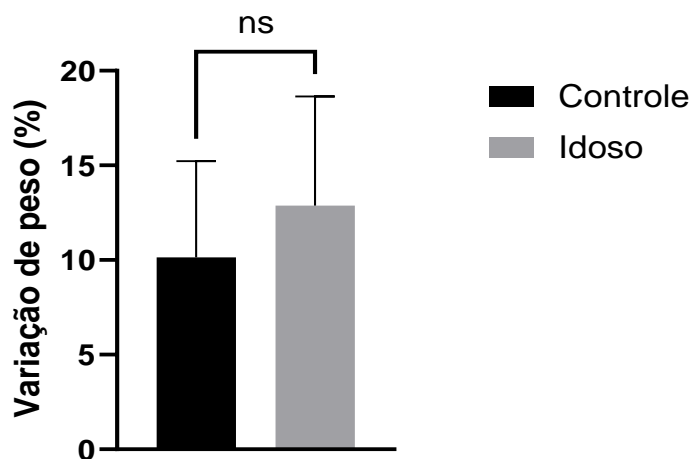


Figura 6. Variação de massa corporal entre animais do grupo controle (n = 10) e idoso (n = 10). A variação foi calculada através de uma relação entre massa inicial dos animais com suas respectivas massas durante o experimento. Variáveis não apresentaram diferença significativa quando comparadas pelo teste T de Student. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. ns: não significativo.

5.2 AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA

5.2.1 Proteínas Totais

Foi realizada a dosagem de proteínas totais entre os grupos de animais estudados. A **figura 7** representa as médias obtidas nos grupos controle e idoso. Não foi notada uma diferença significativa durante a comparação.

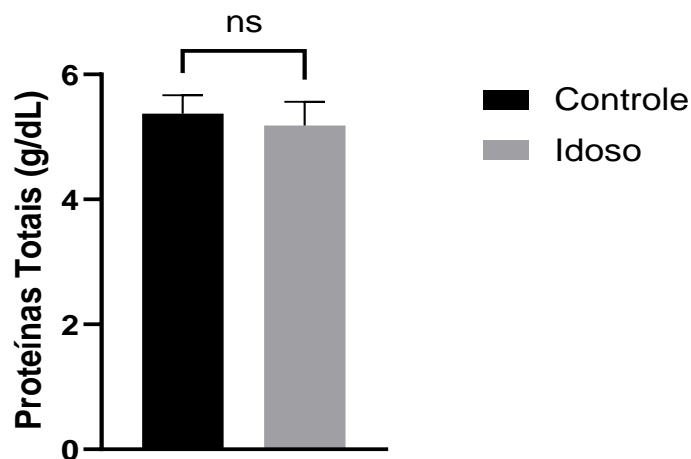


Figura 7. Níveis de proteínas totais nos animais do grupo controle (n = 10) e idoso (n = 10). Variáveis não apresentaram diferença significativa quando comparadas pelo teste T de Student. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. ns: não significativo.

5.2.2 Albumina

Comparando o grupo controle com o grupo idoso, notou-se uma diferença significativa (p-valor = 0.0143, Intervalo de Confiança 95% - IC95% = -0.5325 a -0.06752) nos níveis de albumina sérica. A **figura 8** mostra como o grupo controle (n = 10) apresentou uma concentração média de Albumina igual a 3.270 ± 0.287 g/dL (média \pm desvio padrão), enquanto o grupo idoso apresentou níveis de 2.970 ± 0.200 g/dL.

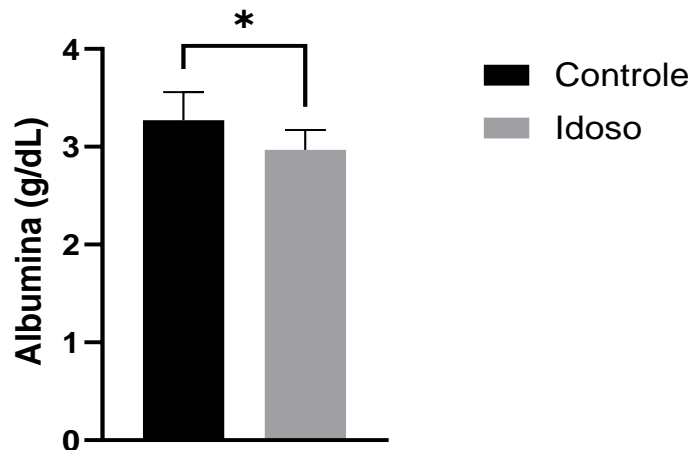


Figura 8. Níveis sorológicos médios de Albumina sérica em gramas por decilitro comparado entre o grupo controle (n = 10) e idoso (n = 10). Para comparação entre grupos, foi adotado o teste T de Student. Variáveis foram expressas na forma de média \pm desvio padrão e apresentaram diferença significativa, onde * representa valor significativo para p-valor < 0.05.

5.2.3 Uréia

Na comparação dos níveis séricos de ureia, não foi notada uma diferença significativa entre o grupo controle e grupo idoso. A **figura 9** mostra os níveis de Ureia obtidos nos grupos estudados.

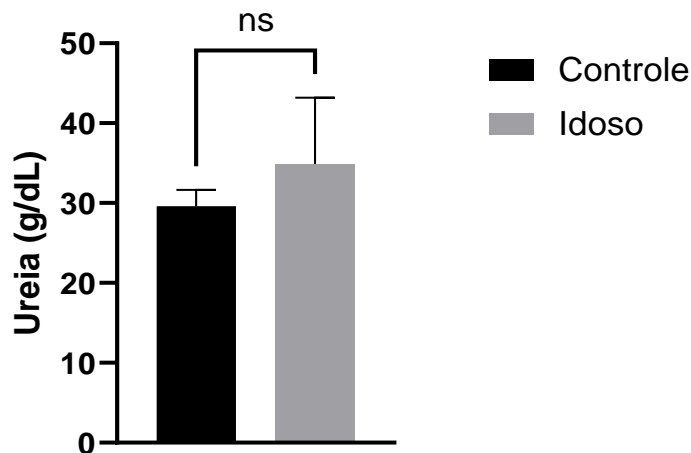


Figura 9. Níveis séricos médios de Ureia em gramas por decilitro quantificados nos animais de grupo controle (n = 10) e idoso (n = 10). Variáveis não apresentaram diferença significativa quando comparadas pelo teste T de Student. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. ns: não significativo.

5.2.4 Creatinina

Comparando os níveis séricos de Creatinina entre o grupo controle e grupo idoso, não foi notada diferença significativa. A **figura 10** representa os valores médios de creatinina obtidos nos grupos.

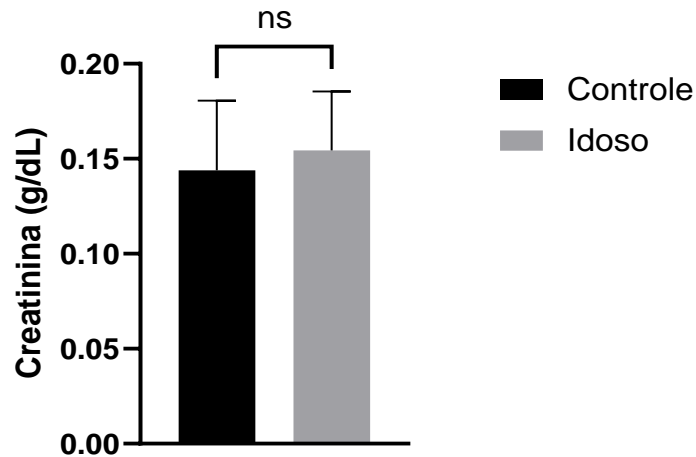


Figura 10. Valores médios de creatinina sérica em grama por decilitro obtidos nos grupos controle (n = 10) e idoso (n = 10). Variáveis não apresentaram diferença significativa quando comparadas pelo teste T de Student. Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão. ns: não significativo.

5.2.5 Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)

Avaliando a função hepática dos animais, foi feita a mensuração dos níveis de AST e ALT, comparando o grupo controle com o grupo idoso. Para AST, não foi vista diferença entre os grupos. Entretanto, os níveis de ALT diferiram de maneira significativa (p-valor = 0.0128; Intervalo de Confiança 95% - IC95% = -11.09 a -1.509). Para os níveis de ALT, os animais do grupo controle apresentaram valores de 37.80 ± 3.327 U/L (média \pm desvio padrão), enquanto o grupo idoso apresentou níveis de 31.50 ± 6.399 U/L (média \pm desvio padrão). A **figura 11** representa os valores obtidos entre os grupos, bem com suas comparações.

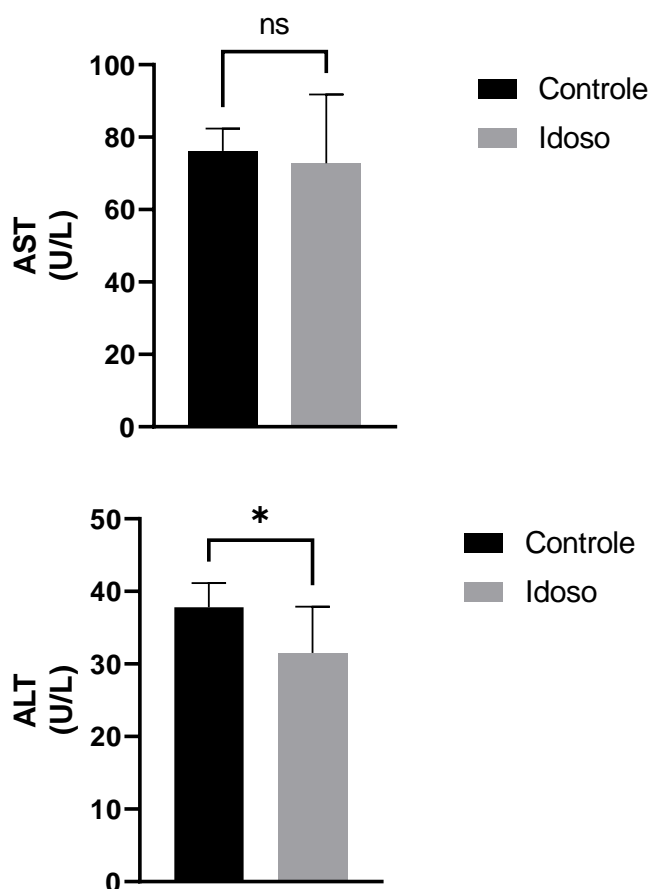


Figura 11. Valores médios de AST e ALT séricas em unidades por litro obtidas nos grupos controle ($n = 10$) e idoso ($n = 10$). Para comparação entre grupos, foi adotado o teste T de Student. Não foi vista diferença significativa quando comparado os níveis de AST entre os grupos estudados, porém, os níveis de ALT apresentaram diferença significativa, onde * representa valor significativo para p -valor < 0.05 . As variáveis foram representadas na forma de média \pm desvio padrão. ns: não significativo.

5.2.6 Colesterol

Comparando os níveis de colesterol sérico entre os grupos controle e idoso, foi notada diferença significativa (p -valor = 0.0003; Intervalo de Confiança 95% - IC95% = 13.48 a 37.52). No grupo controle ($n = 10$), foi observado níveis de colesterol de 119.2 ± 12.37 mg/dL (média \pm desvio padrão), enquanto que o grupo idoso ($n = 10$) apresentou valores de 144.7 ± 13.20 mg/dL (média \pm desvio padrão). A **figura 12** representa os valores obtidos e a comparação realizada.

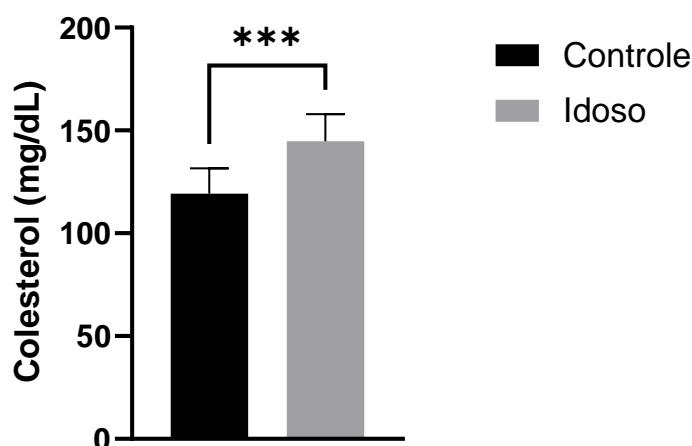


Figura 12. Mensuração dos níveis séricos de colesterol em miligramas por decilitro nos animais do grupo controle (n = 10) e idoso (n = 10). As variáveis foram comparadas pelo teste T de Student e apresentaram diferença estatística significativa, onde *** representa um p-valor ≤ 0.001 . Os resultados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão.

5.2.7 Triglicerídeos

Para os níveis de triglicerídeos, os grupos controle (n = 10) e idoso (n = 10) apresentaram diferença significativa (p-valor = < 0.0001 ; Intervalo de Confiança 95% - IC95% = -16.12 a - 7.879). O grupo controle apresentou níveis de triglicerídeos de 63.70 ± 5.272 mg/dL (média \pm desvio padrão), enquanto que o grupo idoso apresentou valores de 51.70 ± 3.268 mg/dL (média \pm desvio padrão). A **figura 13** representa os valores médios obtidos nos grupos, assim como a comparação realizada.

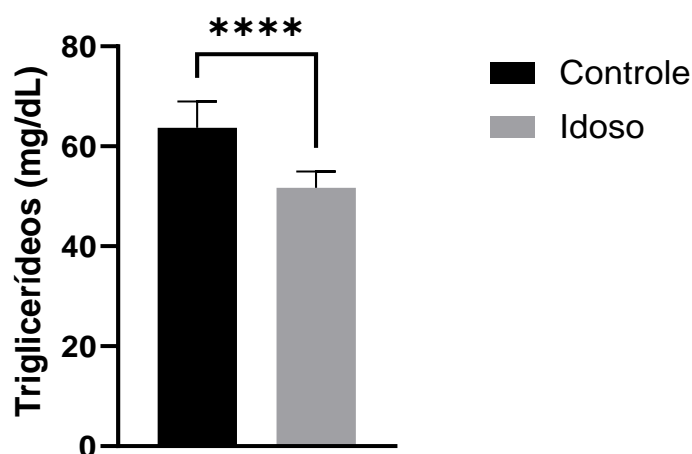


Figura 13. Valores médios de triglicerídeos em miligrama por decilitro obtidos nos grupos controle (n = 10) e idoso (n = 10). Variáveis foram comparadas pelo teste T de Student e apresentaram diferença significativa, onde **** representa um p-valor < 0.0001 . Os valores foram representados na forma de média \pm desvio padrão.

5.3 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

5.3.1 Hemograma

Apesar do envelhecimento, não foi notada diferença significativa em nenhum dos parâmetros hematológicos analisados entre os animais do grupo controle (n = 10) e grupo idoso (n = 10). Os resultados do hemograma estão representados na **tabela 2**.

Parâmetros	Grupo Controle (n = 10)	Grupo Idoso (n = 10)	p-valor
Eritrograma			
Hemácias ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5.906 ± 1.490	5.348 ± 0.935	ns
Hemoglobina (g/dL)	8.540 ± 2.068	7.820 ± 1.520	ns
Hematócrito (%)	25.77 ± 6.340	24.41 ± 1.422	ns
Leucograma			
Leucócitos ($/\text{mm}^3$)	1.710 ± 0.463	1.600 ± 0.527	ns
Neutrófilos	424.1 ± 340.4	325.2 ± 202.3	ns
Eosinófilos	10.80 ± 18.07	16.00 ± 17.81	ns
Monócitos	48.20 ± 30.71	30.80 ± 36.48	ns
Linfócitos	1280 ± 393.2	1231 ± 599.8	ns

Tabela 2. Valores obtidos a partir da realização do hemograma em animais do grupo controle (n = 10) e grupo idoso (n = 10). Para comparação, foi adotado o teste T de Student, o qual não detectou nenhuma diferença estatística significativa entre os parâmetros analisados. Os valores estão representados na forma de média \pm desvio padrão. ns: não significativo.

5.3.2 Mielograma

Verificando os aspectos hematológicos da medula óssea, pode-se notar que o grupo idoso (n = 6) apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle (n = 6) na contagem total de células, tendo uma média de $11.07 \pm 0.53 \times 10^6$ células/mL comparado a $14.8 \pm 0.18 \times 10^6$ células/mL no grupo controle.

Também houve diferença no número de precursores granulocíticos, onde o grupo idoso apresentou valores médios de $6.22 \pm 0.23 \times 10^5$ células/mL, comparado a $4.55 \pm 0.21 \times 10^5$ células/mL do grupo controle. Os precursores eritroblásticos no grupo idoso apresentaram valores de $4.79 \pm 0.58 \times 10^5$ células/mL comparado a $6.03 \pm 0.36 \times 10^5$ células/mL no grupo controle.

Na contagem de eritroblastos maduros também houve diferença significativa, com o grupo idoso apresentando $24.89 \pm 4.89 \times 10^5$ células/mL comparado a $36.12 \pm 1.35 \times 10^5$ células/mL no grupo controle. Todos os valores previamente mencionados foram representados na forma de média \pm desvio padrão.

A **tabela 3** representa os valores médios obtidos no mielograma.

Parâmetros	Controle n=6	Idoso n=6
Total de Células ($\times 10^6$ /mL)	14,8 \pm 0,18	11,07 \pm 0,53*
Blastos ($\times 10^5$ /mL)	2,96 \pm 0,48	2,78 \pm 0,03
Granulócitos ($\times 10^5$ /mL)		
Precursores	4,55 \pm 0,21	6,22 \pm 0,23*
Bastonetes	9,51 \pm 0,78	7,73 \pm 1,40
Segmentados	37,42 \pm 2,37	36,84 \pm 9,41
Eosinófilos	2,76 \pm 0,67	2,89 \pm 1,32
Precursores Eritroblásticos ($\times 10^5$ /mL)	6,03 \pm 0,36	4,79 \pm 0,58*
Eritroblastos Maduros ($\times 10^5$ /mL)	36,12 \pm 1,35	24,89 \pm 4,89*
Linfócitos ($\times 10^5$ /mL)	20,71 \pm 2,23	19,30 \pm 1,75
Monócitos ($\times 10^5$ /mL)	0,27 \pm 0,09	0,14 \pm 0,1

Tabela 3. Valores de contagem celular obtidas através do mielograma realizado em animais do grupo controle (n = 6) e idoso (n = 6). Valores estão representados na forma de média \pm desvio padrão e foram comparados através do teste T de Student, onde * representa diferença estatística entre os grupos comparados.

5.4 CITOMETRIA DE FLUXO

5.4.1 Imunofenotipagem de Células do Sangue Periférico

Foi realizada a análise de células do sangue periférico de animais do grupo controle e idoso através da citometria de fluxo. A **figura 14** representa as estratégias utilizadas na análise. Os Linfócitos T citotóxicos foram definidos como $CD3^+CD4^-CD8^+$, Linfócitos T auxiliares como $CD3^+CD4^+CD8^-$, Linfócitos B como $B220^+$ e células *natural killers* como $CD49b^+NK1.1^+$

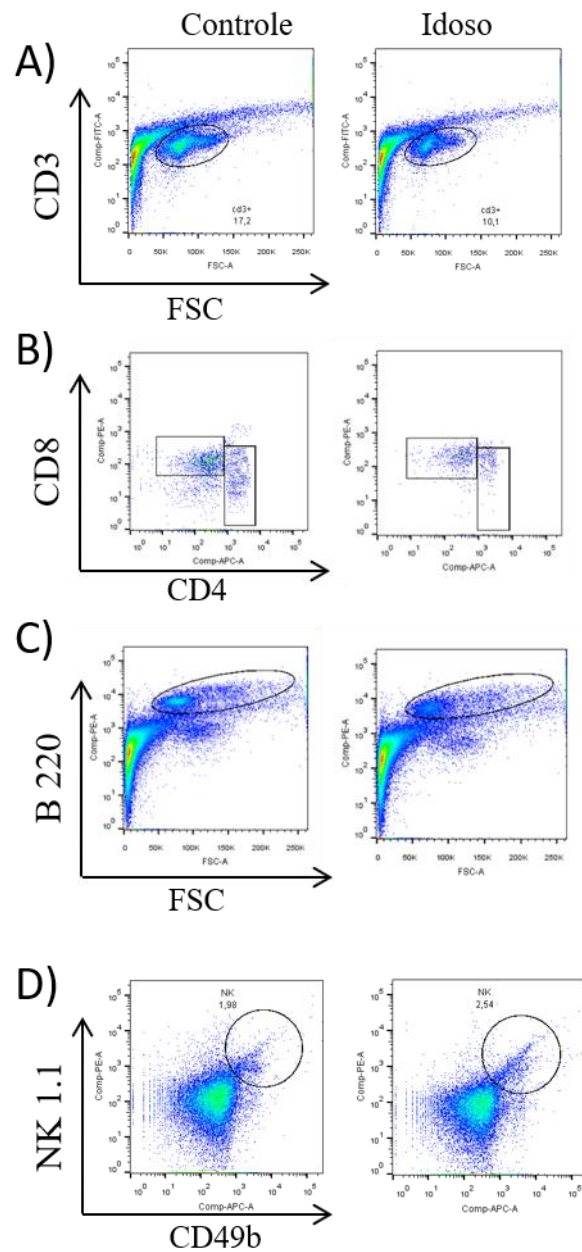


Figura 14. Estratégia de análise de populações celulares do sangue periférico de animais do grupo controle e idoso. A) Gating de células CD3⁺. B) Gating de Linfócitos T citotóxicos CD3⁺CD4⁻CD8⁺ e Linfócitos T auxiliares CD3⁺CD4⁺CD8⁻. C) Gating de Linfócitos B B220⁺. D) Gating de CD49b⁺NK1.1⁺.

A **figura 15** denota a estratégia para identificar, em animais do grupo controle e idoso, os granulócitos, definidos como CD11b⁺Gr-1⁺ e monócitos, definidos como CD11b⁺F4/80⁺.

