



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer (INCA)
Coordenação de Pós-graduação Stricto sensu

Nathalia Corrêa de Almeida Oliveira

***Avaliação das alterações na sinalização das Células
Estromais Mesenquimais da Medula Óssea em
pacientes com Leucemia Mielóide Aguda***

Rio de Janeiro

2015



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer (INCA)
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

Nathalia Corrêa de Almeida Oliveira

***Avaliação das alterações na sinalização das Células Estromais
Mesenquimais da Medula Óssea em pacientes com Leucemia
Mielóide Aguda***

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto
Nacional de Câncer como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Oncologia

Orientadora: Dra. Renata Binato Gomes

Co-orientadora: Dra. Luciana Pizzatti

Rio de Janeiro

2015

ii

FICHA CATALOGRÁFICA

O48a Oliveira, Nathalia Corrêa de Almeida.

Avaliação das alterações na sinalização das Células Estromais Mesenquimais da Medula Óssea em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda. / Nathalia Corrêa de Almeida Oliveira. – Rio de Janeiro, 2015.

84 f. il.: color.

Orientador: Dr^a. Renata Binato Gomes.

Co-orientadora: Dr^a. Luciana Pizzatti.

Dissertação (Mestrado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2015.

1. Células Mesenquimais Estromais. 2. Leucemia Mielóide Aguda. 3. Microambiente Medular. 4. Expressão Gênica. I. Gomes, Renata Binato (orient.). II. Pizzatti, Luciana (co-orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

616.99419



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer (INCA)
Coordenação de Pós-graduação Stricto sensu

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

Nathalia Correa de Almeida Oliveira

***Avaliação das alterações na sinalização das Células Estromais Mesenquimais
da Medula Óssea em pacientes com Leucemia Mielóide Aguda***

Orientadora: Dra. Renata Binato Gomes

Co-orientadora: Dra. Luciana Pizzatti

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr. João Viola

Prof. Dra. Regina Goldenberg

Prof. Dra. Mariana Emerenciano

Prof. Dr. Martin Bonamino

Prof. Dra. Tatiana Simão

Rio de Janeiro

2015

Ao meu esposo

Alan Oliveira

Ao meu pais

Maria Auxiliadora e Júlio César

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Sistema Hematopoiético	1
1.2 Leucemias	2
1.3 Leucemia Mieloide Aguda	3
1.4 Classificação da Leucemia Mieloide Aguda	4
1.4.1 Classificação FAB para LMA	4
1.4.2 Classificação da Organização Mundial da Saúde para LMA	5
1.5 Características moleculares da LMA	6
1.6 Célula Tronco Leucêmica	9
1.7 Microambiente Medular	13
1.7.1 Microambiente vascular ou Nicho vascular	14
1.7.2 Microambiente osteoblástico ou Nicho endóstéo	15
1.8 Sinalização no Microambiente Hematopoiético	17
1.8.1 Via de sinalização BMP	18
1.8.2 Via de sinalização Wnt	19
1.8.3 Via de sinalização de Notch	20
1.8.4 Osteopontina	21
1.8.5 Angiopoetina	22
2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	23
3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Principal	24
3.2 Objetivos Secundários	24
4. MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1 Amostras de pacientes com LMA e de doadores saudáveis	25
4.2 Isolamento e cultivo de MSC	26
4.3 Caracterização das culturas de MSC	27
4.3.1 Análise ao Microscópio Ótico	27
4.3.2 Análise de Marcadores de Superfície	27
4.3.3 Ensaios de diferenciação <i>in vitro</i>	28