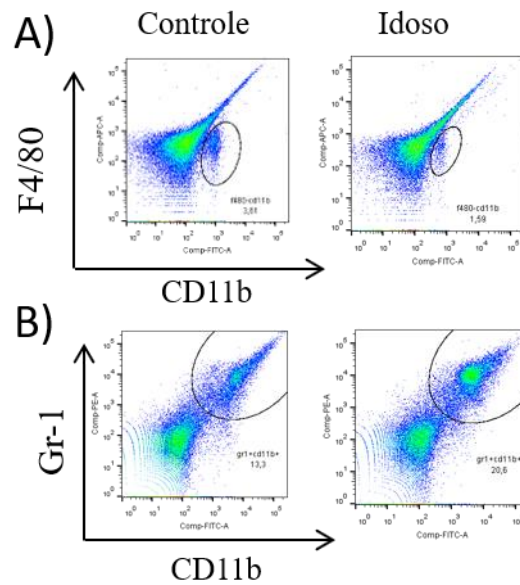


Figura 15. Estratégia de análise para granulócitos e monócitos de sangue periférico de animais do grupo controle e idoso. A) Gating de monócitos CD11b⁺F4/80⁺. B) Gating de granulócitos CD11b⁺Gr-1⁺.

Foi notado que o grupo idoso (n = 6) apresentou um menor número de Linfócitos CD3⁺CD8⁺, Linfócitos B220⁺ e Monócitos CD11b⁺F4/80⁺ quando comparado ao grupo controle (n = 12). Contrariamente, foram identificadas mais células NK1.1⁺CD49b⁺ e Granulócitos CD11b⁺Gr-1⁺ entre os animais idosos comparado aos animais do grupo controle.

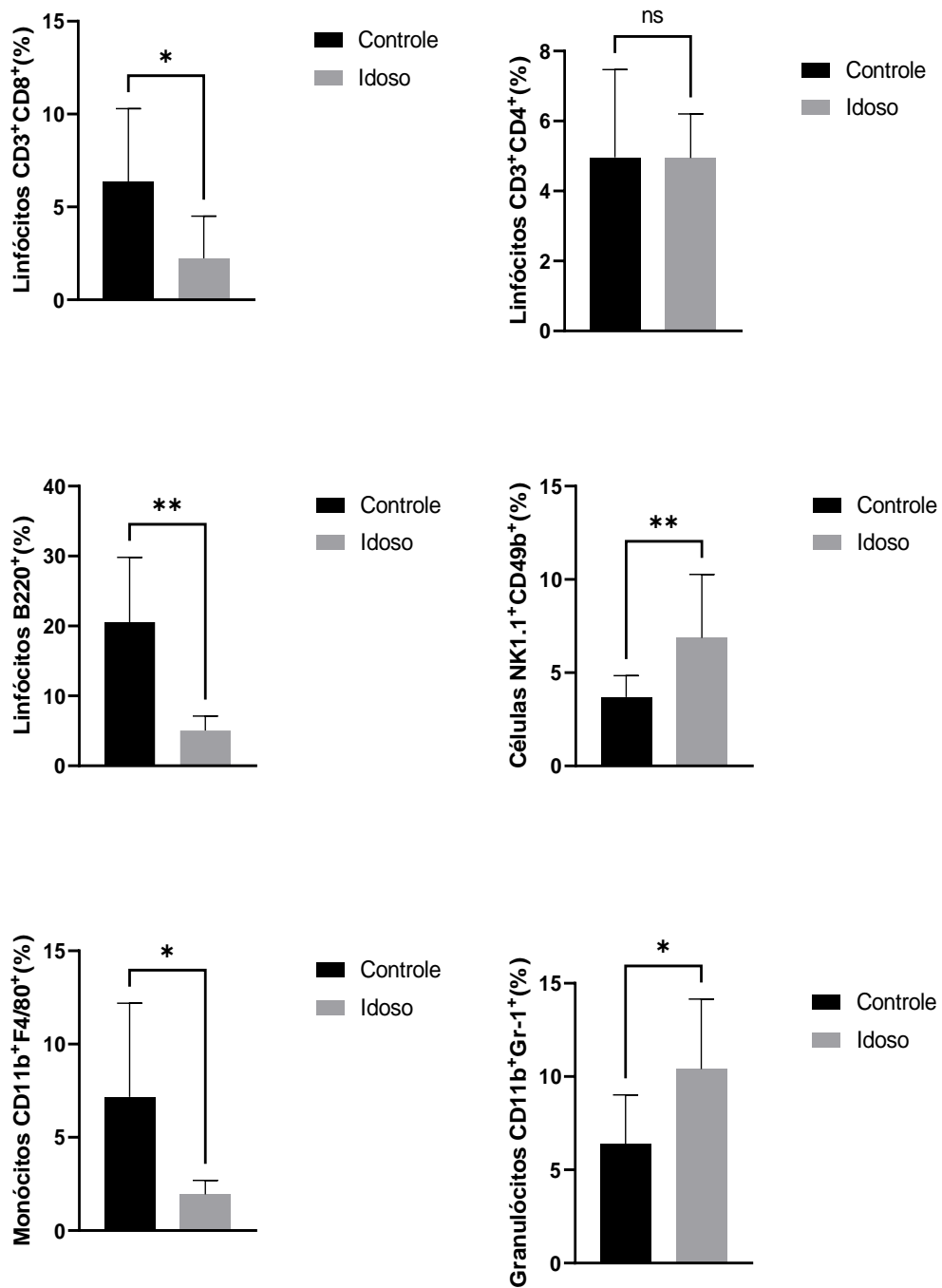


Figura 16. Populações celulares do sangue periférico analisadas através de citometria de fluxo. Valores estão representados na forma de média \pm desvio padrão e foram comparados através do teste T de Student. * representa significância estatística para p -valor < 0.05 ; ** para p -valor < 0.01 . ns: não significativo.

5.4.2 Imunofenotipagem de Células da Medula Óssea

Foram separadas amostras destinadas à citometria de fluxo. A **figura 17** representa a estratégia de análise realizada para a identificação da população de CTH. As CTH foram

definidas com através dos seguintes marcadores de superfície: $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{Flk2}^- \text{CD90}^+ \text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+ \text{Flk2}^- \text{CD90}^+$.

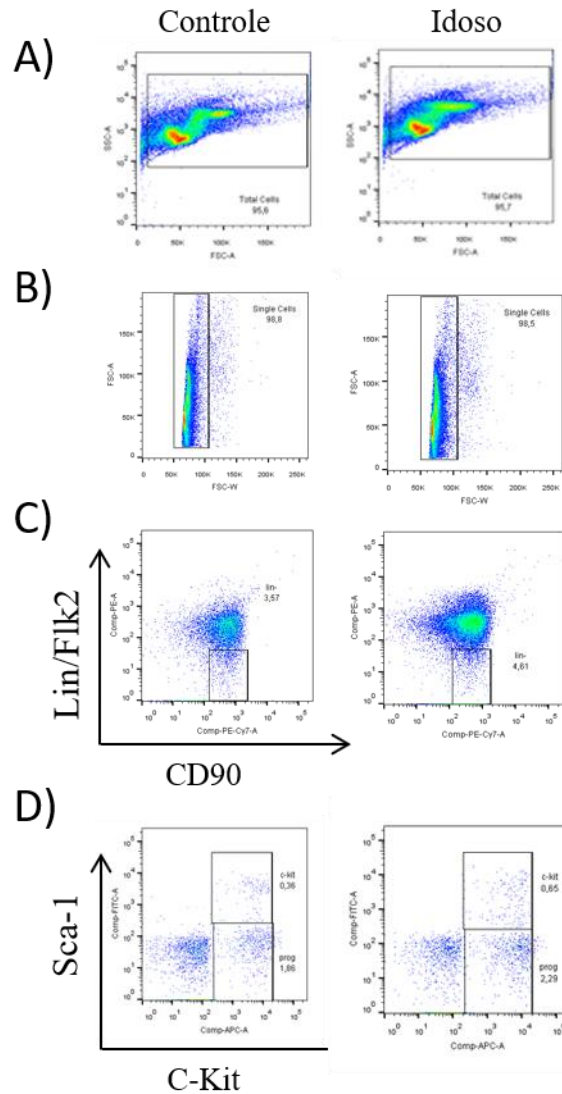


Figura 17. Estratégia de análise para obtenção da população de CTH residentes na medula óssea de animais do grupo controle e idoso. A) *Gating* da população total de células na amostra. B) *Gating* para obter células individuais. C) *Gating* de populações de células com marcadores $\text{Lin}^- \text{Flk2}^- \text{CD90}^+$. D) *Gating* de células com marcadores $\text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+$ e $\text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^-$.

Na **Figura 18** estão ilustradas as estratégias de análise para as populações de precursores hematopoéticos e de granulócitos, monócitos e eritrócitos presentes na medula óssea de animais do grupo controle e idoso. A população de Progenitores Megacariocíticos-Eritroides foi definida como $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{IL-7R}^- \text{CD34}^- \text{CD16}^-$; Progenitores Mielóides Comuns como $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{IL-7R}^- \text{CD34}^+ \text{CD16}^-$; Progenitores Grânulo-Monocíticos como $\text{Lin}^- \text{c-kit}^+ \text{IL-7R}^-$

CD34⁺CD16⁺. Para a população de células maduras, os granulócitos foram definidos como CD11b⁺Gr-1⁺, monócitos como CD11b⁺F4/80⁺ e eritrócitos como Ter119⁺.

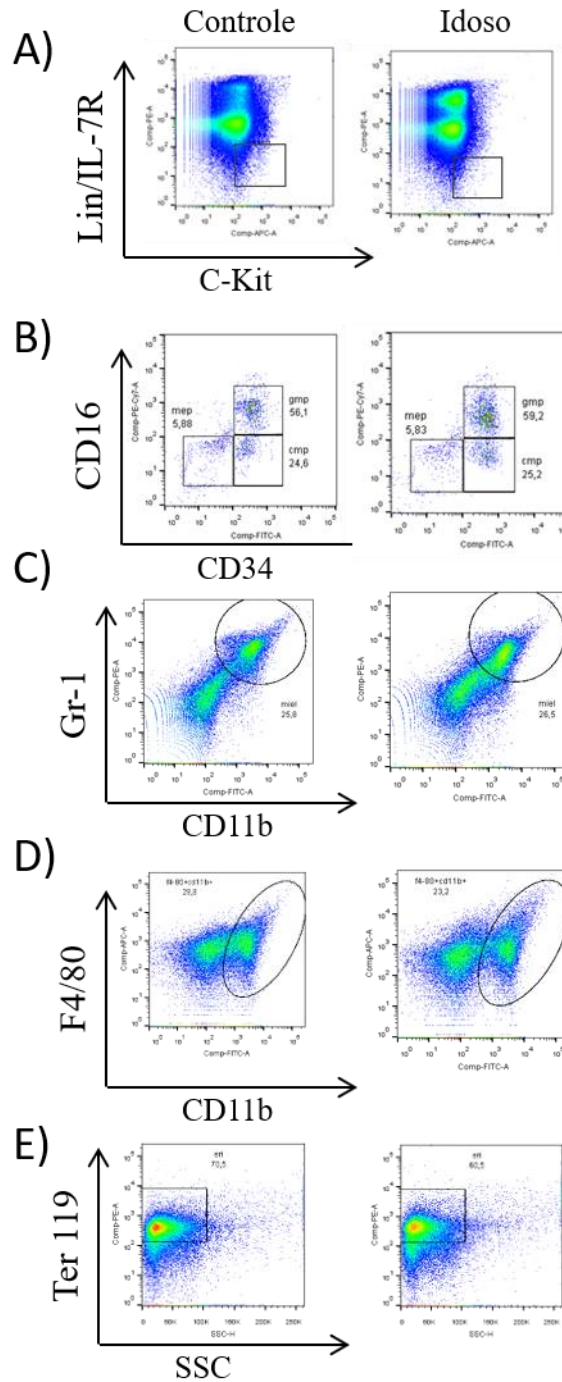


Figura 18. Estratégia de análise de populações de células precursoras e maduras na medula óssea de animais do grupo controle e idoso. A) Gating de populações Lin⁻c-kit⁺IL-7R⁻. B) Gating de populações de células progenitoras, MEP: Lin⁻c-kit⁺IL-7R⁻CD34⁻CD16⁺; CMP: Lin⁻c-kit⁺IL-7R⁻CD34⁺CD16⁺; GMP: Lin⁻c-kit⁺IL-7R⁻CD34⁺CD16⁺. C) Gating de populações de granulócitos CD11b⁺Gr-1⁺. D) Gating de populações de monócitos CD11b⁺F4/80⁺. E) Gating de populações de eritrócitos Ter119⁺.

Na **figura 19** é representada a estratégia de análise para células da linhagem linfóide do grupo controle e idoso. O Progenitor Linfóide Comum foi definido como $\text{Lin}^{\text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+ \text{IL-7R}^+}$; Linfócitos B como B220^+ ; Linfócitos T citotóxicos/auxiliares como CD3^+ ; células *natural killers* como $\text{CD49b}^+ \text{NK1.1}^+$.

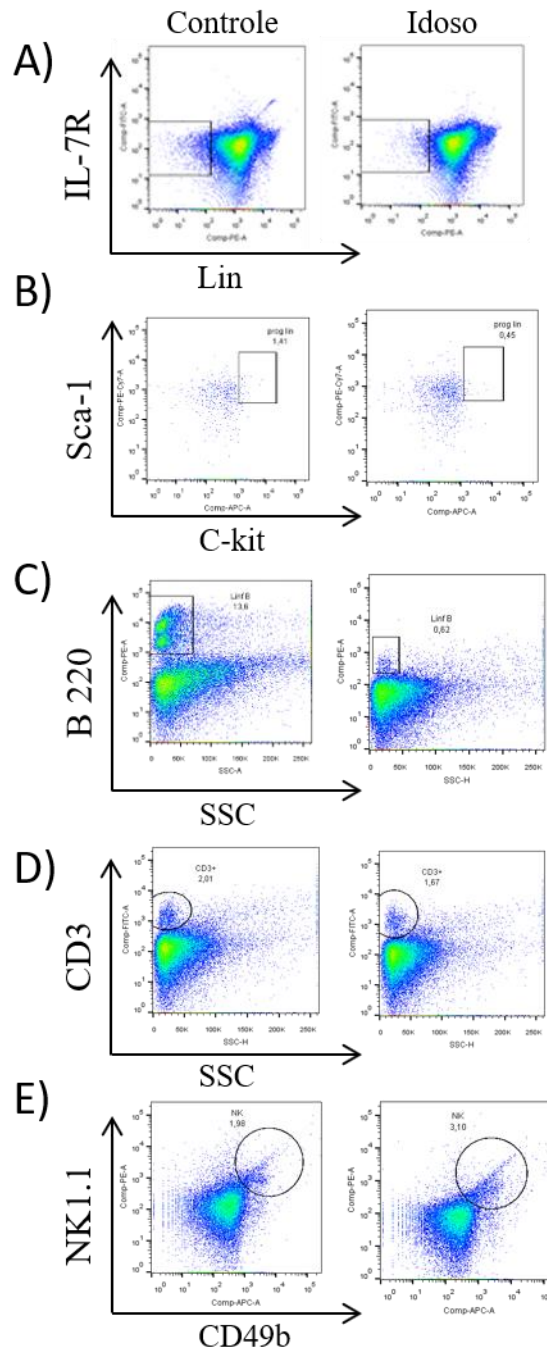


Figura 19. Estratégia de análise de populações de células de animais do grupo controle e idoso pertencentes a linhagem linfóide. A) Gating de células $\text{Lin}^{\text{IL-7R}^+}$. B) Gating de PLC, $\text{Lin}^{\text{c-kit}^+ \text{Sca-1}^+ \text{IL-7R}^+}$. C) Gating de Linfócitos B, B220^+ . D) Gating de Linfócitos T citotóxicos/auxiliares, CD3^+ . E) Gating de células natural killers, $\text{CD49b}^+ \text{NK1.1}^+$.

Para quantificar as células presentes na medula óssea, foi feito uso da citometria de fluxo utilizando marcadores de superfície específicos para cada linhagem celular. As **figuras 20 e 21** mostram o quantitativo de células encontradas, bem como a comparação entre os grupos controle (n = 12) e grupo idoso (n = 12).

Como já esperado, o grupo idoso apresentou um aumento significativo no número de CTH, na população de Progenitores Grânulo-Monocíticos e na de células *natural killers*. Inversamente, foi notada uma queda acentuada no populacional de Progenitores Linfoides Comuns, Linfócitos B e Eritrócitos.

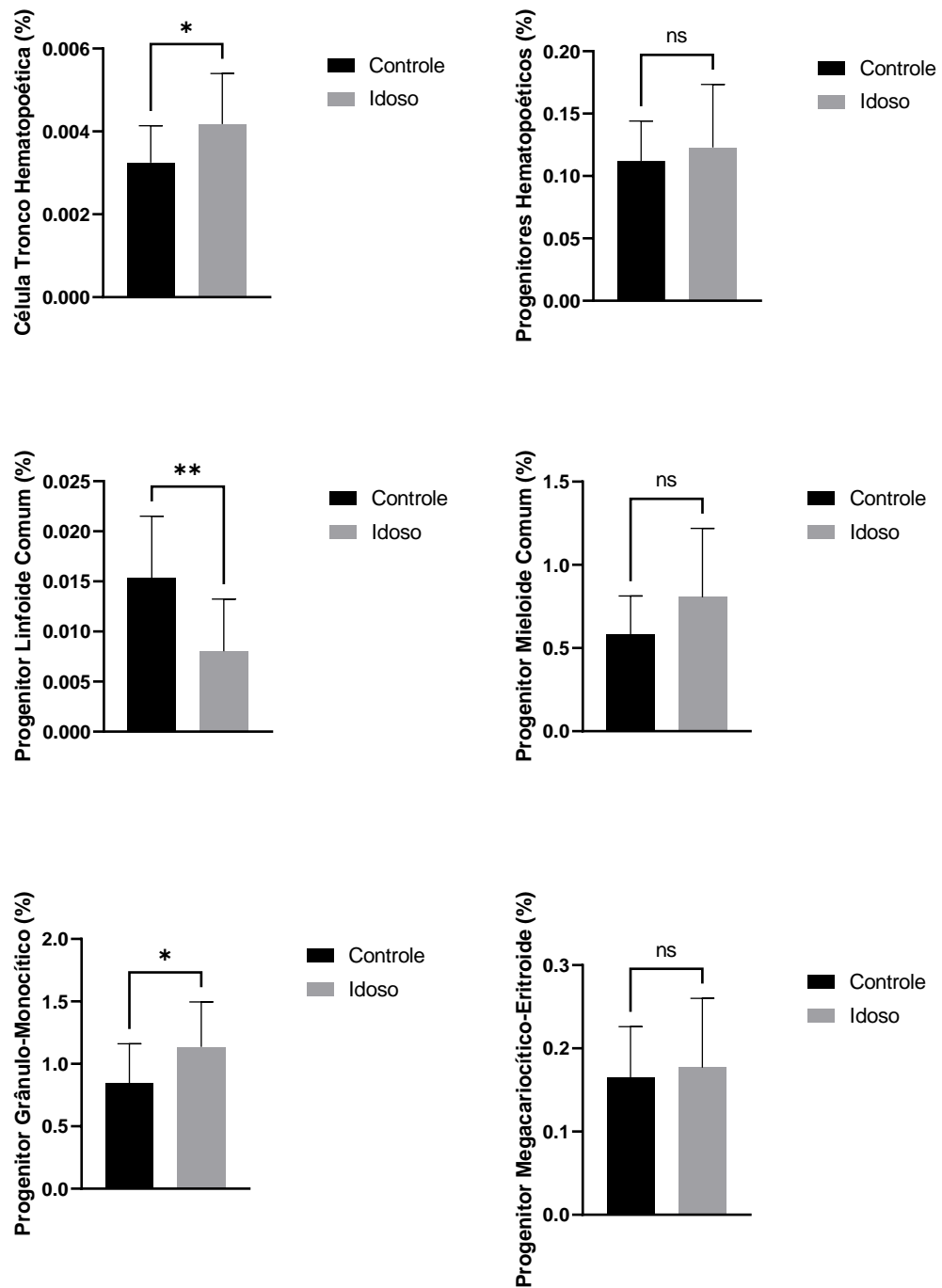


Figura 20. Populações celulares da medula óssea analisadas através de citometria de fluxo. Valores estão representados na forma de média \pm desvio padrão e foram comparados através do teste T de Student. * representa significância estatística para p-valor < 0.05 ; ** para p-valor < 0.01 . ns: não significativo.

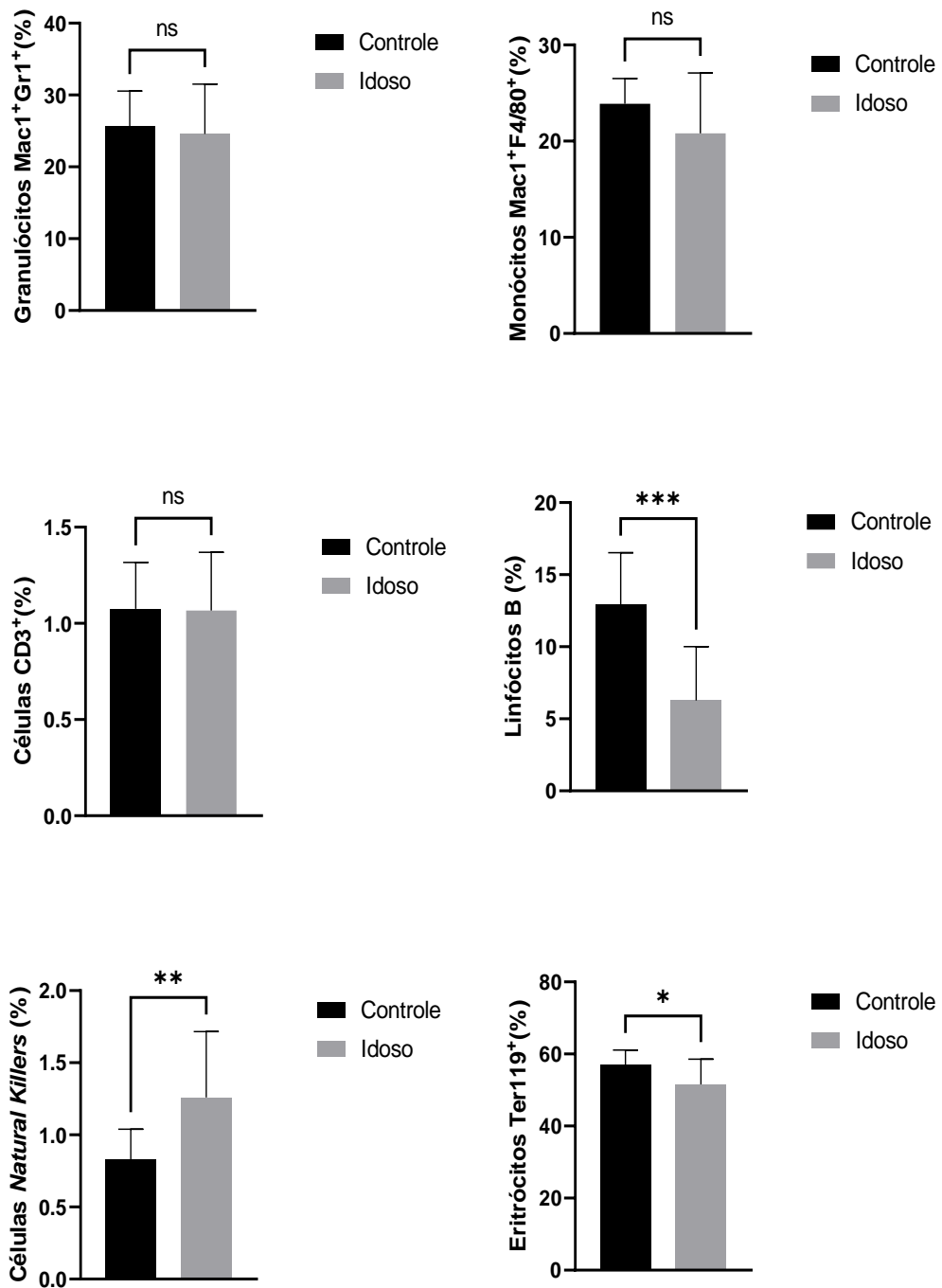


Figura 21. Populações celulares da medula óssea analisadas através de citometria de fluxo. Valores estão representados na forma de média \pm desvio padrão e foram comparados através do teste T de Student. * representa significância estatística para p -valor < 0.05 ; ** para p -valor < 0.01 e *** para p -valor < 0.001 . ns: não significativo.

5.4.3 Imunofenotipagem de CTMs

Para avaliar a população de CTM presente na medula óssea, as células foram obtidas conforme descrito no item 4.2.3. As células foram isoladas baseando-se no princípio de não

aderência ao plástico conforme postulado por Friedstein (1976). Após a coleta, as células foram cultivadas em atmosfera umidificada (95%), a 37°C e 5% de CO₂, sendo monitorada sua morfologia através do uso de microscopia invertida e a capacidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos (dados não mostrados).

Caracterizando a população de CTM medulares, essas células mostraram-se marcadas positivamente para CD90, CD73 e CD105, estando marcadas negativamente para CD45, CD34 e CD14. A **figura 22** mostra a estratégia de análise das CTM no grupo controle e no grupo idoso.

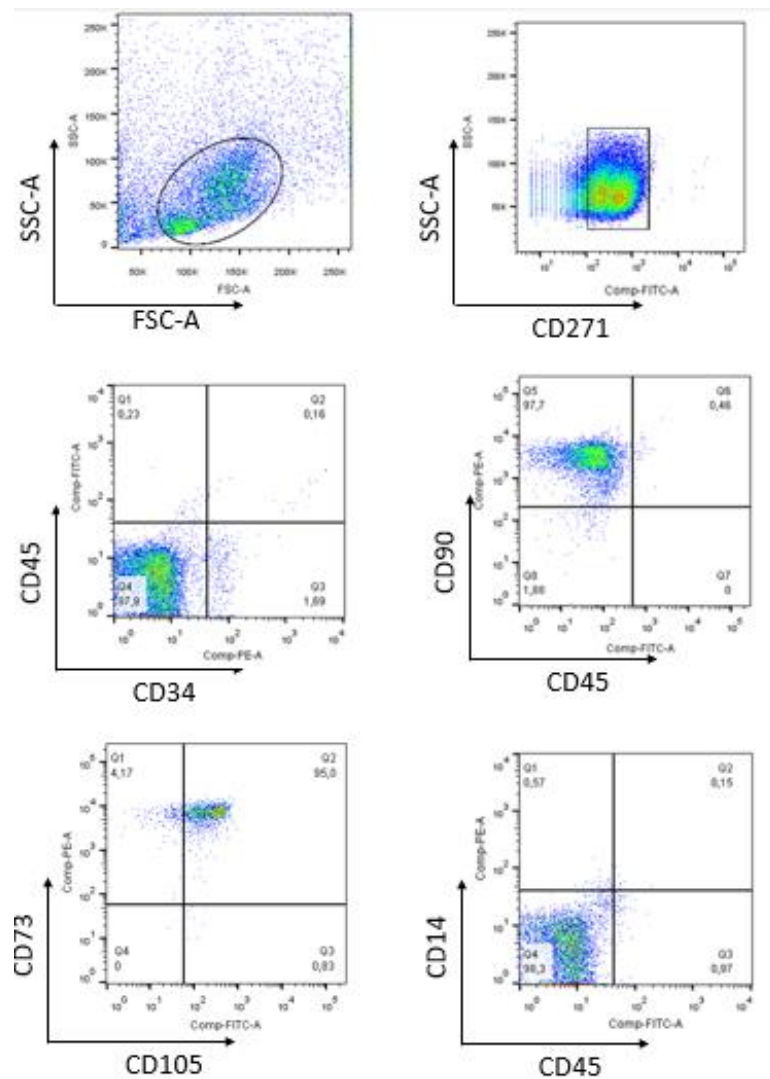


Figura 22. Estratégia de análise por imunofenotipagem para obtenção de populações de CTM de animais do grupo controle e grupo idoso. As células foram separadas em *gates* CD45⁻CD90⁺, CD34⁻CD45⁻, CD45⁻CD14⁻ e CD105⁺CD73⁺.

Foi realizada a comparação no grau de expressão de marcadores de superfície característicos de CTM entre os animais do grupo controle e do grupo idoso. A **figura 23** demonstra os valores médios obtidos nos dois grupos para os marcadores CD45, CD34, CD14, CD90, CD73, CD105 e CD271. Dentre os marcadores analisados, grande maioria não apresentou uma diferença significativa quando comparado entre o grupo controle e o grupo idoso, com exceção do marcador CD73, que esteve expresso em menor quantidade nos animais idosos, apresentando uma média de $84,58 \pm 3,989$, comparado a $90,35 \pm 4,452$ nos animais jovens (p-valor: 0.0398, Intervalo de Confiança 95% - IC95 de -11,20 a -0,3289).

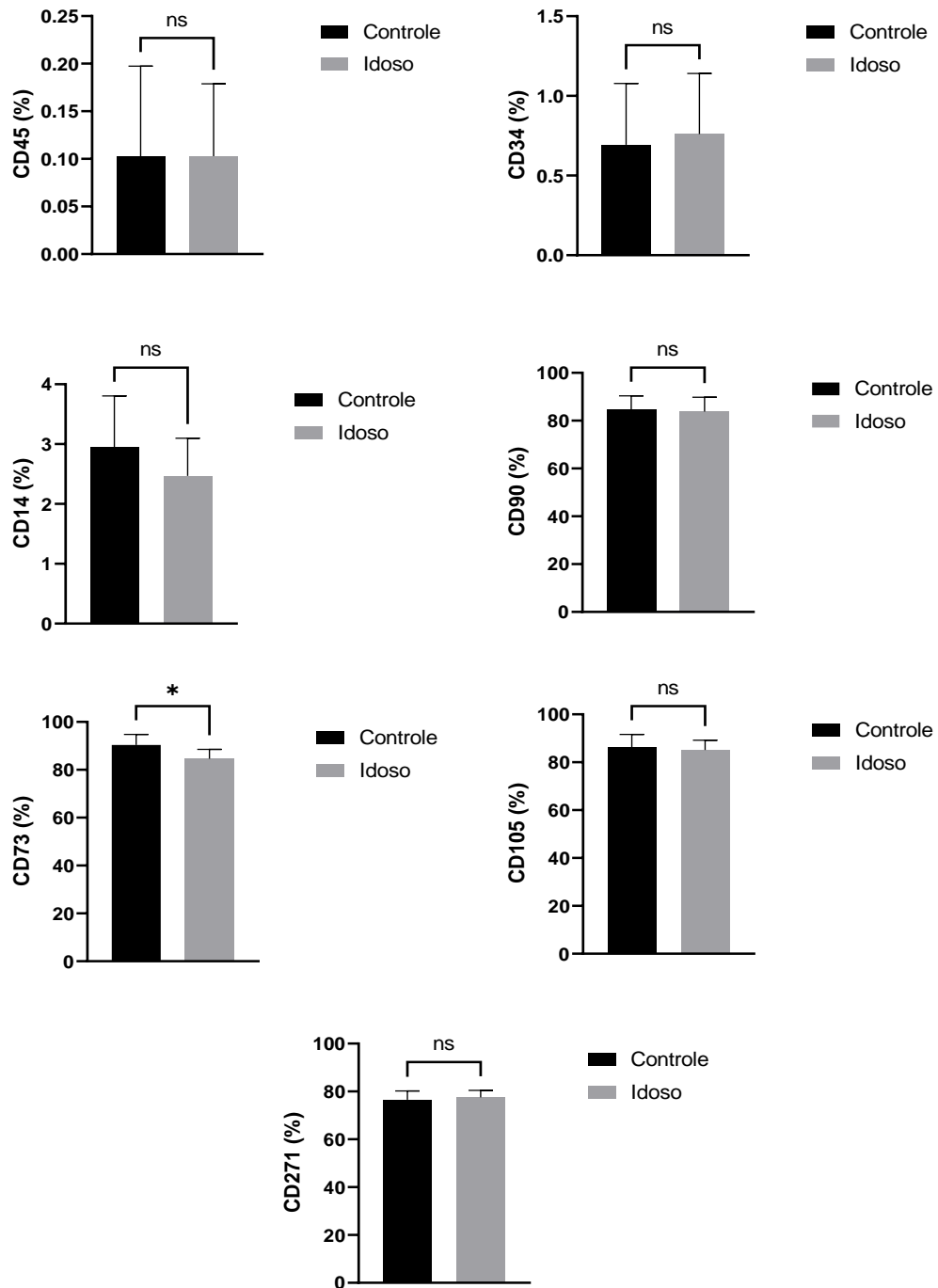


Figura 23. Quantificação de marcadores de superfície utilizados para caracterizar as CTM de animais do grupo controle (n = 6) e idoso (n = 6). Valores estão representados na forma de média \pm desvio padrão e foram comparados utilizando o teste T de Student. * representa significância estatística para p-valor < 0.05 . ns: não significante.

5.5 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO SOBRE AS CTMs

5.5.1 Produção de Citocinas pelas CTMs

O processo hematopoético depende de vários fatores solúveis que podem ser encontrados dispersos no microambiente medular. Alguns destes fatores são reconhecidamente produzidos pelas CTMs medulares. Diante disto, buscando avaliar como o envelhecimento pode influenciar no secretoma de CTMs, foram avaliados os níveis dos fatores solúveis que influenciam a regulação hematopoética de maneira direta, sendo escolhidos os fatores CXCL12, SCF, IL-6, IL-11 e IL-3. A **figura 24** mostra as concentrações encontradas destes fatores de interesse, bem como a comparação entre os grupos de animais controle e idosos.

Quando comparado com as CTMs obtidas de animais pertencentes ao grupo controle, as CTMs envelhecidas mostraram um secretoma com maiores concentrações de CXCL-12 (p-valor < 0.05; IC95 de 3.866 a 106.5), SCF (p-valor < 0.05; IC95 de 0.9855 a 39.14) e IL-6 (p-valor < 0.0001; IC95 de 556.6 a 1164.0), enquanto houve uma menor secreção de IL-11 (p-valor < 0.0001; IC95 de -38.55 a -19.27). Dentre os fatores solúveis analisados, a IL-3 (p-valor = 0.8582; IC95 de -17.79 a 15.09) foi a única que não apresentou uma diferença com significância estatística quando comparada entre os grupos.

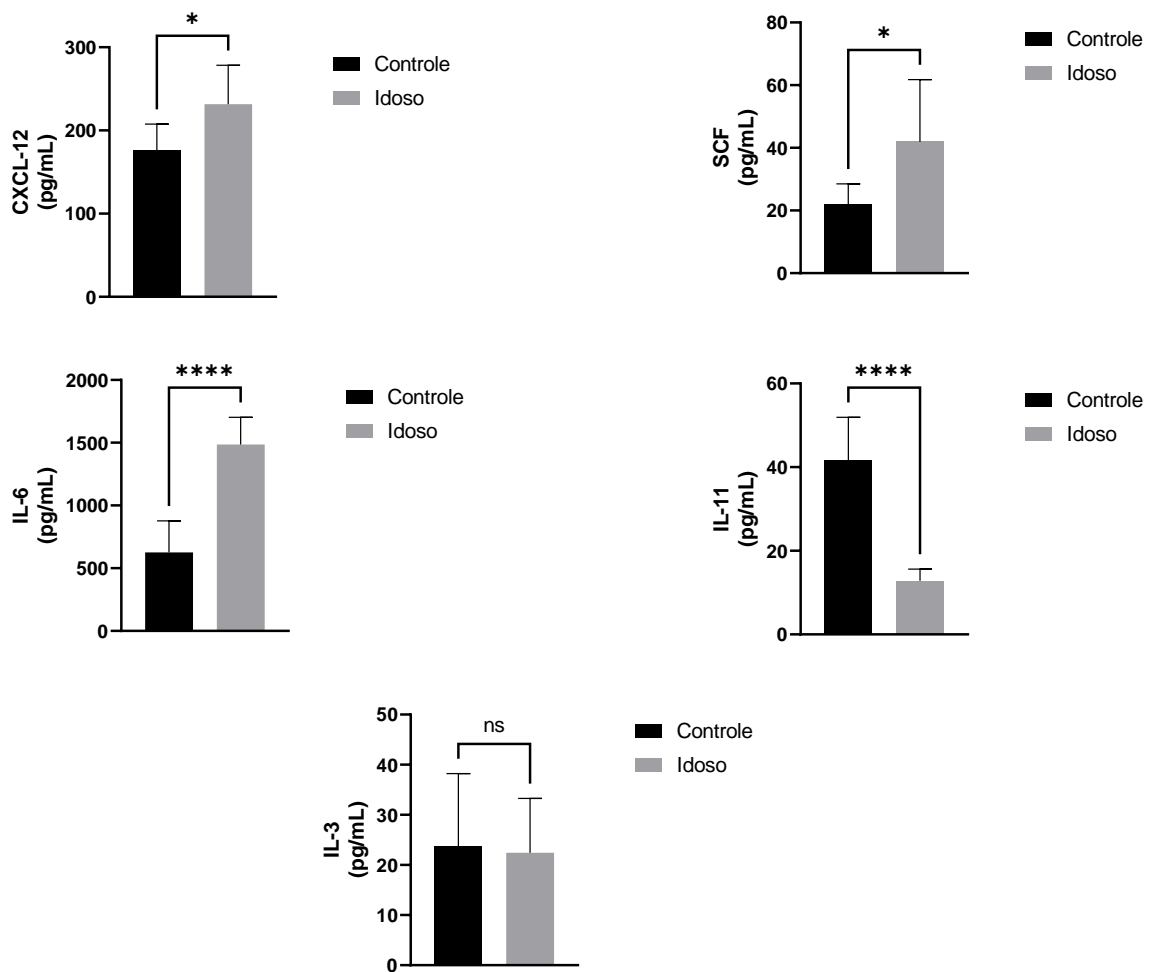


Figura 24. Quantificação de fatores solúveis produzidos por CTMs obtidas de animais jovens ($n = 6$) e envelhecidos ($n = 6$). Valores estão representados em forma de média \pm desvio padrão e foram comparados através do teste t de Student. * representa significância estatística para p-valor < 0.05 e **** para p-valor < 0.0001 . ns: não significante.

5.5.2 Expressão de Genes Envolvidos na Regulação de CTMs

Pelo fato de as CTMs serem células de caráter multipotente e por possuírem inúmeros papéis regulatórios através da secreção de fatores solúveis, foram feitos ensaios de expressão gênica para genes relacionados à diferenciação e regulação da medula óssea (*sp7*, *Ppar- γ* e *Angpt1*), ao fator G-CSF (*Csf3*), ao marcador de senescência (*Nos*), com as vias de sinalização de interesse (*mTORC1* e *Akt1*) e com a molécula de adesão n-caderina (*Cdh2*). A **figura 25** dispõe os resultados relacionados às vias de sinalização, na **figura 26**, há os resultados do marcador de senescência, **figura 27**, os genes de diferenciação e regulação da medula óssea, **figura 28**, do fator G-CSF e, por fim, na **figura 29** há os resultados do gene relacionado à n-caderina.

Para os genes relacionados com vias de sinalização, não foi vista uma diferença estatisticamente significativa entre animais controle e idosos frente a via mTOR. Já para a via AKT, foi encontrado que as CTMs de animais idosos apresentavam uma maior expressão de *Akt1* (p-valor = 0.0008; IC95 de 1.671 a 4.659).

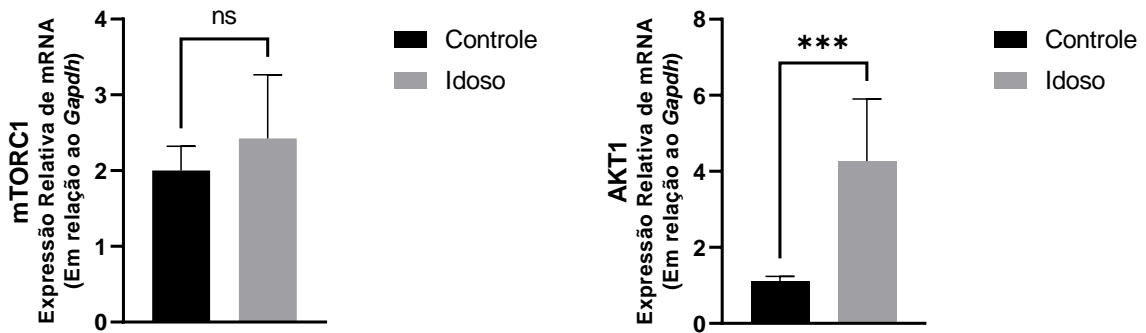


Figura 25. Resultados de expressão gênica para genes relacionados com as vias de sinalização mTOR e AKT. Cálculo da expressão analisada foi feito sobre o endógeno *Gapdh* e através da metodologia do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *** representa significância estatística para p-valor < 0.001. ns: não significativo. n = 6 para os dois grupos analisados.

Considerando que o óxido nítrico é relevante no processo do envelhecimento, foi também avaliado o gene *Nos* para inferir a expressão de genes relacionados à atividade enzimática da óxido nítrico sintase (NOS). Foi encontrado que animais envelhecidos apresentavam uma maior expressão deste gene em suas CTMs (p-valor < 0.05; IC95 de 3.299 a 23.10).

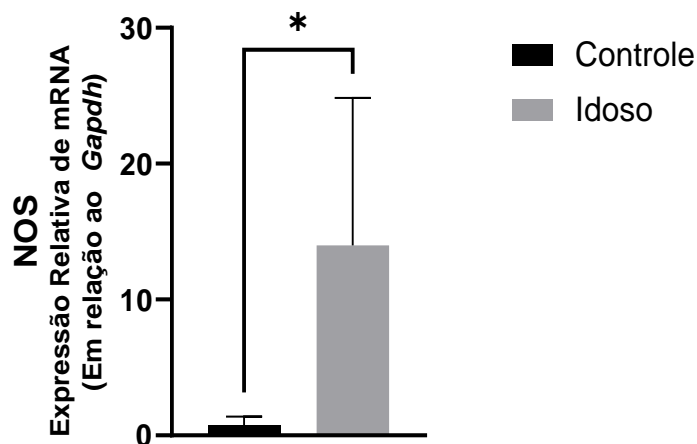


Figura 26. Resultado de expressão gênica para o gene *Nos*, responsável pela enzima óxido nítrico sintase. Cálculo da expressão analisada foi feito sobre o endógeno *Gapdh* e através da metodologia do $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *** representa significância estatística para p-valor < 0.001. n = 6 para os dois grupos analisados.

Para os genes *Ppar-γ*, *sp7* e *Angpt1*, foi notada um aumento significativo na expressão de *Ppar-γ* em CTMs de animais envelhecidos (p-valor < 0.0001; IC95 de 0.9082 a 1.897), implicando alterações metabólicas relacionados ao seu potencial adipogênico. Para os genes *sp7* e *Angpt1*, não foi vista uma diferença estatisticamente significativa.

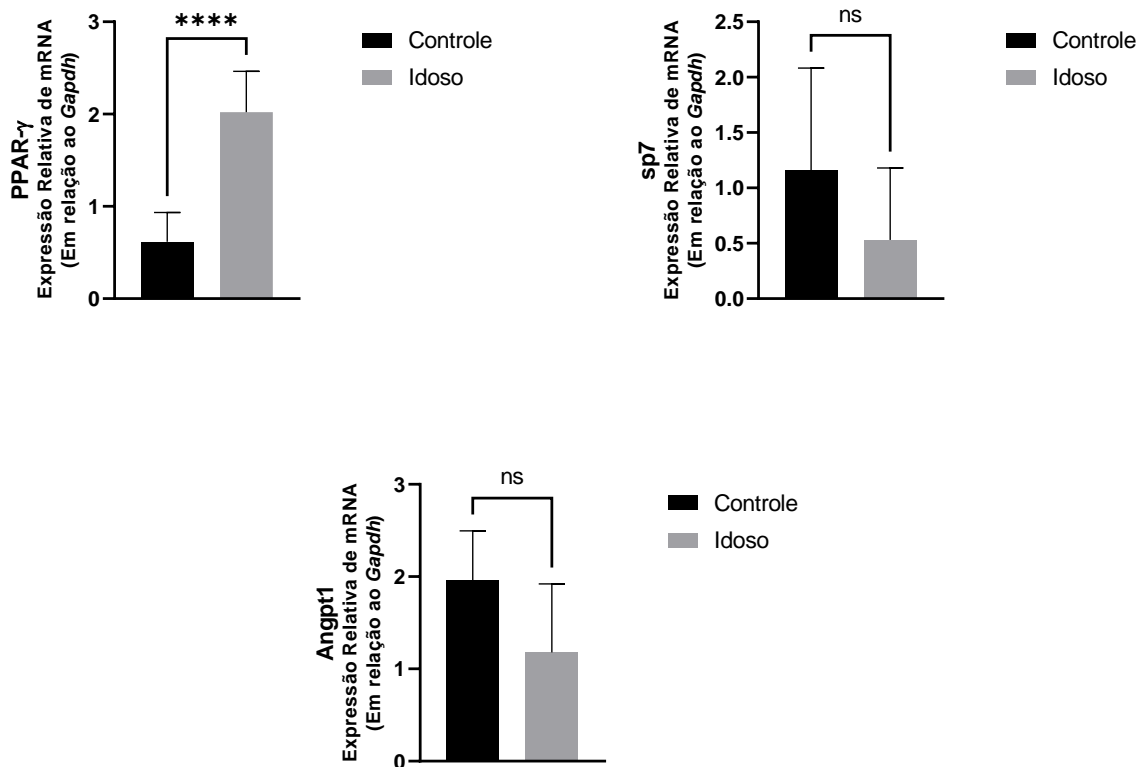


Figura 27. Resultado de expressão gênica para genes *sp7*, *Ppar-γ* e *Angpt1*. Cálculo da expressão analisada foi feito sobre o endógeno *Gapdh* e através da metodologia do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. **** representa significância estatística para p-valor < 0.0001. ns: não significativa. n = 6 para os dois grupos analisados.