4.3.3.1 Diferenciação Osteogênica	28
4.3.3.2 Diferenciação Adipogênica	28
4.4 Ensaio de Proliferação por WST-1	29
4.5 Ensaio de Ciclo Celular por citometria de fluxo	29
4.6 Análise Molecular	30
4.6.1 Análise de Expressão Gênica Diferencial	30
4.6.1.1 Extração de mRNA total	30
4.6.1.2 Purificação do RNA total	31
4.6.1.3 Chiparray	31
4.6.2 Análise de diferença de expressão gênica por PCR em tempo real	33
4.6.2.1 Tratamento com DNase	33
4.6.2.2 Síntese de DNA complementar	33
4.6.2.3 Desenho dos Iniciadores	34
4.6.2.4 Reação de PCR em Tempo Real	34
4.7 Análise <i>in silico</i>	35
4.8 Elisa	35
4.9 Análises estatísticas	36
5.RESULTADOS	37
5.1 Caracterização das culturas de células estromais mesenquimais	37
5.1.1 Análise ao microscópio ótico das culturas de MSC de pacientes com LMA de doadores saudáveis confirma o primeiro critério mínimo estabelecido pela SITC.....	37
5.1.2 Confirmação do segundo critério mínimo através da análise do perfil imunofenotípico das MSC de pacientes com LMA e doadores saudáveis	38
5.1.3 Ensaio de diferenciação <i>in vitro</i> mostram que as MSCs em cultura obedecem ao terceiro critério mínimo da STIC	39
5.2 O perfil de proliferação celular é conservado entre as culturas de MSCs de pacientes com LMA e as de MSCs de doadores saudáveis	41
5.3 Manutenção do perfil de Ciclo Celular entre as MSCs de pacientes com LMA e doadores saudáveis	42
5.4 Análise molecular das culturas de MSCs	44
5.4.1 Análise da Expressão Gênica Diferencial sugere uma assinatura molecular característica das MSCs de LMA	44
5.4.2 Confirmação dos resultados obtidos no ChipArray	46

<i>5.4.2.1 Análise não supervisionada confirma os resultados obtidos no Chiparray....</i>	46
<i>5.4.2.2 Ensaios de RT-qPCR confirmam a assinatura molecular capaz de separar as MSCs de pacientes com LMA e doadores saudáveis</i>	47
5.5 As vias de sinalização de osteopontina e de WNT estão relacionadas com os genes diferencialmente expressos encontrados na comparação entre as MSCs de pacientes com LMA e doadores saudáveis	54
5.6 As concentrações das proteínas CCL2, BMP4 e OPN estão alteradas no plasma de pacientes com LMA	56
6. DISCUSSÃO	59
7. CONCLUSÃO	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo do Sistema Hematopoiético	2
Figura 2: Esquema ilustrativo dos Modelos de heterogeneidade tumoral	11
Figura 3: Desenho experimental que comprovou a existência da CTL	12
Figura 4: Influências no surgimento da célula tronco leucêmica	13
Figura 5: Modelo esquemático da via de sinalização de BMP.....	19
Figura 6: Modelo esquemático da via de sinalização Wnt.....	20
Figura 7: Análise ao microscópio ótico de culturas de MSC de pacientes com LMA e doadores saudáveis coradas com May-Grunwald	38
Figura 8: Perfil imunofenotípico das MSCs de pacientes com LMA	38
Figura 9: Confirmação do perfil imunofenotípico das MSCs.....	39
Figura 10: Diferenciação adipogênica das MSC de pacientes com LMA e de doadores saudáveis	40
Figura 11: Diferenciação osteogênica das MSC de pacientes com LMA e doadores saudáveis	41
Figura 12: Perfil de proliferação celular usando o ensaio de WST-1.....	42
Figura 13: Perfil do ciclo celular por citometria de fluxo	43
Figura 14: Apresentação na forma de <i>cluster</i> dos 55 genes diferencialmente expressos encontrados no ensaio de chiparray	46
Figura 15: Análise não supervisionada com os 55 genes encontrados diferencialmente expressos no ensaio de chiparray	47
Figura 16: RT-qPCR na validação do Chiparray	49
Figura 17: RT-qPCR do gene <i>Spond2</i> separado pelos subtipos de LMA	51
Figura 18: Avaliação dos níveis de mRNA de <i>Bmp4</i> por PCR em tempo real de acordo com os subtipos de LMA	52
Figura 19: Comparação dos níveis de mRNA de <i>Cldn1</i> entre as MSC de doadores saudáveis e de pacientes com LMA de acordo com cada subtipo.....	53
Figura 20: RT-qPCR do gene <i>Opn</i> separado pelos subtipos de LMA.....	54
Figura 21: Via de sinalização de Osteopontina na diferenciação de osteoclastos ...	55
Figura 22: Via de sinalização de Wnt encontrada na análise <i>in silico</i>	56