O gene *Csf3*, relacionado com a produção de G-CSF, mostrou-se com uma expressão significativamente reduzida (p-valor < 0.01; IC95 de -3.738 a -0.8040) em CTMs de animais idosos. Assim implicando uma menor produção deste fator de crescimento mieloide pelas CTMs no envelhecimento.

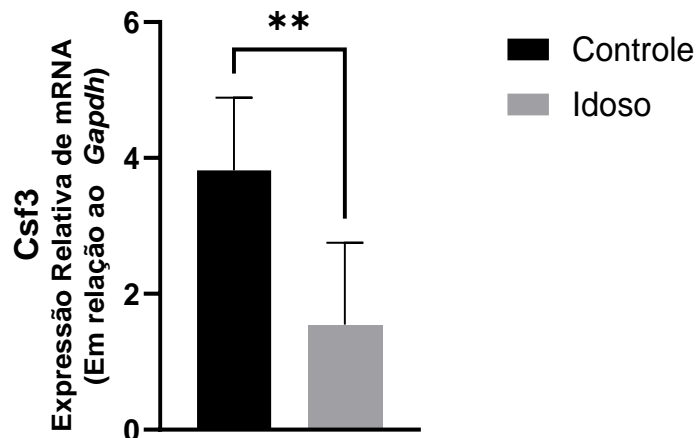


Figura 28. Resultado de expressão gênica para o gene *Csf3*, relacionado com a produção de G-CSF. Cálculo da expressão analisada foi feito sobre o endógeno *Gapdh* e através da metodologia do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. ** representa significância estatística para p-valor < 0.01. n = 6 para os dois grupos analisados.

Assim como o *Csf3*, o gene codificador da molécula de adesão também apresentou uma expressão reduzida nas CTMs de animais envelhecidos (p-valor < 0.05; IC95 de -1.300 a -0.1083) em relação aos animais controle.

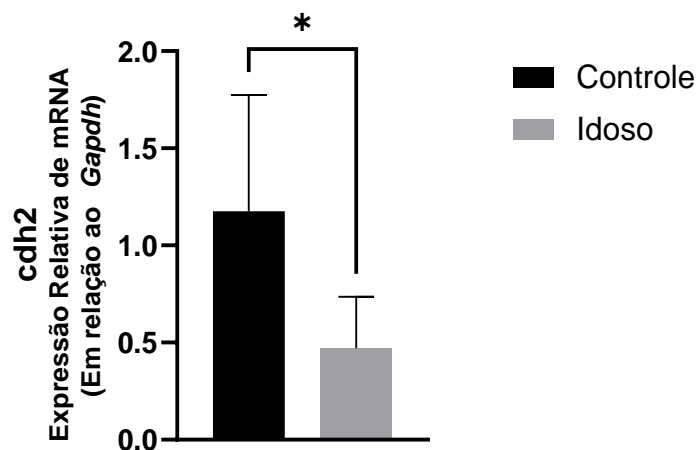


Figura 29. Resultado de expressão gênica para o gene *cdh2*, relacionado com a expressão da molécula de adesão n-caderina. Cálculo da expressão analisada foi feito sobre o endógeno *Gapdh* e através da metodologia do $2^{-\Delta\Delta C_t}$. * representa significância estatística para p-valor < 0.05. n = 6 para os dois grupos analisados.

5.6 EFEITOS DO ENVELHECIMENTO NA REGULAÇÃO DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS PELAS CTMs

5.6.1 Efeito das CTMs Sobre a Proliferação Celular da Linhagem C1498

Finalizando os ensaios sobre as alterações do envelhecimento sobre a própria CTM, em seguida foram realizados experimentos para determinar se e como o envelhecimento das CTMs influencia diversos aspectos sobre células hematopoéticas, usando a linhagem celular C1498 como modelo. Primeiramente, foi avaliada se estas CTMs envelhecidas alteram a proliferação da linhagem leucêmica. O meio condicionado de CTMs envelhecidas, em comparação com a cultura condicionada com CTMs de animais controle, proporcionou uma maior capacidade proliferativa para as células C1498 (p-valor < 0.01; IC95 de 7.070 a 19.83). A **figura 30** expressa os resultados obtidos no ensaio de proliferação.

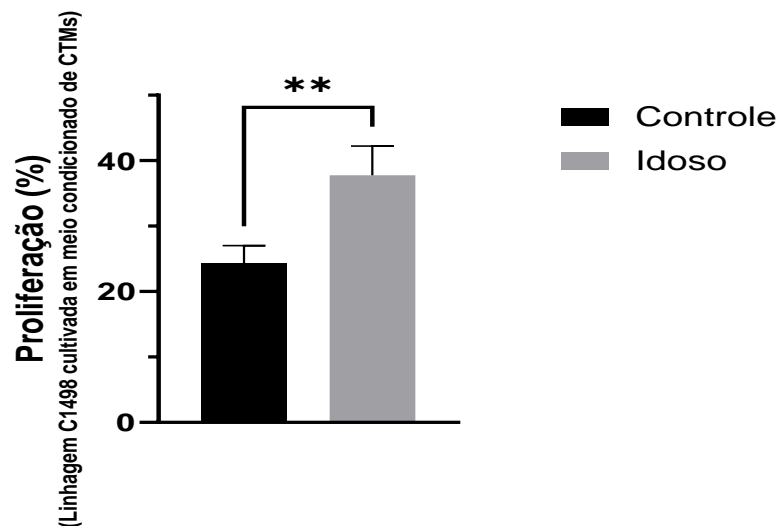


Figura 30. Efeitos de CTMs sobre a proliferação da linhagem celular C1498, onde a cultura condicionada de CTMs envelhecidas mostrou uma maior capacidade de sustentar a proliferação celular quando comparada ao grupo controle. ** representa significância estatística para p-valor < 0.01. n = 4 para ambos os grupos estudados.

5.6.2 Efeitos das CTMs Sobre a Migração Celular da Linhagem C1498

Dando seguimento às análises referentes ao potencial regulador das CTMs sobre células hematopoéticas, foi avaliada a influência dessas células estromais sobre a capacidade da linhagem C1498 em realizar o processo de migração celular.

Normalizando os dados para células C1498 que não foram cultivadas em meio condicionado de CTMs, foi possível notar que as CTMs envelhecidas favoreceram a migração

celular da linhagem C1498 (p-valor < 0.05; IC95 de 5.695 a 131.8). A **figura 31** ilustra os resultados obtidos nos ensaios de migração, comparando os dois grupos estudados.

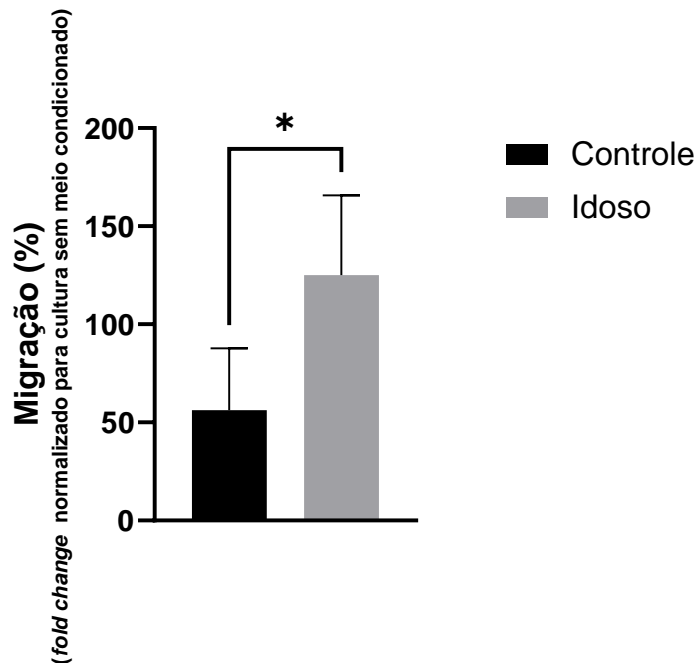


Figura 31. Efeitos de CTMs sobre a migração da linhagem celular C1498, onde a cultura condicionada de CTMs envelhecidas mostrou uma maior capacidade de estimular a migração celular quando comparada ao grupo controle. * representa significância estatística para p-valor < 0.05. n = 4 para ambos os grupos estudados.

5.6.3 Efeitos das CTMs Sobre a Expressão Gênica da Linhagem C1498

Para avaliar os efeitos das CTMs sobre a regulação hematopoética da linhagem C1498 no nível molecular, foi realizado o ensaio de qPCR buscando avaliar os seguintes genes: *Sox2*, *Nanog*, *Spi1*, *Gata3*, *Cebpa*, *Stat3*, *Cxcr4*, *Ccne1*, *Cdkn1a* e *Akt1*. Como controle endógeno, foi utilizado o *Gapdh*. Entre estes, *Sox2*, *Nanog*, *Pou5f1* e *Cdkn1a* mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparado o grupo controle com o grupo idoso. Os demais genes não apresentaram uma alteração significativa. As alterações nos genes previamente mencionado estão descritas abaixo.

Para os genes de pluripotência, *Sox2* (p-valor < 0.01, IC95 de 0.2576 a 1.383), *Nanog* (p-valor < 0.05, IC95 de 0.1777 a 1.478) e *Pou5f1* (p-valor < 0.05, IC95 de 0.09566 a 0.5937) tiveram sua expressão aumentada nas células mantidas em contato com o sobrenadante de CTMs envelhecidas, quando comparado ao grupo controle (**Figura 32**).

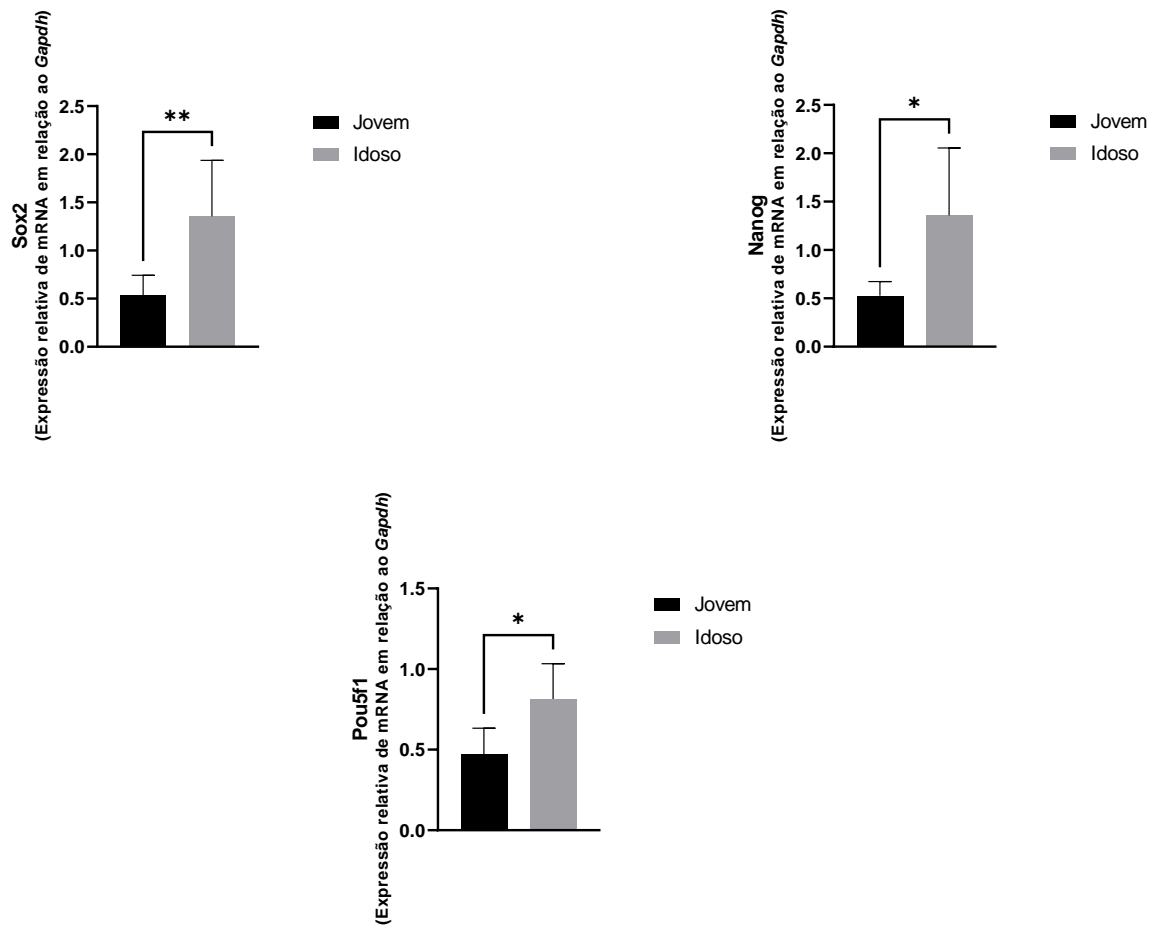


Figura 32. Resultados de expressão gênica para os genes *Sox2*, *Nanog* e *Pou5f1* dos grupos controle (n = 6) e idoso (n = 6). Valores estão representados na forma de média \pm desvio padrão e foram comparados utilizando o teste T de Student. * representa significância estatística para p-valor < 0.05 e ** para p-valor < 0.01.

Além dos genes de pluripotência, o regulador de ciclo celular *Cdkn1a* também esteve alterado, tendo sua expressão diminuída em células mantidas em contato com o sobrenadante de CTMs envelhecidas (p-valor < 0.05, IC95 de -1.593 a -0.05754, **Figura 33**).

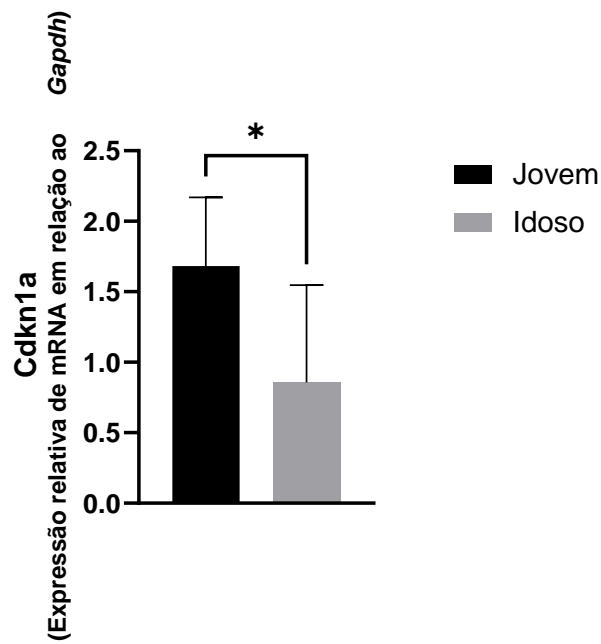
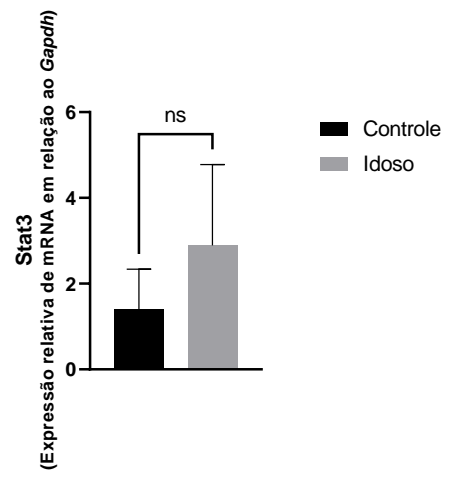
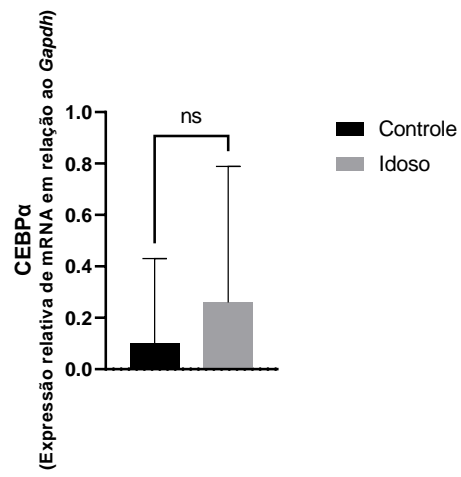
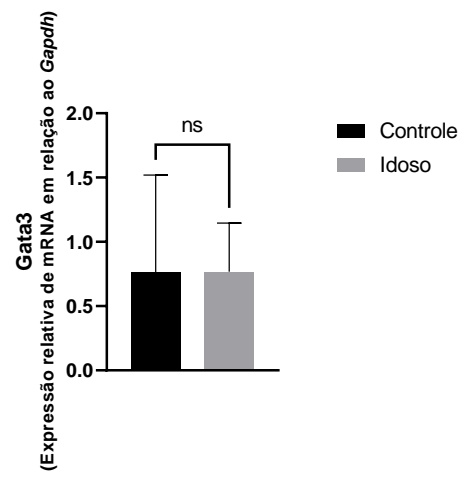
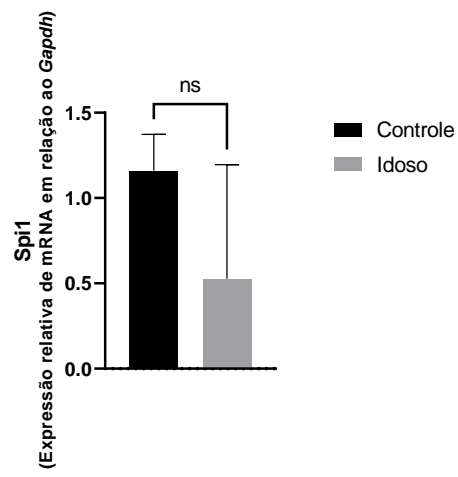


Figura 33. Resultados de expressão gênica para o gene *Cdkn1a* dos grupos controle (n = 6) e idoso (n = 6). Valores estão representados na forma de média \pm desvio padrão e foram comparados utilizando o teste T de Student. * representa significância estatística para p-valor < 0.05.

Para os demais genes avaliados, não foi notada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos (**Figura 34**).



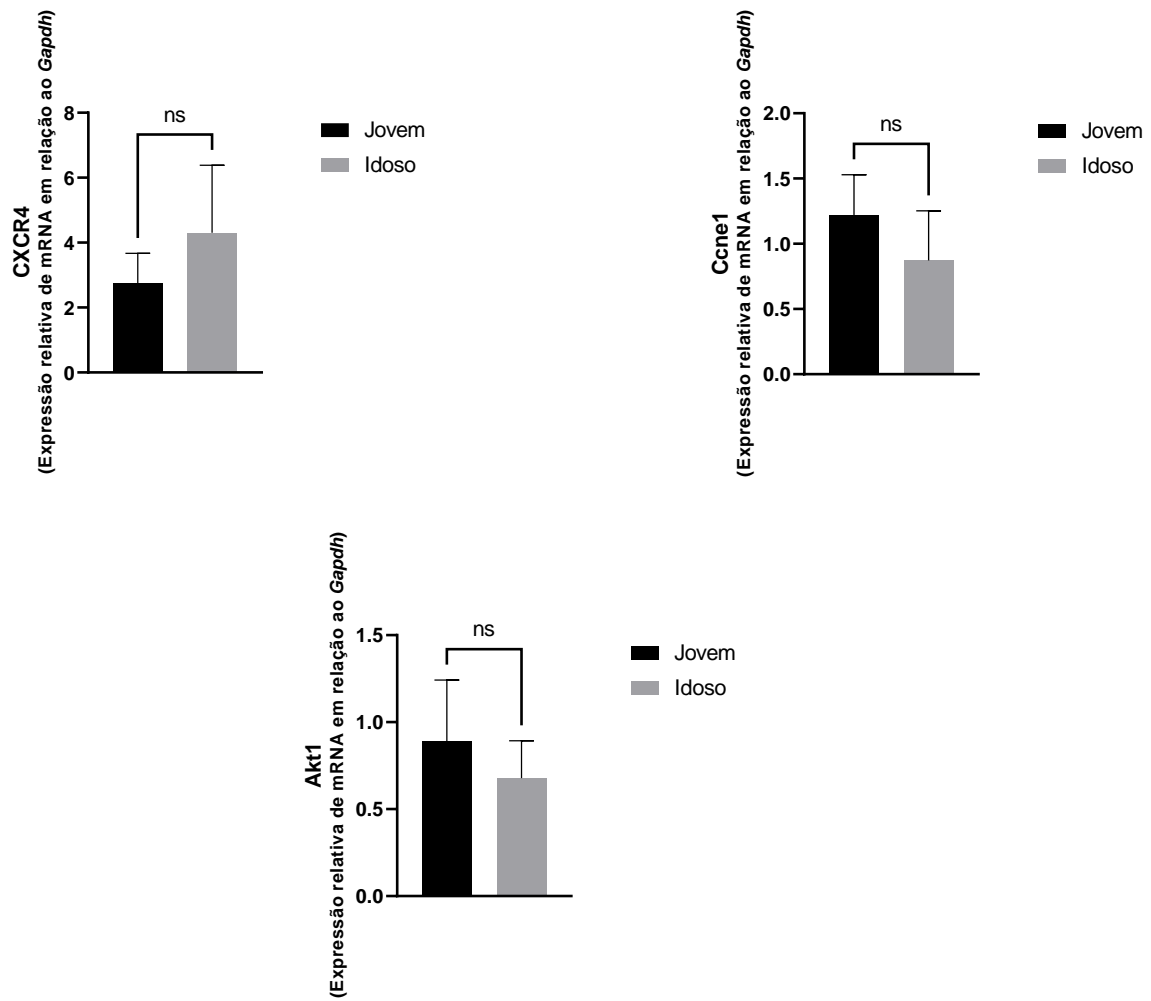


Figura 34. Resultados de expressão gênica para os genes *Sp1*, *Gata3*, *Cebpa*, *Stat3*, *Cxcr4*, *Ccne1* e *Akt1* dos grupos controle (n = 6) e idoso (n = 5 para *Sp1*, n = 6 para os demais). Valores estão representados na forma de média \pm desvio padrão e foram comparados utilizando o teste T de Student. ns: não significante.

6. DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (2021), as pessoas idosas representam 13,5% da população mundial no ano de 2021, um quantitativo levemente acima de 1 bilhão. Levando em conta essa grande representação, a Organização das Nações Unidas estabeleceu que a década de 2021-2030 possui como objetivo o envelhecimento saudável, um esforço dependente de civis, agências internacionais, pesquisadores, da mídia e do setor privado. Para a OMS, entende-se envelhecimento saudável é definido como o ganho de idade com perda funcional minimizada, prevenindo doenças e mantendo a capacidade intrínseca do indivíduo.

Neste contexto, envelhecimento é o progressivo declínio na integridade funcional e na homeostasia fisiológica, culminando na disfunção tecidual, falência de órgãos e, por fim, na morte (SONG *et al*, 2020). Este processo é complexo e multifatorial, afetando uma população de maneira individual, nem todos os indivíduos envelhecem de maneira igualitária, de modo que o fenótipo do envelhecimento possui um certo grau de plasticidade (SGARBIERI & PACHECO, 2017).

Do ponto de vista celular e molecular, o envelhecimento é constituído de 9 características importantes denominadas de “*hallmarks*”. Conforme descrito por López-Otin *et al* (2013), os *hallmarks* do envelhecimento são caracterizados por: alterações na comunicação intercelular, instabilidade genômica, atrito de telômeros, mudanças epigenéticas, perda de homeostase proteica, desregulação na capacidade sensorial para nutrientes, disfunção mitocondrial, senescência celular e exaustão de células tronco.

O envelhecimento do sistema hematopoético é associado com uma perda na capacidade de originar células da linhagem linfoide. Em contrapartida, a CTH terá um direcionamento mais voltado para a linhagem mieloide, além também dessa célula tronco estar presente em maiores quantidades quando comparado ao sistema hematopoético de indivíduos jovens (BEERMAN *e al*, 2010.; BEERMAN, 2019). Estes fatores estão potencialmente relacionados com alterações nos exames hematológicos, sendo assim, pacientes idosos possuem maior risco de desenvolvimento de citopenias, mais predominantemente, de anemia e linfopenia, seguido de doenças onco-hematológicas (GROARKE & YOUNG, 2019).

Outra consequência da sobrecarga de mutações em CTH é a perda de *fitness* celular, levando em consideração que danos ao DNA são mais prováveis de impactar negativamente as funções celulares. Diante disto, também é notado em CTH envelhecidas uma menor capacidade para reconstituir o sistema hematopoético após mieloablação em comparação a CTH jovens, assim como também há uma menor capacidade de *homing* e de enxertamento (WARREN & ROSSI, 2009.; ROSSI *et al*, 2005.; BEERMAN *et al*, 2010.; CHAMBERS *et al*, 2007.;

MORRISON *et al*, 1996.; MILLER & ALLMAN, 2005.; HENRY *et al*, 2010.; LIANG; VAN ZANT; SZILVASSY, 2005.; HENRY; MARUSYK; DEGREGORI, 2011).

Quanto a sua relação com o ambiente hematopoético no envelhecimento, técnicas de imagem em camundongos envelhecidos permitiram elucidar que as CTH mudam sua localização na medula em relação aos jovens. No nicho envelhecido, as CTH encontram-se mais próximas de células perivasculares Nestina-GFP^{dim} e de sinusoides, estando distantes de arteríolas e de megacariócitos (MARYANOVICH *et al*, 2018.; SAÇMA *et al*, 2019.; YANG & HAAN, 2021).

Somado a isto, existem evidências de um remodelamento da estrutura vascular da medula, havendo um aumento generalizado da densidade vascular, além também de haver uma redução na frequência de células endoteliais (YANG & HAAN, 2021.; MATTEINI; MULAW; FLORIAN, 2021).

Outro fator natural do envelhecimento que afeta não somente o funcionamento do compartimento hematopoético, como de outras regiões do corpo, é a liberação de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias de maneira crônica, fenômeno intitulado de “*inflammaging*”. Acredita-se que este seja um dos possíveis fatores que esteja contribuindo no direcionamento da CTH para a linhagem mieloide, em detrimento da linfoide. O processo de *inflammaging* ocorre devido ao acúmulo de células senescentes, possuindo assim um fenótipo de secreção diferente das células jovens que favorece a secreção de substâncias pró-inflamatórias como citocinas, quimiocinas, lipídios bioativos e exossomas (FRANCESCHI & CAMPISI, 2014.; KOVTONYUK *et al*, 2016.; BENAYOUN *et al*, 2019.; KIRKLAND & TCHKONIA, 2020.; KALE *et al*, 2020.; MATTEINI; MULAW; FLORIAN, 2021).

Desse modo, como o processo de envelhecimento tende a afetar diretamente o sistema hematopoético em sua totalidade, esta pesquisa possui o intuito de investigar o papel das CTM nesse contexto, a fim de melhor elucidar as alterações decorrentes do envelhecimento no papel regulatório dessas células-tronco.

Para avaliar o tecido hematopoético no envelhecimento, foram utilizados modelos animais de camundongos pertencentes a uma linhagem de C57BL/6, todos de sexo masculino e isogênicos, para evitar alterações decorrentes de fatores genéticos e em função de variações hormonais em função do ciclo estral presente no sexo feminino. Dividindo em grupos etários, foram considerados jovens os animais que apresentavam de 3 até 5 meses de idade, sendo já presente nesse período a maturação do sistema hematopoético (FOCK, 2005). Para idosos, foram utilizados animais de 18 até 19 meses.

Embora não se tenha observado uma diferença no padrão de consumo de ração, consumo proteico e na variação de peso, a literatura descreve que camundongos idosos, quando comparado com jovens, são mais pesados devido ao acúmulo de massa gordurosa.

Vivian (2021), ao estudar camundongos jovens e idosos, mostrou através de radiografia como os animais tendem a acumular gordura no envelhecimento, aumentando assim o peso corpóreo relativo, fenômeno este não observado em animais submetidos à condição de desnutrição proteica. Isto compreende uma alteração metabólica no envelhecimento dos animais, sendo também descritas na literatura alterações genômicas e bioquímicas (HOUTKOOPE *et al*, 2011).

A albumina, proteína presente em abundância no plasma, pode ser utilizada como um biomarcador do envelhecimento em camundongos. Conforme postulado por Ding & Kopechick (2011), dos fragmentos de albumina quantificados em sua obra, um total de 5 isoformas da proteína estavam diminuídas a partir dos 8 meses, incluindo as isoformas de 6, 7, 8 e 9. Adicionalmente, a isoforma 18 estaria diminuída a partir dos 12 meses de idade. Isto está em concordância com os nossos achados, onde a mensuração de albumina no soro de animais idosos esteve reduzida em comparação com os animais jovens.

Entre outros marcadores bioquímicos, foi notada uma diferença nos níveis de ALT entre os animais jovens e idosos. Em diversas espécies, o envelhecimento tende a estar associado com uma perda de volume hepático, diminuição no fluxo de sangue no fígado, e alterações morfológicas nos hepatócitos (KIM; KISSELEVA; BRENNER, 2015.; SCHMUCKER, 2005.; JIN *et al*, 2020). Embora este marcador ainda esteja nos valores de referência, pode-se sugerir que ele esteja associado com um processo idade-dependente de lesão hepática.

Outra alteração no envelhecimento envolve a maior frequência de distúrbios metabólicos, como dislipidemia e hiperinsulinemia. Na literatura, é descrito como modelos animais utilizando camundongos tendem a apresentar uma maior alteração no nível de colesterol total quando comparado a animais jovens, que em contrapartida apresentam um maior aumento na fração *High Density Lipoprotein* (HDL) (KOROU *et al*, 2013.; FARHADI *et al*, 2020). Em concordância com estes achados, os animais idosos apresentaram um maior nível de colesterol total quando comparado aos animais jovens.

Somado a isto, os animais idosos apresentaram um menor nível de triglicerídeos quando comparado aos animais jovens. Segundo Johnson & Stolzing (2019), os níveis deste marcador, assim como outros parâmetros bioquímicos, podem ser diretamente relacionados com o envelhecimento. Portanto, em animais idosos, é esperado um menor nível de triglicerídeos,

enquanto há um aumento na concentração de ácidos graxos (HOUTKOOOPER *et al*, 2011.; JOHNSON & STOLZIG, 2019).

Partindo para a avaliação hematológica, não foi notada nenhuma diferença estatisticamente significativa nos parâmetros do sangue periférico entre animais idosos e jovens. Todavia, o sistema hematopoético sofre alterações com o avanço na idade, conforme evidenciado pela citometria de fluxo.

Quando analisadas as populações celulares no sangue periférico por imunofenotipagem, foi notada uma grande redução nos números de linfócitos B (B220⁺), linfócitos T citotóxicos (CD4⁺CD8⁺) e monócitos (CD11b⁺F4/80⁺). Contrariamente, o quantitativo de células *natural killers* (NK1.1⁺CD49b⁺) e de granulócitos (CD11b⁺Gr-1⁺) estiveram aumentados. De maneira similar, Chung & Park (2019) postularam que, devidos a fatores extrínsecos e intrínsecos celulares, idosos tendem a apresentar uma menor contagem de eritrócitos e linfócitos, havendo um aumento relativo no número de precursores mieloides.

As alterações vistas no sangue periférico são reflexos de mudanças no funcionamento do compartimento hematopoético e, no caso da linhagem linfoide, são consequências também do comprometimento de outros órgãos. No âmbito de linfócitos T, há uma íntima relação do envelhecimento com o processo de involução tímica, havendo perda de volume cortical e medular, e também substituição de sua estrutura por tecido adiposo (STEINMANN, 1986.; PALMER, 2013.; AKHA, 2018).

Enquanto que a produção de células mieloides depende exclusivamente de interações com fatores presentes na medula, o mesmo não se aplica para a linhagem linfoide, pois além da produção celular, é necessário também garantir a diversidade clonal da qual o sistema imunológico depende (SCADDEN, 2019). Portanto, além de se observar alterações quantitativas, principalmente nas populações de linfócitos CD8⁺ e B220⁺, pode também haver perda de funcionalidade.

Tais efeitos não se limitariam a estas células, mas como também para outras populações que mantiveram uma quantidade estável observada no envelhecimento. Como exemplo, os linfócitos CD4⁺ podem possuir uma menor diversidade de receptores, comprometendo suas funções. A restauração deste repertório nestas células se mantém um desafio, não havendo soluções aplicáveis para uso clínico (SHAH *et al*, 2019).

Similarmente, os linfócitos B também sofrem de alterações em seu repertório, com estudos demonstrando principalmente um número menor de precursores da linhagem B com o envelhecimento, havendo também a menor presença de células *naïve*, favorecendo a presença

de células já expandidas pós-apresentação de antígenos (MCKENNA *et al*, 2001.; SIEGRIST & ASPINALL, 2009.; FRASCA *et al*, 2011.; AKHA, 2018).

Para as alterações na linhagem mieloide, foi notado principalmente uma redução no quantitativo de monócitos e um aumento no número de granulócitos. Existem poucos dados na literatura relacionando monócitos com o envelhecimento, sendo mais dedicado ao estudo de macrófagos. Em camundongos idosos, há uma maior permeabilidade intestinal, resultando na maior secreção de lipopolissacarídeo, que em turno ativa a população monocitária e resulta numa resposta inflamatória. Ademais, em ocasiões de maior circulação de fator de necrose tumoral α (TNF α), há um recrutamento de monócitos jovens da medula óssea, comprometendo assim a resposta perante infecções (THEVARANJAN *et al*, 2017.; KIM *et al*, 2016.; PUCHTA *et al*, 2016.; DE MAEYER & CHAMBERS, 2021).

O maior número de granulócitos no sangue periférico observados pela imunofenotipagem também são exemplos de como o microambiente hematopoético é alterado no envelhecimento. Estas alterações criam um *bias* ou “vício” mieloide, acarretando na maior produção dessas células. Situações que favorecem a linhagem mieloide foram descritas previamente e incluem o processo de *inflammaging*, pela grande participação de citocinas pró-inflamatórias, estimulando a linhagem mieloide. É válido também ressaltar que estas alterações na linhagem mieloide não se limitam ao espaço hematopoético, como também podem estar relacionadas com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e malignas (FRODERMANN & NAHRENDORF, 2018.; AKBAR; HENSON; LANNA, 2016.; GUSTAFSSON & SCADDEN, 2019).

Utilizando o mielograma para avaliar o compartimento hematopoético, foi de fato notado um aumento em precursores da linhagem mieloide, seguido de uma redução em precursores eritroblásticos e eritroblastos maduros, assim como uma queda na celularidade em geral.

As alterações consequentes do envelhecimento entre células da medula óssea são bem conhecidas, entre elas está a perda de capacidade de gerar uma resposta imunológica adaptativa, maior incidência de anemia e maior risco para o desenvolvimento de distúrbios mieloproliferativos (DORSHKIND & SWAIN, 2009.; EISENSTAEDT; PENNINX; WOODMAN, 2006.; LICHTMAN & ROWE, 2004.; PANG; SCHRIER; WEISSMAN, 2017.; POULOS *et al*, 2017). O motivo pelo qual se há o favorecimento da linhagem mieloide com a perda gradual da população com potencial linfoide ainda não é bem conhecida, havendo diferentes propostas na literatura envolvendo a expressão de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6, *chemokine ligand 5* (CCL5), entre outros elementos, que consequentemente direcionam

para a alteração do fenótipo celular, adquirindo assim o aspecto envelhecido (POULOS *et al*, 2017).

Deste modo, o tecido hematopoético envelhecido apresenta um *pool* expandido de CTH, com maior frequência de diferenciação em progenitores da linhagem mieloide (MATTEINI; MULAW; FLORIAN, 2021). Similarmente, a quantificação de populações hematopoéticas neste presente trabalho encontrou, entre animais idosos, um maior número de CTHs e GMPs, enquanto houve uma redução de CLPs. As alterações nestas frações jovens de células repercutem no quantitativo de células maduras, onde no compartimento medular nós constatamos uma queda significativa na população de eritrócitos e linfócitos B, enquanto se observou um aumento na população de células NK.

Embora se tenha este aumento no quantitativo de células NK, a perda de funcionalidade descrita anteriormente entre outras populações linfoides se mantém relevante, pois conforme descrito por Gounder *et al* (2018), essas células apresentam perda de capacidade lítica, e seu maior número pode ser resultante da presença de células NK de longa duração.

Quanto a população de CTMs em animais envelhecidos, foi notada uma menor expressão do marcador CD73 entre os animais idosos. Esta proteína, conhecida como ecto-5'-nucleotidase é considerado um marcador clássico de CTM, participando na mudança de estado pró-inflamatório para anti-inflamatório (CHEN & FRANGOIANNIS, 2017.; TAN *et al*, 2019).

Este marcador atua como uma enzima exógena envolvida em transdução de sinais, realizando assim uma hidrólise para converter o monofosfato de adenosina em adenosina e ácido fosfórico, interagindo então com receptores de adenosina presentes em superfícies celulares para poder então modular diversos efeitos orgânicos. Somado a isto, o CD73 possui também uma função de sinalização e adesão, mediando a interação célula-matriz extracelular (LI *et al*, 2021.; MENG *et al*, 2019.; YAN *et al*, 2019).

O isolamento de CTMs CD73⁺ traz consigo uma população de células estromais, sendo possível utilizar como um marcador de maior *stemness*, já que essa fração celular é mais proliferativa e apresentam maior potencial de diferenciação *in vitro* quando comparada a CTMs CD73⁻. Além de descrever isto, Kimura *et al* (2021) também mostram como células CD73-EGFP⁺ endógenas da medula óssea contribuíram na formação de osso, cartilagem e vascularização durante o reparo tecidual e como também essas células “enxertaram” para o local lesionado após fratura.

As CTMs vêm sido bastante exploradas no âmbito de aplicação clínica devido ao seu crescente potencial mostrado na pesquisa básica. Li *et al* (2021) demonstraram que as CTMs

CD73⁺ derivadas de tecido adiposo secretam fatores relacionados a vascularização e crescimento celular. Estas mesmas CTMs CD73⁺ de tecido adiposo também se mostraram mais eficazes na aceleração de reparo da função cardíaca em modelos de infarto agudo do miocárdio utilizando ratos.

Com o isolamento das CTMs obtidas, essas foram expandidas *in vitro* para observar seus aspectos morfológicos. Em geral, as CTMs dos grupos estudados não apresentaram diferenças morfológicas, com todas apresentando o aspecto fusiforme ou fibroblasto-*like*. Quanto à capacidade de diferenciação, as células estromais isoladas apresentaram capacidade adipogênica, osteogênica e condrogênica (dados não mostrados. HASTREITER *et al*, 2021). As CTMs obtidas também se apresentaram senescentes (dados não mostrados. DA SILVA *et al*, 2022).

Yang et al (2018) realizaram o envelhecimento *in vitro* de CTMs através de múltiplas passagens, mostrando como essas células vão adquirindo alterações fenotípicas e morfológicas. CTMs mantidas em um maior número de passagens tiveram perda de sua aparência fusiforme, além de também apresentar instabilidade genômica e comprometimento na capacidade osteogênica, enquanto o potencial adipogênico se manteve.

Em sequência, também foram avaliadas diferenças no secretoma das CTMs, principalmente envolvendo fatores solúveis que influenciam a regulação de células hematopoéticas. Diante disto, foram avaliados os fatores CXCL12, SCF, IL-6, IL-11 e IL-3 pelo método de ELISA. Entre estes, o único que não apresentou diferença estatisticamente significativa quando feita a comparação entre os grupos de animais jovens e idosos foi o fator IL-3.

Quando comparado as CTMs de animais jovens, essas células estromais envelhecidas apresentaram uma maior produção de CXCL12, fator responsável por promover o *homing* de CTHs (MASSARO *et al*, 2021). Para o CXCL12 desempenhar sua função, ele necessita se ligar com o seu receptor, o CXCR4. Porém, a ativação da via CXCL12/CXCR4 não é relacionada somente com *homing*, sua ativação também modula a proliferação, como postulou Schelker et al (2018) em sua pesquisa, onde é descrito como a via modula proliferação e sensibilidade a quimioterapia em células de LMA mantidas em co-cultura com CTMs.

Adicionalmente, He et al (2022) também descrevem outro papel importante sobre a interação CXCL12-CXCR4, onde as CTMs foram responsáveis por inibir a apoptose de células epiteliais alveolares em camundongos com problemas respiratórios. A participação do CXCL12 neste processo se tornou evidente quando foi feito *knockdown* de CXCR4, que consequentemente fez o fenômeno anti-apoptótico não ser mais observado.

Logo, uma maior produção de CXCL12 por parte das CTMs medulares não implica somente no maior *homing* de CTHs para regiões da medula, e sim como também pode fornecer um sítio que favoreça a proliferação dessa população celular.

Com o envelhecimento, as CTMs adquirem o chamado SASP, um perfil secretor onde há predomínio de fatores pró-inflamatórios (ZHOU *et al*, 2020). Entre os fatores associados com esse perfil está a IL-6, uma citocina também de natureza pró-inflamatória. O achado aqui descrito de que CTMs envelhecidas secretam maiores concentrações de IL-6 está de acordo com o trabalho de Gnani *et al* (2019), onde foi detectado o aumento em várias citocinas inflamatórias, entre elas, a IL-6.

Além do papel inflamatório, a IL-6 também está relacionada com a regulação do microambiente medular. Quando presente em maiores concentrações, ela pode ser um fator desencadeador de atividade osteoclástica e, quando em concentrações mais altas, pode iniciar até processos osteolíticos. Como o próprio tecido ósseo participa da regulação hematopoética, pode-se supor que as altas concentrações de IL-6 também influenciariam a hematopoese por meio desse tecido (HARMER; FALANK; REAGAN, 2019). Neste mesmo processo, a IL-6 é também responsável pela diferenciação na linhagem mieloide (MATTEINI; MULAW; FLORIAN, 2021).

Em contraste, a IL-11, interleucina pertencente à família da IL-6, é geralmente considerada como de caráter anti-inflamatório, tendo capacidade para regular diferentes células efetoras da resposta imune (PUTOCZKI & ERNST, 2010.; NAJAR *et al*, 2018). Como descrito anteriormente, a maior produção de IL-6, uma citocina pró-inflamatória, e a menor produção de IL-11 de natureza anti-inflamatória pode ser usada como indicador na mudança de um perfil tendendo mais para a pró-inflamação.

Neste trabalho, buscou-se também avaliar a expressão de vários genes relacionados com os vários papéis nos quais a CTM atua para modular respostas no organismo, e verificar como a expressão desses genes está afetada no envelhecimento. Entre os genes analisados, foi encontrado um aumento na expressão de *Akt1* em CTMs de animais envelhecidos.

O gene *Akt1* é responsável por codificar a proteína Akt, proteína envolvida em processos relacionados com sobrevivência (autofagia e apoptose), migração, proliferação, metabolismo da glicose e entre outros. Além da Akt, há a mTORC1, que é ativada pela fosfatidilinositol3-quinase (PI3K) e pela Akt, localizada *downstream*. Alguns fatores que podem ativar a via mTORC1 incluem a insulina e outros fatores de crescimento. (GINGRAS *et al*, 1998.; BHASKAR & HAY, 2007).

Para que se tenha atividade de Akt, é necessária a presença de níveis moderados de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esta elevação promotora de Akt inibe o grupo de proteínas chamado de FoxO, o que consequentemente diminui a autofagia (KLOTZ *et al*, 2015.; KMA & BARUAH, 2021). Conforme descrito anteriormente, alterações nos mecanismos autofágicos fazem parte dos *hallmarks* do envelhecimento, trazendo à tona a relevância da via Akt/mTORC1 neste estudo à tona.

Neste contexto, elucidando a relação entre senescência e as CTMs, Yang *et al* (2018) demonstraram que não só o aumento ROS ativando a via Akt/mTORC1, mas como também evidenciaram que a adição de ácido ascórbico como um bloqueador de ROS acarretava na redução no número de células senescentes. Portanto, é possível postular uma correlação da maior expressão do gene *Akt1* como um marcador de senescência celular, visto que no estudo aqui realizado foi notada sua maior expressão em CTMs envelhecidas.