Figura 23: Ensaios de ELISA para verificar se as proteínas secretadas CCL2, BMP4 E OPN apresentam diferencialmente expressas no plasma de pacientes com LMA quando comparado com doadores saudáveis..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação FAB para Leucemia Mieloide Aguda	5
Tabela 2: Classificação da OMS para LMA	6
Tabela 3: Dados dos pacientes com LMA utilizados neste estudo	26
Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para RT-qPCR e suas respectivas TAs	35
Tabela 5: Genes diferencialmente expressos encontrados nas MSC de pacientes com LMA quando comparados com doadores saudáveis.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

LPA – Leucemia Promielocítica Aguda

AML – do inglês *acute myeloid leukemia*

ATRA – Ácido trans-retinoico

B2M – β-2 Microglobulina

BMP – do inglês *bone morphogenetic protein*

BMP4 – do inglês *bone morphogenetic protein 4*

BMPR1A – do inglês *bone morphogenetic protein receptor, type IA*

BLAST – do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – Albumina do Soro Bovino

cDNA – DNA complementar

c-Kit – do inglês *v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*

cRNA – RNA complementar

CBF – do inglês *Core Binding Factor*

CBFα – do inglês *Core Binding Factor subunit alpha -1*

CBFβ – do inglês *Core Binding Fator subunit beta*

CEMO – Centro de Transplante de medula óssea

CEP – Comitê de Ética e Pesquisa

CLPs – do inglês *comum lymphoid progenitors*

CMPs – do inglês *comum myeloid progenitors*

CO₂ – Dióxido de carbono

CTH – Célula tronco hematopoiética

CTH-LT – Célula tronco hematopoiética de longo termo

CTH-CT – Célula tronco hematopoiética de curto termo

CTL – Célula tronco leucêmica

CTM – Célula tronco mesenquimal

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DNase – do inglês *Deoxyribonuclease* - deoxirribonuclease

dNTP – do inglês *Deoxynucleotide triphosphates*

DP – Desvio padrão

DS – Doadores saudáveis

DTT – Dithiothreitol

EDTA – Ácido Etileno Diamino Tetracético

EUA – Estados Unidos da America

FAB – Franco-Americano-Britânico

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

FLT-3 – do inglês *fms-related tyrosine kinase 3*

FLT-3-ITD – do inglês *Internal tandem duplications of Flt3*

FLT-3-TKD – do inglês *mutation on second tyrosine kinase domain of Flt3*

g - grama

GMPs – do inglês *granulocyte/macrophage progenitors*

HCl – Ácido clorídrico

HD – do ingles *healthy donors*

HPT – Hormônio para-tireodiano

IDT – do inglês *Integrated DNA Technologies*

INCA – Instituto Nacional de Câncer

IP – Iodeto de propídeo

LLA – Leucemia Linfoide Aguda

LLC – Leucemia Linfoide Crônica

LMA – Leucemia Mieloide Aguda

LMC – Leucemia Mieloide Crônica

ml – Mililitro

mM – Milimolar

mg – Miligrama

MEPs – do inglês *megakaryocytic/erythrocyte progenitors*

MO – Medula óssea

MPP – Células progenitoras multipotentes

MSC – do inglês *mesenchymal stromal cell*

ng – nanograma

nM – nanomolar

NOD/SCID – do inglês *Non-bese Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency*

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Solução Salina Tamponada com Fosfato

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction* – reação em cadeia da polimerase