Outro gene relacionado ao metabolismo de CTMs que mostrou alteração foi o *ppar-γ*. Fortemente relacionado com a lipogênese e adipogênese, o *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma* (PPAR- γ) faz parte de uma família de receptores que possui três tipos: α , δ e γ . Este receptor se liga a sequências de DNA e regula a expressão dos genes alvo após heterodimerizar com o receptor X de retinoides, sendo sua ativação dependente de ácidos graxos não saturados (FERRE, 2004.; TONTONOV & SPIEGELMAN, 2008.; KLIEWER *et al*, 1992.; KLIEWER *et al*, 1997.; CHANG *et al*, 2022).

Diante disto, sua atuação sobre as CTMs não é diferente. Sabe-se que o PPAR- γ é um fator que atua sobre as CTMs durante a escolha de diferenciação entre a linhagem adiposa ou óssea. Quando há uma redução na expressão de PPAR- γ , a formação de osteoblastos é aumentada e a diferenciação em adipócitos, reduzida. Portanto o PPAR- γ é o fator transcricional chave para a diferenciação de CTMs em células adiposas (LI *et al*, 2017).

O grupo de animais idosos avaliados nesta pesquisa mostrou um aumento significativo na expressão do *ppar-γ*, o que pode possuir uma relação com a maior adiposidade medular comum no envelhecimento. Não obstante, uma das teorias por trás da menor massa óssea e maior massa adiposa, um fato que ocorre de maneira inversamente proporcional a idade de um indivíduo, é o comprometimento de CTMs para essas respectivas linhagens. Portanto, este é um processo que pode envolver tanto a via do PPAR- γ , quanto a via Wnt, responsável pela diferenciação óssea (LI *et al*, 2017.; NEHLIN *et al*, 2019).

Uma grande dificuldade que permanece atual no manejo de CTHs *in vitro* é a dependência dessa célula pelas inúmeras interações regulatórias que ela realiza na medula óssea. Logo, pesquisas têm sido feitas para desenvolver métodos de expansão *ex vivo* destas

células. Guo et al (2018) mostraram que, ao inibir a sinalização do PPAR- γ , a expansão *ex vivo* de CTHs e de progenitores hematopoéticos derivados de cordão umbilical foi promovida, a expressão de genes de diferenciação nessa população progenitora foi reduzida, e o processo glicolítico foi estimulado de maneira sem ser prejudicial as mitocôndrias. Adicionalmente, a expansão descrita foi completamente inibida pela remoção de glicose ou pela inibição da via glicolítica.

Diante disto, além do PPAR- γ ser predominantemente associado com diferenciação para a linhagem adipocítica, ele também pode ser referenciado como um possível regulador de populações hematopoéticas, trazendo assim uma nova vertente ao interpretar os resultados descritos anteriormente.

O gene *Nos*, codificante da enzima NOS, também mostrou ser mais expresso entre as CTMs provindas de animais envelhecidos. Esta enzima, em conjunto com outros fatores membros do secretoma de CTMs, formam o arcabouço imunorregulatório dessas células estromais, onde a NOS produz óxido nítrico, capaz de interromper o ciclo celular pela via *Janus kinase/signal transducers and activators of transcription* (JAK-STAT), além de modular atividades das vias *Mitogen-associated protein kinase* (MAPK) e NF- κ B, causando apoptose (ELEUTERI & FIERABRACCI, 2019).

A partir disto, o principal papel de NOS a partir das CTMs será de caráter imunorregulatório, podendo ser exemplificado através da relação macrófago-CTM, a qual é bem descrita na literatura, onde os macrófagos adquirem diferentes fenótipos funcionais através de suas interações com o meio. Macrófagos tipo M1 ativados são reconhecidamente pró-inflamatórios devido ao alto nível de expressão da enzima NOS, assim como também produzem altas quantidades de óxido nítrico, TNF α , IL-1 β e IL-12 (WANG *et al*, 2010.; PHLIPP *et al*, 2018).

Fora do eixo imunorregulador, Li et al (2020), ao induzirem disfunção mitocondrial e estresse oxidativo em CTMs medulares, observaram perda da integridade do DNA através da quebra de fitas duplas em células hematopoéticas. Isto foi encontrado através da co-cultura de CTMs tratadas com daunorubicina com as células hematopoéticas, induzindo o estresse oxidativo. Portanto, a maior expressão de *Nos*, além de influenciar a imunorregulação das CTMs, pode ser um fator influenciador na hematopoese.

Contrariando os genes previamente discutidos, o gene *Csf3*, responsável por codificar o fator de crescimento G-CSF, teve sua expressão reduzida entre as CTMs obtidas de animais envelhecidos quando comparado às CTMs de animais jovens. Além de ser um fator de expansão para a linhagem granulocítica, a administração de G-CSF causa também a depleção de

macrófagos, o que em si gera uma menor expressão de *Cxcl12*, *Vcam* e *Scf* pelas células estromais. O conjunto destes dados levam a uma menor aderência de células hematopoéticas com o microambiente da medula óssea, fazendo essas células migrar para a circulação periférica (DE KRUIJF *et al*, 2018). Somado a isto, o G-CSF modula subpopulações de células NK, reduz a produção de TNF- α , IL-2, IFN- γ e regula respostas imunológicas (YU *et al*, 2018.; FRANZKE *et al*, 2003.; CHANG *et al*, 2019.; LI *et al*, 2022).

Como já fora descrito, o envelhecimento traz consigo uma alteração na hematopoese onde a diferenciação segue com preferência para a linhagem mieloide (GUSTAFSSON & SCADDEN, 2019). Naturalmente, com este predomínio, poderia se esperar um maior estímulo na produção de G-CSF, contrariando o encontrado neste trabalho. Todavia, pela própria complexidade da medula óssea, existem outras células produtoras de G-CSF, como macrófagos, células endoteliais e também fibroblastos (BOETTCHER *et al*, 2014.; LI *et al*, 2022). Em situações inflamatórias, as células endoteliais são as principais produtoras de G-CSF por meio de sinalização dos receptores *toll-like 4*, estabelecendo assim a granulopoese emergencial (BOETTCHER *et al*, 2014.; BOETTCHER *et al*, 2012.; MITROULIS *et al*, 2020). Portanto, um fator que pode explicar o crescimento da linhagem mieloide é o estímulo de outras populações celulares presentes na medula óssea que apresentam produção do G-CSF, como as populações aqui descritas anteriormente.

Assim como o gene formador de G-CSF, o *Cdh2*, responsável por codificar a n-caderina também esteve diminuído nas CTMs de animais envelhecidos. As caderinas são proteínas que interagem com íons Ca^{2+} para realizar as ligações célula-célula. O papel destas proteínas também vai além de realizar ligações, atuando na regulação de diferenciação, proliferação, polaridade e manutenção de *stemness* (KOURTIDIS *et al*, 2015.; SCHAFER *et al*, 2014.; WANG *et al*, 2018.; PASSANHA *et al*, 2020).

Estas implicações, conseqüentemente, reverberam na regulação das CTHs. Dados mais recentes mostram que populações progenitoras da linhagem óssea e estromal que são n-caderina⁺ mantêm uma população de CTHs altamente quiescentes, sendo consideradas células “de reserva”. Isto assim implica que, além de mediar a adesão celular, as caderinas podem definir microambientes na medula destinados especificamente para realizar a hematopoese em situações emergenciais (ZHAO *et al*, 2019.; HO & MÉNDEZ-FERRER, 2020).

Sabe-se também que o microambiente existente na medula óssea sofre um intenso remodelamento no envelhecimento, trazendo alterações envolvendo as diferentes populações celulares que ali residem e a influência dessas sobre a CTH. Entre estas alterações, está a

disfunção de CTMs, remodelamento vascular, alterações na inervação simpática, inflamação crônica ou *inflammaging*, dentre outros (HO & MÉNDEZ-FERRER, 2020).

A combinação destes fatores traz consigo no envelhecimento um maior distanciamento de CTHs a determinadas regiões ou células reguladoras, como a região endosteal, arteriolar, de megacariócitos e de células Nestina-GFP^{high}. Portanto, pode-se supor que a menor expressão do gene codificante de n-caderina também possa ser um fator contribuinte no distanciamento de CTHs em relação a determinadas regiões compostas por CTMs (MARYANOVICH *et al*, 2018.; HO *et al*, 2019.; SACMA *et al*, 2019.; HO & MÉNDEZ-FERRER, 2020). Unindo estas informações, é possível traçar a possibilidade de uma relação entre a menor expressão de n-caderina em CTMs envelhecidas com o maior distanciamento de CTHs visto no microambiente medular conforme o envelhecimento.

Os demais genes avaliados para investigar a regulação das CTMs a nível molecular, *sp7*, *mTORC1* e *Angpt1*, não mostraram diferenças estatisticamente significante quando comparado o grupo controle com o grupo envelhecido.

Iniciando a análise de como as CTMs podem influenciar a regulação hematopoética de células pertencentes à linhagem C1498, foram realizados os ensaios de proliferação *in vitro* para determinar se as CTMs de animais jovens e idosos induzem um estado de maior ou menor proliferação.

Conforme mostrado anteriormente, a cultura condicionada de células C1498 com sobrenadante de CTMs envelhecidas acarretou em um maior potencial proliferativo da célula. De maneira similar, Garrido *et al* (2001) postulou que o contato direto de amostras da medula em situação de LMA com a linhagem estromal HS-5 gerou um maior potencial proliferativo, maior viabilidade e também maior capacidade clonogênica entre células primárias de LMA comparadas a células que não possuíam suporte estromal.

Atualmente, a literatura descreve como populações de células leucêmicas podem “reprogramar” o ambiente medular para criar uma região propícia para a progressão e resistência da doença (SALAZAR-TERREROS & VERNOT, 2022). Portanto, o fato de ter sido observada uma maior proliferação de células malignas pode ser fruto de uma interação de duas vias entre a linhagem C1498 com o sobrenadante estromal.

É importante ressaltar que a reconstrução do microambiente medular no contexto de malignidade hematopoética é uma na qual, além de favorecer a progressão da doença, há a supressão da hematopoese fisiológica. Análises ao nível de *single-cell* indicam que um dos mecanismos por trás deste fenômeno é a total desregulação de genes cruciais para a CTH, principalmente nos genes *Cxcl12* e *Kitl* pelas CTMs LepR⁺ (BARYAWNO *et al*, 2019).

Diante disto, há a possibilidade da maior proliferação ser decorrente da natureza maligna da linhagem C1498, e sua inerente habilidade em liderar a atividade metabólica de células estromais. Neste contexto, a malignidade da C1498 se associa com outros fatores alterados presentes no microambiente medular que irão favorecer a sua proliferação. Um exemplo disto é o aumento na produção de SCF encontrado nas CTMs, um dado que foi demonstrado tanto pelo método de ELISA quanto a nível de expressão gênica.

SCF é uma proteína pró-inflamatória que, ao se ligar com o seu receptor chamado de c-kit, induz a proliferação e diferenciação celular. Na literatura, estudos já mostram uma maior concentração de SCF e suas diferentes isoformas em doenças como a leucemia linfocítica crônica, e o aumento na concentração desse fator também ocorre como resposta ao estresse oxidativo causado por ROS em tecidos inflamados (HSUEH *et al*, 2019.; LIU *et al*, 2007.; LENNARTSSON & RÖNNSTRAND, 2012.; GENIS *et al*, 2014.; AFONYUSHKIN; OSKOLKOVA; BOCHKOV, 2018.; GAVRIILIDIS *et al*, 2021).

Diante disto, as CTMs envelhecidas fornecem um ambiente propício para a proliferação celular. Indo além somente do funcionamento das CTMs, esta pesquisa também buscou alterações emergentes na linhagem C1498 como resultado dessa interação com as CTMs. Conforme descrito mais adiante, as próprias células malignas irão apresentar alterações intrínsecas em seu funcionamento que irão favorecer sua proliferação.

Em sequência foi proposto avaliar se o sobrenadante afeta a capacidade migratória da linhagem C1498. Com os resultados obtidos, notou-se uma maior taxa de migração entre as células em direção ao meio condicionado de CTMs envelhecidas. Optou-se por utilizar meio DMEM sem a presença de SBF para este ensaio pois o próprio SBF funciona como um atraente em ensaios utilizando *transwells* (ZAKI *et al*, 2019), o que dificultaria a análise se o resultado obtido era, de fato, decorrente das CTMs. Ainda, conforme descrito anteriormente, as CTMs envelhecidas tiveram uma maior secreção de CXCL12, logo, este pode ter sido um fator atraente para as células malignas, aumentando o *homing*. Outras possibilidades para eixos que influenciariam a migração celular incluem CCL27-CCR10, CCL19/CCL21-CCR7 e CCL5-CCR5 (CUESTA-GOMEZ *et al*, 2021). Contudo, o estudo destes foge da proposta da presente pesquisa.

Por fim, foi avaliado como as CTMs obtidas de animais jovens e envelhecidos poderiam influenciar na expressão gênica de proteínas relacionadas à regulação hematopoética na linhagem C1498. Os genes adotados como de interesse nesta pesquisa foram: *Sox2*, *Nanog*, *Sfpi1*, *Pou5f1*, *Gata3*, *Cebpa*, *Stat3*, *Cxcr4*, *Cdkn1a*, *Ccne1* e *Akt1*. Entre todos os genes analisados, *Sox2*, *Nanog*, *Pou5f1* e *Cdkn1a* mostraram diferença estatística quando comparado

os grupos estudados, com *Sox2*, *Nanog* e *Pou5f1* estando mais expressos na linhagem C1498 que esteve em contato com a cultura condicionada de CTMs envelhecidas, enquanto que o *Cdkn1a* teve sua expressão reduzida nesse mesmo grupo.

A família de genes *Sox* compreende grupos de fatores transcricionais com papéis essenciais no desenvolvimento celular. Os fatores podem ser divididos em SOXB1, SOXE e SOXF, estando altamente envolvidos com direcionamento de linhagem. *Sox2*, o gene analisado nesta pesquisa, pertence à família SOXB1 e é um dos mais estudados em relação à gênese tumoral, sabendo-se que ele possui capacidade de aumentar a proliferação, sobrevivência e bloquear a diferenciação em situações malignas (SCHEPERS; TEASDALE; KOOPMAN, 2002.; JULIAN; MCDONALD; STANFORD, 2017.; SARKAR & HOCHEDLINGER, 2013.; TOSIC *et al*, 2018).

Adicionalmente, o *Sox2* pode ser utilizado como um marcador prognóstico de LMA. Tosic *et al* (2018) ao verificar a expressão gênica de diversos membros da família SOX, verificaram que 10% dos pacientes com LMA apresentavam um aumento na expressão de *Sox2*, com esses pacientes apresentando pior prognóstico e menor probabilidade de sobrevivência.

Em concordância com resultados prévios, foi descrita uma maior atividade proliferativa da linhagem C1498 quando na presença do meio condicionado de CTMs envelhecidas, sendo esse o mesmo grupo que apresentou aumento na expressão de *Sox2*. Portanto, a maior expressão deste gene, poderia explicar, ao menos em parte, a maior proliferação da linhagem no ensaio de proliferação.

Assim como o *Sox2*, o gene *Nanog* mostrou maior expressão quando em contato com o meio condicionado do grupo envelhecido. Sua importância não difere muito do *Sox2*, o *Nanog* é expresso em células leucêmicas e em tumores sólidos, com evidências apontando sua essencialidade na proliferação, invasão, capacidade clonogênica, e na gênese tumoral por células malignas (EBERLE *et al*, 2010.; ZBINDEN *et al*, 2010.; JETER *et al*, 2011.; SHAN *et al*, 2012.; LU *et al*, 2013.; JI & JIANG, 2013.; XU *et al*, 2018).

Nanog, quando ativado por meio do *insulin-like growth factor receptor*, gera uma cascata de sinalização que irá resultar em uma maior proliferação e na supressão do ciclo celular e da apoptose. De forma similar ao *Sox2*, pacientes leucêmicos com elevada expressão de *Nanog* apresentam pior prognóstico (CAO *et al*, 2013.; CAO *et al*, 2014.; VASEFIFAR *et al*, 2022).

Pou5f1, responsável por codificar o Oct4, também se mostrou aumentado entre as células C1498 mantidas em contato com o sobrenadante de CTMs envelhecidas. O fator de transcrição Oct4, assim como a família SOX e o *Nanog*, também é um regulador de

pluripotência, sendo considerado um dos principais reguladores da indução e manutenção dessa característica. Portanto, Oct4 é indispensável no controle da auto-renovação e pluripotência em células tronco embrionárias e em células tronco cancerígenas (JERABEK *et al*, 2014.; NICHOLS *et al*, 1998.; TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006.; SLAMON *et al*, 1986.; KIM *et al*, 2009.; DU *et al*, 2009.; WANG *et al*, 2015.; KERR & HUSSAIN, 2014.; MOHIUDDIN; WEI; KANG, 2020).

Investigando os efeitos da elevada expressão de Oct4 sobre as CTMs derivadas da medula óssea, Guo *et al* (2019) encontraram um sinergismo de Oct4 com Nanog e Sox2, onde OCT4 aumentou a expressão desses outros dois genes de pluripotência, levando a um aumento na capacidade proliferativa e na manutenção de morfologia pelas CTMs. Portanto, a expressão aumentada de Sox2 e Nanog apresentada na linhagem C1498 pode ser uma consequência da maior expressão de Oct4, e também pode ser um dado que explique a maior proliferação dessa linhagem na presença de sobrenadante de CTMs envelhecidas.

Contrariando os genes anteriores, o *Cdkn1a* foi encontrado sendo menos expresso entre a linhagem C1498 mantida em sobrenadante de CTMs de animais envelhecidos. *Cdkn1a* é responsável por originar a proteína p21, antagonista do ciclo celular, onde ela atua inibindo a atividade de diversos complexos de ciclina, promovendo assim a saída do ciclo para que ocorra apoptose, diferenciação ou para que se pare a proliferação (CAZZALINI *et al*, 2010.; KARIMIAN *et al*, 2016.; JURAN *et al*, 2021). Logo, a redução na expressão de *Cdkn1a* indica que as células C1498, quando em contato com CTMs envelhecidas, são induzidas mais frequentemente a terminar o ciclo celular, o que consequentemente também aumenta a proliferação, assim como também impede a diferenciação celular até um certo nível

O conjunto destas alterações moleculares permite inferir que as CTMs envelhecidas proporcionam um meio mais favorável para o desenvolvimento de atividade celular maligna, um no qual onde a proliferação, invasão e sobrevivência de células neoplásicas estão favorecidas, em detrimento da regulação medular destinada a células não-malignas.

7. CONCLUSÃO

O envelhecimento é um fator determinante para que se ocorra alterações nos constituintes do microambiente medular, conseqüentemente, influenciando o processo hematopoético. Através disto, as CTMs apresentam um perfil secretor pró-inflamatório e, no âmbito molecular, também apresentaram um perfil que favorece a proliferação celular. Quando o sobrenadante de CTMs envelhecidas foi mantido em contato com células da linhagem C1498, essas células neoplásicas apresentaram maior potencial migratório, proliferativo e tiveram genes relacionados a *stemness* estimulados, o que pode ter implicações na patogênese e prognóstico da LMA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADOLFSSON, J. *et al.* Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythron-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. **Cell**, v. 121, p. 295-306, 2005.

ADOLFSSON, J. *et al.* Upregulation of Flt3 expression within the bone marrow Lin⁻Sca1⁺c-kit⁺ stem cell compartment is accompanied by loss of self-renewal capacity. **Immunity**, 15, p. 659-669, 2001.

AFONYUSHKIN, T.; OSKOLKOVA, O. V.; BOCHKOV V. N.; Oxidized phospholipids stimulate production of stem cell factor NRF2 dependent mechanisms. **Angiogenesis**, v. 21, n. 2, p. 229-236, 2018

AKBAR, A. N.; HENSON, S. M.; LANNA, A. Senescence of T lymphocytes: implications for enhancing human immunity. **Trends Immunol**, v. 37, p. 866-876, 2016.

AKHA, A. A. S. Aging and the immune system: An overview. **Journal of Immunological Methods**, v. 463, p. 21-26, 2018.

AQMASHEH, S. *et al.* Effects of mesenchymal stem cells derivatives on hematopoiesis and hematopoietic stem cells. **Adv Pharm Bull**, v. 7, n. 2, p. 165-177, 2017.

ARINOBU, Y. *et al.* Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages. **Cell Stem Cell**, v. 1, p. 416-427, 2007.

ASADA, A. *et al.* Differential cytokine contributions of perivascular haematopoietic stem cell niches. **Nature Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 214-223, 2017.

AURRAND-LIONS, M.; MANCINI, S. J. C. Murine Bone Marrow Niches from Hematopoietic Stem Cells to B Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 19, p. 2353, 2018.

BARYAWNO, N. *et al.* A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia. **Cell**, v. 177, n. 7, p. 1915-1932, 2019.

BEERMAN, I. *et al.* Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, p. 5465-5470, 2010.

BEERMAN, I. *et al.* Stem cells and the aging hematopoietic system. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 4, p. 500-506, 2010.

BEERMAN, I. Loss of hematopoietic diversity with age. **Blood**, v. 133, n. 18, p. 1921-1922, 2019.

BENAYOUN, B. A. *et al.* Remodeling of epigenome and transcriptome landscapes with aging in mice reveals widespread induction of inflammatory responses. **Genome Res.**, v. 29, p. 697-709, 2019.

BETHEL, M. *et al.* The changing balance between osteoblastogenesis and adipogenesis in aging and its impact on hematopoiesis. **Current Osteoporosis Reports**, v. 11, p. 99-106, 2013.

BHASKAR, P. T.; HAY, N. The two TORCs and Akt. **Developmental Cell**, v. 12, p. 487-502, 2007.

BOETTCHER, S. *et al.* Cutting edge: LPS-induced emergency myelopoiesis depends on TLR4-expressing nonhematopoietic cells. **J Immunol.**, v. 188, p. 5824-5828, 2012.

BOETTCHER, S. *et al.* Endothelial cells translate pathogen signals into G-CSF-driven emergency granulopoiesis. **Blood**, v. 124, n. 9, p. 1393-1403, 2014.

BONAVITA, O. *et al.* Regulation of hematopoiesis by the chemokine system. **Cytokine**, v. 109, p. 76-80, 2018.

BRADNER, W. T.; PINDELL, M. H. Myeloid leukemia C1498 as a screen for cancer chemotherapeutic agents. **Cancer Res**, v. 26, n. 4, p. 375-390, 1966.

BRESNICK, E. *et al.* GATA switches as developmental drivers. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 41, p. 31087-31093, 2010.

BUG, G. *et al.* Valproic acid stimulates proliferation and self-renewal of hematopoietic stem cells. **Cancer Res**, v. 65, p. 2537-2541, 2005.

CAO, J. *et al.* RNA interference-mediated silencing of NANOG leads to reduced proliferation and self-renewal, cell cycle arrest and apoptosis in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells via the p53 signaling pathway. **Leuk. Res.**, v. 9, p. 1170-1177, 2013.

CAO, J. *et al.* Expression of NANOG gene in acute lymphoblastic leukemia cells and construction of lentiviral vector carrying NANOG specific shRNA. **Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi**, v. 22, n. 2, p. 275-279, 2014.

CAZZALINI, O. *et al.* Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 704, n. 1-3, p. 12-20, 2010.

CHALLEN, G. A. *et al.* Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1. **Cell Stem Cell**, v. 6, p. 265-278, 2010.

CHAMBERS, S. M. *et al.* Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. **PLoS Biol.**, v. 5, n. 8, p. 201, 2007.

CHANG, Y. *et al.* Granulocyte colony-stimulating factor-primed unmanipulated haploidentical blood and marrow transplantation. **Front. Immunol.**, v. 10, n. 2516, p. 1-14, 2019.

CHANG, R. C. *et al.* Cannabidiol promotes adipogenesis of human and mouse mesenchymal stem cells via PPAR γ by inducing lipogenesis but not lipolysis. **Biochemical Pharmacology**, v. 197, p. 1-7, 2022.

CHEN, B.; FRANGOIANNIS, N. G. Immune cells in repair of the infarcted myocardium. **Microcirculation**, v. 24, n. 1, 2017.

CHENG, H.; ZHENG, Z.; CHENG, T. New paradigms on hematopoietic stem cell differentiation. **Protein Cell**, v. 11, n. 1, p. 34-44, 2020.

CHUNG, S. S; PARK, C. Y. Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes. **Blood Advances and Hematology**, v. 1, n. 26, 2017.

COLTER, D. C. *et al.* Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 7, p. 3213-3218, 2000.

COMAZZETTO, S. *et al.* Restricted hematopoietic progenitors and erythropoiesis require SCF from leptin receptor + niche cells in the bone marrow. **Cell Stem Cell**, v. 24, n. 3, p. 477-486, 2019.

COMAZZETTO, S.; SHEN, B.; MORRISON, S. J. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. **Developmental Cell**, v. 56, n. 13, p. 1848-1860, 2021.

CRANE, G. M.; JEFFERY, E.; MORRISON, S. J. Adult haematopoietic stem cell niches. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 17, p. 573-590, 2017.

CUESTA-GOMEZ, N.; GRAHAM, G. J.; CAMPBELL, J. D. M. Chemokines and their receptors: predictors of the therapeutic potential of mesenchymal stromal cells. **J Transl Med**, v. 19, n. 156, p. 1-10, 2021.

DA SILVA, R. O. *et al.* The influence of association between aging and reduced protein intake on some immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem cells: an experimental study. **European Journal of Nutrition**, v. 61, p. 3391-3406, 2022.

DE KRUIJF, E. F. M. *et al.* Mesenchymal stromal cells induce a permissive state in the bone marrow that enhances G-CSF-induced hematopoietic stem cell mobilization in mice. **Experimental Hematology**, v. 64, p. 59-70, 2018.

DE MAEYER, R. P. H.; CHAMBERS, E. S. The impact of ageing on monocytes and macrophages. **Immunology Letters**, v. 230, p. 1-10, 2021.

DING, J.; KOPCHICK, J. J. Plasma biomarkers of mouse. **Age (Dordr)**, v. 33, n. 3, p. 291-307, 2011.

DING, L. *et al.* Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 481, n. 7382, p. 457-462, 2012.

DING, L.; MORRISON, S. J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. **Nature**, v. 495, n. 7440, p. 231-235, 2013.

DOMICINI, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position. **Cytotherapy**, v. 8, p. 315-317, 2006.

DORSHKIND, K.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; SIGNER, R. A. J. The ageing immune system: is it ever too old to become young again? **Nat Rev Immunol**, v. 9 p. 57-62, 2009.

DORSHKIND, K.; SWAIN, S. Age-associated declines in immune system development and function: causes, consequences, and reversal. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 404-407, 2009.

DRISS, V. *et al.* Sub-clonal analysis of the murine C1498 acute myeloid leukaemia reveals genomic and immunogenic diversity. **Immunology Letters**, v. 192, p. 27-34, 2017.

DU, Z. *et al.* Oct4 is expressed in human gliomas and promotes colony formation in glioma cells. **Glia**, v. 57, n. 7, p. 724-733, 2009.

EBERLE, I. *et al.* Transcriptional properties of human NANOG1 and NANOG2 in acute leukemic cells. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, p. 5384-5395, 2010.

EISENSTAEDT, R.; PENNINX, B. W.; WOODMAN, R. C. Anemia in the elderly: current understanding and emerging concepts. **Blood Rev.**, v. 20, n. 4, p. 213-226, 2006.

ELEUTERI, S.; FIERABRACCI, A. Insights into the secretome of mesenchymal stem cells and its potential applications. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 18, p. 1-22, 2019.

FARHADI, Z. Aging is associated with loss of beneficial effects of estrogen on leptin responsiveness in mice fed high fat diet: Role of estrogen receptor α and cytokines. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 186, p. 1-11, 2020.

FERRE, P. The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity. **Diabetes**, v. 53, suppl 1, p. S34-S50, 2004.

FERRUCCI, L. *et al.* Measuring biological aging in humans: A quest. **Ageing Cell**, v. 19, p. 1-21, 2020.

FORTHUN, R. B. *et al.* The Past, Present and Future Subclassification of Patients with Acute Myeloid Leukemia. **Curr Pharm Biotechnol**, v. 17, n. 1, p. 6-19, 2016.

FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, v. 69, Suppl 1, p. 4-9, 2014.

FRANZKE, A. *et al.* G-CSF as immune regulator in T cells expressing the G-CSF receptor: implications for transplantation and autoimmune diseases. **Blood**, v. 102, n. 2, p. 734-739, 2003.

FRASCA, D. *et al.* Age effects on B cells and humoral immunity in humans. **Ageing Res. Rev.**, v. 10, p. 330-335, 2011.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSJAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, v. 4, n. 5, p. 267-274, 1976.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZSKY S.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 16, n. 3, p. 381-390, 1966.

FRIEDSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of Guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Tissue Kinet**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FRODERMANN, V.; NAHRENDORF, M. Macrophages and cardiovascular health. **Physiol Rev**, v. 98, p. 2523-2569, 2018.

GAO, J.; CHEN, Y. H.; PETERSON, L. C. GATA family transcriptional factors: emerging suspects in hematologic disorders. **Exp. Hematol. Oncol.**, v. 4, n. 1, p. 1-7, 2015.

GARRIDO, S. M. *et al.* Acute myeloid leucemia cells are protected from spontaneous and drug-induced apoptosis by direct contact with a human bone marrow stromal cell line (HS-5). **Exp. Hematol.**, v. 29, p. 448-457, 2001.

GAVRIILIDIS, G. I. *et al.* Stem cell factor is implicated in the microenvironmental interactions and cellular dynamics of chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica**, v. 106, n. 3, p. 692-700, 2021.

GAZIT, R.; WEISSMAN, I. L.; ROSSI, D. J. Hematopoietic stem cells and the aging hematopoietic system. **Seminars in hematology**, v. 45, p. 218-224, 2008.

GEIGER, H.; KOEHLER, A.; GUNZER, M. Stem cells, aging, niche, adhesion and Cdc42: a model for changes in cell-cell interactions and hematopoietic stem cell aging. **Cell Cycle**, v. 6, p. 884-887, 2007.

GENIS, L. *et al.* Astrocytes require insulin-like growth factor I to protect neurons against oxidative injury. **F1000Res.**, n. 2, p. 1-23, 2014.

GINGRAS, A. C. *et al.* 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. **Genes Dev**, v. 12, p. 502-513, 1998.

GNANI, D. *et al.* An early senescence state in aged mesenchymal stromal cells contributes to hematopoietic stem and progenitor cell clonogenic impairment through the activation of a pro-inflammatory program. **Aging Cell**, v. 18, n. e12933, p. 1-21, 2019.

GOLDBERG, L. R. Extracellular vesicles and hematopoietic stem cell aging. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 41, n. 8, p. e399-e416, 2021.

GOLDIE, H. *et al.* Growth characteristics of free C1498 (granulocytic leukemia) tumor cells in the peritoneal fluid and the blood of C57 mice. **Cancer Res**, v. 13, n. 2, p. 125-129, 1953.

GOUNDER, S. S. *et al.* Effect of aging on NK cell population and their proliferation at ex vivo culture condition. **Anal Cell Pathol. (Amst.)**, v. 2018, p. 1-6, 2018.

GRAHAM, J. D.; WELCH, C. M.; PATCHEN, M. L. Studies of an implanted murine myelogenous leukemia C1498. **Ohio J. Sci.**, v. 75, n. 4, p. 202-208, 1975.

GROARKE, E. M.; YOUNG, N. S. Aging and hematopoiesis. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 35, p. 285-293, 2019.

GUO, B. *et al.* Antagonism of PPAR- γ signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis. **Nature Medicine**, v. 24, n. 3, p. 360-367, 2018.

GUO, X. *et al.* Effect of ectopic high expression of transcription factor OCT4 on the “stemness” characteristics of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Cell Research & Therapy**, v. 10, n. 160, p. 1-11, 2019.

GUSTAFSSON, K.; SCADDEN, D. T.; Growing old in the age of heterogeneity: the perils of shifting clonality. **Current Opinion in Hematology**, v. 26, n. 4, p. 222-227, 2019

HAAS, S.; TRUMPP, A.; MILSOM, M. D. Causes and consequences of hematopoietic stem cell heterogeneity. **Cell Stem Cell**, v. 22, n. 5, p. 626-638, 2018.

HAQ, K.; MCELHANEY, J. E. Ageing and respiratory infections: the airway of ageing. **Immunol Lett**, v. 162, p. 323-328, 2014.

HARMER, D.; FALANK, C.; REAGAN, M. R. Interleukin-6 interweaves the bone marrow microenvironment, bone loss, and multiple myeloma. **Front. Endocrinol.**, v. 9, n. 788, p. 1-15, 2019.

HASTREITER, A. A. *et al.* Protein malnutrition impairs bone marrow endothelial cells affecting hematopoiesis. **Clinical Nutrition**, 2020.

HASTREITER, A. *et al.* Effects of protein malnutrition on hematopoietic regulatory activity of bone marrow mesenchymal stem cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 93, p. 1-10, 2021.

HAYASHI, Y. *et al.* MDS cells impair osteolineage differentiation of MSCs via extracellular vesicles to suppress normal hematopoiesis. **Cell Reports**, v. 39, n. 110805, p. 1-29, 2022.

HE, X. *et al.* Mesenchymal stem cells inhibited the apoptosis of alveolar epithelial cells caused by ARDS through CXCL12/CXCR4 axis. **Bioengineered**, v. 13, n. 4, p. 9060-9070, 2022.

HENRY, C. J. *et al.* Declining lymphoid progenitor fitness promotes aging-associated leukemogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 107, n. 50, p. 21713-21718, 2010.

HENRY, C. J.; MARUSYK, A. DEGREGORI, J. Aging-associated changes in hematopoiesis and leukemogenesis: What's the connection?. **Aging**, v. 3, n. 6, p. 643-656, 2011

HERNANDEZ-SEGURA, A. *et al.* Unmasking transcriptional heterogeneity in senescent cells. **Curr Biol**, v. 27, p. 2652-2660, 2017.

HO, Y. *et al.* Remodeling of bone marrow hematopoietic stem cell niches promotes myeloid cell expansion during premature or physiological cell aging. **Cell Stem Cell.**, v. 25, n. 3, p. 407-418, 2019.

HO, Y.; MENDÉZ-FERRER, S. Microenvironmental contributions to hematopoietic stem cell aging. **Haematologica**, v. 105, n. 1, p. 38-46, 2020.

HOUTKOOPEL, R. H. *et al.* The metabolic footprint of aging in mice. **Sci. Rep.**, v. 1, n. 134, p. 1-10, 2011.

HSUEH, Y. *et al.* Nuclear KIT induces a NFKBIB-RELA-KIT autoregulatory loop in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors. **Oncogene**, v. 38, n. 38, p. 6550-6565, 2019.

HU, Q.; LEI, X.; ZHAO, B. Demographic changes and economic growth impact and mechanisms. **China Economic Journal**, v. 14, n. 3, p. 1-20, 2020.

HUCK, V. *et al.* The various states of von Willebrand factor and their function in physiology and pathophysiology. **Thromb. Haemost.**, v. 111, n. 04, p. 598-609, 2014.

IBGE, Censo Demográfico 2020: Características da População e dos Domicílios – Resultados do Universo. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010.
IBGE, Retratos a Revista do IBGE: 2019. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2019.

IKUTA, K.; WEISSMAN, I. L. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 89, p. 1502-1506, 1992.

JAKUBIKOVA, J. *et al.* A novel 3D mesenchymal stem cell model of the multiple myeloma bone marrow niche: biologic and clinical applications. **Oncotarget**, v. 7, p. 77326-77341, 2016.

JANG, J. Y. *et al.* The role of mitochondria in aging. **J Clin Invest**, v. 128, n. 9, p. 3662-3670.

JERABEK, S. *et al.* OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1839, p. 138-154, 2014.

JETER, C. *et al.* NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. **Oncogene**, v. 30, p. 3833-3845, 2011.

JI, W.; JIANG, Z. Effect of shRNA-mediated inhibition of Nanog gene expression on the behavior of human gastric cancer cells. **Oncol. Lett.**, v. 6, p. 367-374, 2013.

JIN, C. J. *et al.* Aging-related liver degeneration is associated with increased bacterial endotoxin and lipopolysaccharide binding protein levels. **Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.**, v. 318, n. 4, p. 1-12, 2020.

JOHNSON, A. A.; STOLZING, A. The role of lipid metabolism in aging, lifespan regulation, and age-related disease. **Aging Cell**, v. 18, n. 6, p. 1-23, 2019.

JULIAN, L. M.; MCDONALD, A. C.; STANFORD, W. L. Direct reprogramming with SOX factors: masters of cell fate. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 46, p. 24-36, 2017.

JURAN, C. M. *et al.* Cdkn1a deletion or suppression by cyclic stretch enhance the osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cell-derived cultures. **Stem Cell Research**, v. 56, n. 102513, p. 1-12, 2021.

JUSTESEN, J. *et al.* Adipocyte tissue volume in bone marrow is increased with aging and in patients with osteoporosis. **Biogerontology**, v. 2, p. 165-171, 2001.

KALE, A. *et al.* Role of immune cells in the removal of deleterious senescent cells. **Immun. Ageing.**, v. 17, p. 16, 2020.

KAMGA, P. T. *et al.* The role of notch and wnt signaling in MSC communication in normal and leukemic bone marrow niche. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 8, n. 599276, 2021.

KARIMIAN, A.; AHMADI, Y.; YOUSEFLI, B. Multiple functions of p21 in cell cycle apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair**, v. 42, 63-71, 2016.

KAUPILLA, T. E. S. *et al.* Mutations of mitochondrial DNA are not major contributor to aging of fruit flies. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 115, p. E9620-E9629, 2018.

KFOURY, Y. SCADDEN, D. T. Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. **Cell Stem Cell**, v. 16, p. 239-253, 2015.

KIEL, M. J. *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. **Cell**, v. 121, p. 1109-1121, 2005.

KIM, I. H.; KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A.; Aging and liver disease. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 31, p. 184-191, 2015.

KIM, J. B. *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. **Cell**, v. 136, p. 411-419, 2009.

KIMURA, K. *et al.* Bone marrow CD73⁺ mesenchymal stem cells display increased stemness in vitro and promote fracture healing in vivo. **Bone Reports**, v. 15, n. 101133, p. 1-11, 2021.

KIRKLAND, J. L.; TCHKONIA, T. Senolytic drugs: from discovery to translation. **J. Intern. Med.**, v. 288, p. 518-536, 2020.

KITA, K.; KAWAI, K.; HIROHATA, K. Changes in bone marrow blood flow with aging. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 5, n. 4, p. 569-575, 1987.

KLIEWER, S. A. *et al.* Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. **Nature**, v. 358, n. 6389, p. 771-774, 1992.

KLIEWER, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 94, n. 9, p. 4318-4323, 1997.

KLOTZ L. O. *et al.* Redox regulation of FoxO transcription factors. **Redox biology**, v. 6, p. 51-72, 2015.

KMA, L.; BARUAH, T. J. The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 248-264, 2021.

KOHLER, A. *et al.* Altered cellular dynamics and endosteal location of aged early hematopoietic progenitor cells revealed by time-lapse intravital imaging in long bones. **Blood**, v. 114, n. 2, p. 290-298, 2009.

KOROU, L. A. *et al.* The effect of biological age on the metabolic responsiveness of mice fed a high-fat diet. **Laboratory Animals**, v. 47, n. 4, p. 241-244, 2013.

KOVTONYUK, L. V. *et al.* Inflamm-Aging of hematopoiesis, hematopoietic stem cells, and the bone marrow microenvironment. **Front. Immunol.** v. 7, n. 502, p. 1-13, 2016.

KRABBENDAM, L. *et al.* New insights into the function, development, and plasticity of type 2 innate lymphoid cells. **Immunological Reviews**, v. 286, n. 1, p. 74-85, 2018.

KUNISAKI, Y *et al.* Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. **Nature**, v. 502, p. 637-643, 2013.

KURODA, Y. KITADA, M. WAKAO, S. DEZAWA, M. Bone marrow mesenchymal cells: How do they contribute to tissue repair and are they really stem cells? **Arch Immunol Ther Exp**, v. 59, n. 5, p. 369-378, 2011.

LABELLE, J. L.; TRUITT, R. L. Characterization of a murine NKT cell tumor previously described as an acute myelogenous leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, v. 43, n. 8, p. 1637-1644, 2002.

LEE, D.; KIM, D. W.; CHO, JE-YOEL. Role of growth factors in hematopoietic stem cell niche. **Cell Biol Toxicol**, v. 36, p. 131-144, 2020.

LENGEFELD, J. *et al.* Cell size is a determinant of stem cell potential during aging. **Sci Adv**, v. 7, p. 1-16, 2021.

LENNARTSSON, J.; RÖNNSTRAND, I. Stem cell factor receptor/c-kit: from basic science to clinical implications. **Physiol Rev.**, v. 92, n. 4, p. 1619-1649, 2012.

LEONARDI, G. C. *et al.* Ageing: from inflammation to cancer. **Immunity & ageing**, v. 15, n. 1, p. 1-7, 2018.

LI, M. *et al.* Rapamycin promotes the expansion of myeloid cells by increasing G-CSF expression in mesenchymal stem cells. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, n. 779159, p. 1-12, 2022.

LI, Q. *et al.* CD73⁺ Mesenchymal stem cells ameliorate myocardial infarction by promoting angiogenesis. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, n. 637239, p. 1-11, 2021.

LI, Y. *et al.* Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in bone marrow stromal cells induced by daunorubicin leads to DNA damage in hematopoietic cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 146, p. 211-221, 2020.

LI, Y. *et al.* PPAR- γ and Wnt regulate the differentiation of MSCs into adipocytes and osteoblasts respectively. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 13, p. 1-9, 2018.

LI, Z. *et al.* Aging and age-related diseases: from mechanisms to therapeutic strategies. **Biogerontology**, v. 22, 165-187, 2021.

LIANG, Y.; VAN ZANT, G.; SZILVASSY, S. J. Effects on aging on the homing and engraftment of murine hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood**, v. 106, n. 4, p. 1479-1487, 2005.

LICHTMAN, M. A.; ROWE, J. M. The relationship of patient age to the pathobiology of the clonal myeloid diseases. **Semin. Oncol.**, v. 31, n. 2, p. 185-197, 2006.

LIN, H. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. **Biomaterials**, v. 203, p. 96-110, 2019.

LIU, H. *et al.* Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. **EMBO J**, v. 26, n. 3, p. 891-901, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LÓPEZ-OTIN, C. *et al.* The hallmarks of aging. **Cell**, v. 153, p. 1-24, 2013

LU, L. *et al.* Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. **Cancer Lett.**, v. 340, p. 113-123, 2013.

MABUCHI, Y. *et al.* Cellular heterogeneity of mesenchymal stem/stromal cells in the bone marrow. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 9, n. 689366, p. 1-11, 2021.

MAISO, P. *et al.* Bone marrow mesenchymal stromal cells in multiple myeloma: their role as active contributors to myeloma progression. **Cancers**, v. 13, n. 11, 2021.

MAN, Y. *et al.* Hematopoietic stem cell niche during homeostasis, malignancy, and bone marrow transplantation. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 9, n. 621214, p. 1-11, 2021.

MANN, Z. *et al.* Hematopoietic stem cell factors: their functional role in self-renewal and clinical aspects. **Front. Cell Dev. Biol.**, v. 10, p. 1-22, 2022.

MARTIN, D. I. ORKIN, S. H. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/nf-E1/Eryf 1. **Genes Dev.**, v. 4, n. 11, p. 1886-1898, 1990.

MARYANOVICH, M. *et al.* Adrenergic nerve degeneration in bone marrow drives aging of the hematopoietic stem cell niche. **Nat. Med.**, v. 24, p. 782-791, 2018.

MASSARO, F. *et al.* Aging of bone marrow mesenchymal stromal cells: hematopoiesis disturbances and potential role in the development of hematologic cancers. **Cancers**, v. 13, n. 1, p. 1-22, 2021.

MATTEINI, F.; MULAW, M. A.; FLORIAN, M. C. Aging of the hematopoietic stem cell niche: new tools to answer an old question. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 1-21, 2021.

MCKENNA, R. W. *et al.* Immunophenotypic analysis of hematogones (B-lymphocyte precursors) in 662 consecutive bone marrow specimens by 4-color flow cytometry. **Blood**, v. 98, p. 2498-2507, 2001.

MENDEZ-FERRER, S. *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, v. 466, p. 829-834, 2010.

MENG, F. *et al.* CD73-derived adenosine controls inflammation and neurodegeneration by modulating dopamine signaling. **Brain**, v. 142, p. 700-718, 2019.

METCALF, D. Hematopoietic cytokines. **Blood**, v. 111, p. 485-491, 2008.

MILLER, J. P.; ALLMAN, D. Linking age-related defects in B lymphopoiesis to the aging of hematopoietic stem cells. **Semin. Immunol.**, v. 17, n. 5, p. 321-329, 2005.

MITROULIS, I. *et al.* Regulation of the bone marrow niche by inflammation. **Front. Immunol.**, v. 11, n. 1540, p. 1-8, 2020.

MOHIUDDIN, I S.; WEI, S.; KANG, M. H. Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. **Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 165432, p. 1-7, 2020.

MOPIN, A.; DRISS, V.; BRINSTER, C. A detailed protocol for characterizing the murine C1498 cell line and its associated leukemia mouse model. **Journal of Visualized Experiments**, v. 116, 2016.

MORRISON, S. J. *et al.* The aging of hematopoietic stem cells. **Nat. Med.**, v. 2, n. 9, p. 1011-1016, 1996.

MUGURUMA, Y. *et al.* Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. **Blood**, v. 107, p. 1878-1887, 2005.

MUTYABA, P. *et al.* Notch signaling in mesenchymal stem cells harvested from geriatric mice. **J. Orthop. Trauma**, v. 28, Suppl 20, 2014.

NAJAR, M. *et al.* Empowering the immune fate of bone marrow mesenchymal stromal cells: gene and protein changes. **Inflammation Research**, v. 68, p. 167-176, 2019.

NAKAMURA-ISHIZU, A.; SUDA, T. Aging of the hematopoietic stem cells niche. **International Journal of Hematology**, v. 100, p. 317-325, 2014.

NEHLIN, J. O. *et al.* Aging and lineage allocation changes of bone marrow skeletal (stromal) stem cells. **Bone**, v. 123, p. 265-273, 2019.

NICHOLS, J. *et al.* Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, p. 379-391, 1998.

NIKOLITS, I. *et al.* Towards physiologic culture approaches to improve standard cultivation of mesenchymal stem cells. **Cells**, v. 10, p.886, 2021.

OGURO, H.; DING, L.; MORRISON, S. J. SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. **Cell Stem Cell**, v. 13, p. 102-116, 2013.

OKADA, S. *et al.* In vivo and in vitro stem cell function of c-kit- and Sca-1- positive murine hematopoietic cells. **Blood**, v. 80, p. 3044-3050, 1992.

Organização Mundial de Saúde. 2015. Relatório Mundial de Envelhecimento e Saúde (2015). Disponível em <https://sbgg.org.br/wp-content/uploads/2015/10/OMS-ENVELHECIMENTO-2015-port.pdf>. Acesso em 31 de julho de 2022.

OSAWA, M. *et al.* Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. **Science**, v. 273, p. 242-245, 1996.

PALMER, D. B. The effect of age on thymic function. **Front. Immunol.**, v. 4, p. 316, 2013.

PANG, W. W.; SCHRIER, S. L.; WEISSMAN, I. L. Age-associated changes in human hematopoietic stem cells. **Semin. Hematol.**, v. 54, n. 1, p. 39-42, 2017

PAPADOLI, D. *et al.* mTOR as a central regulator of lifespan and aging. **F1000 Research**, v. 8, n. 998, p. 1-21, 2019.

PHILIPP, D. *et al.* Preconditioning of bone marrow-derived mesenchymal stem cells highly strengthens their potential to promote IL-6-dependent M2b polarization. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 9, n. 286, p. 1-17, 2018.

PIETRAS, E. M. *et al.* Functionally distinct subsets of lineage-biased multipotent progenitors control blood production in normal and regenerative conditions. **Cell Stem Cell**, v. 17, p. 35-46, 2015.

PONTIKOGLOU, C. *et al.* Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. **Stem Cell Rev.**, v. 7, p. 569-589, 2011.

POULOS, M. G. *et al.* Endothelial transplantation rejuvenates aged hematopoietic stem cell function. **J. Clin. Invest.**, v. 127, n. 11, p. 4163-4178, 2017.

PRECIADO, S. *et al.* Co-administration of human MSC overexpressing HIF-1 α increases human CD34⁺ cell engraftment in vivo. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.

PRECIADO, S. *et al.* Mesenchymal stromal cell irradiation interferes with the adipogenic/osteogenic differentiation balance and improves their hematopoietic-supporting ability. **Biol Blood Marrow Transplant.**, v. 24, n. 3, p. 443-451, 2018.

PUCHTA, A. *et al.* TNF drives monocyte dysfunction with age and results in impaired anti-pneumococcal immunity. **PLoS Pathog.**, v. 12, n. 1, p. 1-23, 2016.

PUTOCZKI T.; ERNST, M. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. **J Leukoc Biol.**, v. 88, n. 6, p. 1109-1117, 2010.

QUESENBERY, P. J. *et al.* Inhibition of normal murine hematopoiesis by leukemic cells. **The New England Journal of Medicine**, v. 299, n. 2, 1978.

RAAIJMAKERS, M. H. G. P. Aging of the hematopoietic stem cell niche: an unnerving matter. **Cell Stem Cell**, v. 25, p. 301-303, 2019.

RAMALINGAM, P. *et al.* Endothelial mTOR maintains hematopoiesis during aging. **J Exp Med**, v. 217, n. 6, p. 1-22, 2020.

ROBB, L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. **Oncogene**, v. 26, p. 6715-6723, 2003.

ROSENFELD, G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. **Mem. Inst. Butantan**. v. 20, p. 315-328, 1947

ROSSI, D. J. *et al.* Cell intrinsic alteration underlie hematopoietic stem cell aging. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, p. 9194-9199, 2005.

ROSSI, D. J. *et al.* Cell intrinsic alteration underlie hematopoietic stem cell aging. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 102, n. 26, p. 9194-9199, 2005.

RYLSKI, M. *et al.* GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. **Mol. Cell Biol**, v. 23, n. 14, p. 5031-5042, 2003.

SACMA, M. *et al.* Haematopoietic stem cells in perisinusoidal niches are protected from ageing. **Nat Cell Biol.**, v. 21, n. 11, p. 1309-1320, 2019.

SAÇMA, N. *et al.* Haematopoietic stem cells in perisinusoidal niches are protected from ageing. **Nat. Cell Biol.**, v. 21, p. 1309-1320, 2019.

SALAZAR-TERREROS, M. J.; VERNOT, J. In vitro and in vivo modeling of normal and leukemic bone marrow niches: cellular senescence contribution to leukemia induction and progression. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 23, n. 13, p. 1-24, 2022.

SANCHEZ-GUIJO, F. M. *et al.* Posttransplant hematopoiesis in patients undergoing sibling allogeneic stem cell transplantation reflects that of their respective donors although with a lower functional capability. **Exp Hematol.**, v. 33, n. 8, p. 35-43, 2005.

SARKAR, A.; HOCHEDLINGER, K. The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. **Cell Stem Cell**, v. 12, n. 1, p. 15-30, 2013.

SCADDEN, D. T. Metcalf Lecture Award: Applying niche to engineer T-cell regenerative therapy. **Experimental Hematology**, v. 80, p. 1-10, 2019.

SCHELKER, R. C. *et al.* TGF- β 1 and CXCL12 modulate proliferation and chemotherapy sensitivity of acute myeloid leukemia cells co-cultured with multipotent mesenchymal stromal cells. **Hematology**, v. 23, n. 6, p. 337-345, 2018.

SCHEPERS, G. E.; TEASDALE, R. D.; KOOPMAN, P. Twenty pairs of SOX: extent, homology, and nomenclature of the mouse and human sox transcription factor gene families. **Dev. Cell**, v. 3, n. 2, p. 167-170, 2002.

SEITA, J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 6, p. 640-653, 2010.

SGARBIERI, V. C.; PACHECO, M. T. B. Healthy human aging: intrinsic and environmental factors. **Braz. J. Food Technol.**, v. 20, p. 1-23, 2017.

SHAFAT, M. S. *et al.* Leukemic blasts program bone marrow adipocytes to generate a protumoral environment. **Blood**, v. 129, n. 10, p. 1320-1332, 2017.

SHAFAT, M. S. *et al.* The bone marrow microenvironment – Home of the leukemic blasts. **Blood Reviews**, v. 31, n. 5, p. 277-286, 2017.

SHAH, N. J. *et al.* An injectable bone marrow-like scaffold enhances T cell immunity after hematopoietic stem cell transplantation. **Nature Biotechnology**, v. 37, p. 293-302, 2019.

SHAN, J. *et al.* Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 56, p. 1004-1014, 2012.

SIEGRIST, C. A.; ASPINALL, R. B-cell responses to vaccination at the extremes of age. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 9, p. 185-194, 2009.

SLAMON, D. J. Identification and characterization of the protein encoded by the human N-myc oncogene. **Science**, v. 232, p. 768, 1986.

SONG, S. *et al.* Senescent cells: emerging targets for human aging and age-related diseases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 45, n. 7, p. 578-592, 2020.

STEINMANN, G. G. Changes in the human thymus during aging. **Curr. Top. Pathol.**, v. 75, p. 43-88, 1986.

SUGIYAMA, T. *et al.* Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. **Immunity**, v. 25, p. 977-988, 2006.

SUZUKI, M. *et al.* GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation. **Genes Cells**, v. 18, n. 11, p. 921-933, 2013

TAKAHASHI, K. *et al.* Modification of strain-specific femoral bone density by bone marrow-derived factors administered neonatally: a study on the spontaneously osteoporotic mouse, SAMP6. **Bone Miner**, v. 24, p. 245-255, 1994.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, p. 663-676, 2006.

TAN, K. *et al.* CD73 expression on mesenchymal stem cells dictates the reparative properties via its anti-inflammatory activity. **Stem Cells International**, v. 2019, p. 1-12, 2019.

TCHKONIA T.; KIRKLAND, J. L. Aging, Cell Senescence, and Chronic Disease Emerging Therapeutic Strategies. **JAMA**, v. 320, n. 13, p. 1319-1320, 2018.

THEVARANJAN, N. *et al.* Age-associated microbial dysbiosis promotes intestinal permeability, systemic inflammation, and macrophage dysfunction. **Cell Host Microbe**, v. 21, n. 4, p. 455-466, 2017.

TIWARI, W.; WILSON, D. M. DNA damage and associated DNA repair defects in disease and premature. **Aging Am J Hum Genet**, v. 105, p. 237-257, 2019.

TONTONOZ, P.; SPIEGELMN, B. M. Fat and beyond: the diverse biology of PPARgamma. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 77, p. 289-312, 2008.

TOSIC, N. *et al.* Prognostic significance of SOX2, SOX3, SOX11, SOX14 and SOX18 gene expression in adult de novo acute myeloid leukemia. **Leukemia Research**, v. 67, p. 32-38, 2018.

TRAINOR, C. D. *et al.* A palindromic regulatory site within vertebrate GATA-1 promoters requires both zinc fingers of the GATA-1 DNA-binding domain for high-affinity interaction. **Mol. Cel Biol**, v. 16, n. 5, p. 2238-2247, 1996.

TRINH, T.; BROXMEYER, H. E. Role for leptin and leptin receptors in stem cells during health and diseases. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 17, p. 511-522, 2021.

United Nations. 2017. Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2017). World Population Prospects: The 2017 Revision, Data Booklet.

VAN GASTEL, N.; SCADDEN, D. T. Young haematopoietic stem cells are picky eaters. **Cell Res**, v. 21, n. 4, p. 377-378, 2021.

VASEFIFAR, P. *et al.* Nanog, as a key cancer stem cell marker in tumor progression. **Gene**, v. 827, n. 16448, p. 1-10, 2022.

VILAS, J. M. *et al.* Adult Sox2⁺ stem cell exhaustion in mice results in cellular senescence and premature aging. **Aging Cell**, v. 17, p. 1-6, 2018.

VIVIAN, G. K. Avaliação da resposta de macrófagos peritoneais ao lipopolissacarídeo em um modelo de envelhecimento submetido à carência proteica. São Paulo. 89p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).

WANG, Q. *et al.* Fra-1 protooncogene regulates IL-6 expression in macrophages and promotes the generation of M2d macrophages. **Cell Res**, v. 20, n. 6, p. 701-712, 2010.

WANG, Y. J.; HERLYN, M. The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells. **Am. J. Phys. Cell Phys.**, v. 309, p. C709, 2015.

WARREN, L. A.; ROSSI, D. J. Stem cells and aging in the hematopoietic system. **Mech. Ageing Dev.**, v. 130, n. 1-2, p. 46-53, 2009.

WHYATT, D. *et al.* The level of the tissue-specific factor GATA-1 affects the cell-cycle machinery. **Genes Funct.**, v. 1, n. 1, p. 11-24, 1997.

WILSON, A. *et al.* Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. **Cell**, v. 135, p. 1118-1129, 2008.

World Health Organization. **Decade of Healthy Ageing Baseline Report**. Geneva: WHO, 2021.

XU, C. *et al.* Stem cell factor is selectively secreted by arterial endothelial cells in bone marrow. **Nat. Commun.**, v. 9, n. 2449, p. 1-13, 2018.

XU, D. *et al.* The IGF2/IGF1R/Nanog signaling pathway regulates the proliferation of acute myeloid leukemia stem cells. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. 687, p. 1-14, 2018.

YAN, A. *et al.* CD73 promotes glioblastoma pathogenesis and enhances its chemoresistance via A2B adenosine receptor signaling. **J. Neurosci.**, v. 39, p. 4387-4402, 2019.

YANG, D.; HAAN, GERALD DE. Inflammation and aging of hematopoietic stem cells in their niche. **Cells**, v. 10, n. 8, p. 1-13, 2021.

YANG, L. *et al.* Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. **Blood**, v. 105, p. 2717-2723, 2005.

YANG, M. *et al.* Ascorbic acid inhibits senescence in mesenchymal stem cells through ROS and AKIT/mTOR signaling. **Cytotechnology**, v. 70, p. 1301-1313, 2018.

YANG, Y. K. *et al.* Changes in phenotype and differentiation potential of human mesenchymal stem cells aging in vitro. **Stem Research & Therapy**, v. 9, n. 131, p. 1-14, 2018.

YILMAZ, O. H.; KIEL, M. J.; MORRISON, S. J. SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity. **Blood**, v. 107, n. 3, p. 924-930, 2006.

YOSHIDA, T.; GERGOPOULOS, K. GATA-3 controls self-renewal in stressed HSCs. **Nat. Immunol.**, v. 14, n. 10, p. 1032-1033, 2013.

YOUNG, J. C. *et al.* Inhibitors of histone deacetylases promote hematopoietic stem cell self-renewal. **Cytotherapy**, v. 6, p. 328-336, 2004.

YU, M. *et al.* Key signaling pathways in aging and potential interventions for healthy aging. **Cells**, v. 10, p. 1-25, 2021.

YU, X. *et al.* Effect of the in vivo application of granulocyte colony-stimulating factor on NK cells in bone marrow and peripheral blood. **J. Cell. Mol. Medi.**, v, 22, n. 6, p. 3025-3034, 2018.

ZAKI, S. S. O. *et al.* The influence of serum-supplemented culture media in a transwell migration assay. **Cell Biology International**, v, 43, n. 10, p. 1201-1204, 2019.

ZBINDEN, M. *et al.* NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. **EMBO J.**, v, 29, p. 2659-2674, 2010.

ZHANG, C. C.; LODISH, H. F. Cytokines regulating hematopoietic stem cell function. **Curr Opin Hematol**, v, 15, p. 307-311, 2008.

ZHANG, L. Acute myeloid leukemia cells educate mesenchymal stromal cells toward an adipogenic differentiation propensity with leukemia promotion capabilities. **Advanced Science**, v, 9, n. 16, p. 1-17, 2022

ZHANG, P. *et al.* Single-cell RNA sequencing to track novel perspectives in HSC heterogeneity. **Stem Cell Research & Therapy**, v, 13, n. 39, 2022.

ZHAO, M. *et al.* N-cadherin-expressing bone and marrow stromal progenitor cells maintain reserve hematopoietic stem cells. **Cell Rep.**, v, 26, n. 3, p. 652-669, 2019.

ZHONG, J. F. *et al.* Gene expression profile of murine long-term reconstituting vs. short-term reconstituting hematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v, 102, n. 7, p. 2448-2453, 2005.

ZHOU *et al.* Mesenchymal Stem Cell Senescence and Rejuvenation: Current Status and Challenges. **Front. Cell. Dev. Biol.**, v, 8, n. 364, p. 1 – 13, 2020.

ZHOU, S. *et al.* Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. **Aging Cell**, v, 3, n. 3, p. 335-343, 2008.

ZHOU, W. *et al.* Targeting CXCL12/CXCR4 axis in tumor immunotherapy. **Curr Med Chem**, v, 26, n. 17, p. 3026-3041, 2019.

ZHU, J. EMERSON, S. G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. **Oncogene**, v, 21, n. 21, p. 3295-3313, 2002.

ZHU, J.; EMERSON, S. G. Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. **Oncogene**, v, 21, p. 3295-3313, 2002.

ANEXOS

ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
 Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

Ofício CEUA/FCF 065.2018-P544

São Paulo, 04 de setembro de 2018.

Prezada Senhora,

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (CEUA/FCF/USP), em reunião realizada em 04 de setembro de 2018, aprovou as alterações propostas para o projeto de pesquisa "O Papel da Disfunção Endotelial Associada ao Envelhecimento na Hematopoiese" (Protocolo CEUA nº 544), conforme constante nos documentos apresentados:

- a. inclusão das alunas como colaboradoras, Renaira Oliveira da Silva e Gabriela Kodja Vivian.
- b. O desligamento da aluna Carolina Carvalho Dias.

Cordialmente,


Prof. Dra. Neiza Mariko Aymoto Hassimotto
 Coordenadora CEUA/FCF/USP

Ilma. Sra.
 Pesquisadora: Araceli Aparecida Hastreiter
 Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
 FBC/FCF/USP

ANEXO B

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



**Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO**

9142 - 11564212/1 - Carlos Eduardo da Silva Gonçalves

Email: carlosesg@usp.br
Data de Nascimento: 02/01/1997
Cédula de Identidade: RG - 7449809 - PA
Local de Nascimento: Estado do Pará
Nacionalidade: Brasileira
Graduação: Farmacêutico - Centro Universitário do Estado do Pará - Pará - Brasil - 2020

Curso: Mestrado
Programa: Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)
Área: Fisiopatologia
Data de Matrícula: 01/02/2021
Início da Contagem de Prazo: 01/02/2021
Data Limite para o Depósito: 01/08/2023
Orientador: Prof(a). Dr(a). Ricardo Ambrosio Fock - 01/02/2021 até o presente. Email: hemato@usp.br
Proficiência em Línguas: Inglês, 01/02/2021
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 10/02/2022
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 01/02/2021

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 7493 em vigor a partir de 29/03/2018).

Última ocorrência: Matrícula Regular em 11/07/2022

Impresso em: 17/10/2022 19:23:30

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FICHA DO ALUNO

9142 - 11564212/1 - Carlos Eduardo da Silva Gonçalves

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FMM5002-1/3	Pedagogia e Didática na Saúde (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	22/03/2021	30/05/2021	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
ESC5710-2/2	Preparação Pedagógica (Escola de Artes, Ciências e Humanidades - Universidade de São Paulo)	22/03/2021	18/06/2021	60	0	-	-	N	Matricula cancelada
5925884-3/5	Ensino Superior: Contexto, Produção de Conhecimento e Docência (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	23/03/2021	01/06/2021	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
FBC5793-14/5	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia I	23/03/2021	05/07/2021	15	1	100	A	N	Concluída
VCI5793-2/4	Lendo, Compreendendo e Discutindo Trabalhos Científicos (Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade de São Paulo)	23/03/2021	06/07/2021	45	0	-	-	N	Matricula cancelada
BMF5896-1/1	Tópicos Avançados em Biologia do Câncer e Antineoplásicos (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	25/03/2021	02/06/2021	90	6	100	A	N	Concluída
MCM5772-8/2	Temas Básicos de Imunologia (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	29/03/2021	25/04/2021	60	0	-	-	N	Matricula cancelada
6046038-3/1	Tópicos em Câncer: da Biologia à Terapia (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	29/03/2021	25/04/2021	60	0	-	-	N	Matricula cancelada
SRB5041-2/1	Fundamentos em Ensaio Celulares (Curso Interunidades: Bioengenharia - Universidade de São Paulo)	30/03/2021	12/07/2021	120	8	100	A	N	Concluída
ICB5750-3/3	Métodos Avançados em Biologia Celular (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	01/04/2021	20/05/2021	60	0	-	-	N	Matricula cancelada
BIE5755-5/3	Comunicação Oral (Instituto de Biociências - Universidade de São Paulo)	05/04/2021	18/04/2021	60	0	-	-	N	Pré-matricula indeferida
8035809-1/2	Biologia e Função das Células-Tronco em Tecidos Normais e Neoplásicos (Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	07/04/2021	19/05/2021	60	4	100	A	N	Concluída
ODO5785-5/2	Inglês para Apresentações Oraís e Escrita Acadêmica (Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo)	08/04/2021	30/06/2021	60	0	-	-	N	Matricula cancelada
FBC5755-4/1	Processos Envolvidos na Regulação da Hematopoese	14/04/2021	18/05/2021	30	0	-	-	N	Turma cancelada
5965021-3/2	Docência no Ensino Superior: Fundamentos Teórico-Metodológicos (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	14/05/2021	23/07/2021	90	6	100	A	N	Concluída
FBF5805-3/2	Delineamento de Experimentos e Ferramentas Estatísticas Aplicadas às Ciências Farmacêuticas	02/08/2021	10/10/2021	90	6	100	A	N	Concluída
FBC5757-8/7	Tópicos em Fisiopatologia e Toxicologia II	12/08/2021	24/11/2021	15	1	100	A	N	Concluída

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred. Freq.	Conc.	Exc.	Situação	
6046044-1/2	Mecanismos de Regulação da Hematopoese: Implicação na Fisiopatologia de Doenças Hematológicas (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo)	01/11/2021	28/11/2021	60	4	100	A	N	Concluída
MCM5955-2/1	Bases Moleculares da Leucemogênese (Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo)	06/04/2022	17/05/2022	120	8	100	A	N	Concluída
BMH5782-1/1	Conceitos em Estrutura e Biologia Tecidual e de Sistemas (Instituto de Ciências Biomédicas - Universidade de São Paulo)	16/08/2022	06/12/2022	90	0	-	-	N	Cursando

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	44
Estágios:			
Total:	0	25	44

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula Regular em 11/07/2022

Impresso em: 17/10/2022 19:23:30