PE – Ficoeritrina

PFA – Paraformaldeído

pH – Potencial hidrogeniônico

PM – Peso Molecular

PSA – Antígeno prostático específico

RNA – Ácido Ribonucléico

RNAm – Ácido Ribonucléico mensageiro

RNase – Ribonuclease

RPM – rotações por minuto

RT-q CR – do inglês *Reverse Transcription – quantitative real-time Polymerase Chain Reaction* ou Transcrição Reversa- Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa

SBF – Soro Bovino Fetal

SCF – do inglês *Stem Cell Fator*

SDS – Dodecil Sulfato de Sódio

SDS - PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

SMD – Síndrome Mielodisplásica

SITC – Sociedade Internacional de Terapia Celular

TA – Temperatura de anelamento

TBE – Tampão Tris/Borato/EDTA

TFA – Ácido Trifluoracético

TGF β – do inglês *Transforming growth factor β*

TMB – Tetra-metil-benzeno

TRIS – Tris-hidroxi-metil-aminometano

U - unidade

V – Volt

°C – graus celsius

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação das alterações na sinalização das células tronco estromais mesenquimais da medula óssea em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica heterogênea caracterizada pela proliferação e acúmulo dos precursores mielóides na medula óssea (MO), podendo ser classificada em 8 subtipos a partir das características de leucócitos e da fase interrompida na diferenciação celular. Apesar dos diversos estudos na área, os eventos relacionados com o início da doença assim como sua progressão ainda não foram elucidados. O nicho hematopoético apresenta um papel importante na manutenção e diferenciação das Células Tronco Hematopoéticas normais (CTH) e acredita-se que alterações nesse meio podem estar influenciando no surgimento da uma Célula Tronco Leucêmica (CTL). O microambiente medular é formado por um grupo heterogêneo de células não hematopoéticas, dentre elas as células estromais da medula (MSC). Por isso, o objetivo deste trabalho é avaliar se o processo de transformação leucêmica da CTH pode ser influenciado pela sinalização realizada pela MSC em pacientes com LMA. Para isso, amostras de MO de pacientes com LMA ao diagnóstico e de doadores saudáveis (DS) foram colocadas em cultura para isolamento e cultivo das MSC. Realizamos uma caracterização das culturas de acordo com a SITC e todas apresentaram características de MSC tanto na morfologia como na expressão de marcadores de superfície celular. Nos ensaios de diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro* todas as MSCs apresentavam capacidade de se diferenciar, entretanto, o potencial de diferenciação osteogênica foi menor em pacientes com LMA. Comparamos também o perfil de proliferação e ciclo celular e não foi observada diferenças estatísticas entre as culturas de MSCs. Para verificarmos então se havia diferença de expressão gênica entre as culturas, realizamos ensaios de Chiparray. Para a realização desse ensaio foram utilizadas 7 amostras de pacientes e comparadas com dois pools de DS. Cinquenta e cinco genes foram encontrados diferencialmente expressos e escolhemos 6 genes para serem confirmados por RT-qPCR em 19 amostras de pacientes e 13 amostras de doadores (*Ccl2* e *Spond2* aumentados e *Mmp16*, *Bmp4*, *Cldn1* e *Opn* diminuídos em MSCs de pacientes com LMA). Com esses resultados podemos sugerir que existe uma assinatura molecular comum a todas as MSCs de LMA independente do subtipo quando comparado com DS. Realizamos também análises *in silico* para avaliar as vias de sinalização e as interações que os genes diferencialmente expressos encontrados apresentavam. Nessas análises os genes encontrados estão envolvidos principalmente com as vias de diferenciação de osteoclastos e sinalização de Wnt. Também avaliamos os níveis das proteínas CCL2, BMP4 e OPN no plasma de pacientes com LMA e DS. Nossos resultados confirmam o aumento de CCL2 no plasma de pacientes com LMA assim como a redução de BMP4. No entanto, os níveis de OPN não foram alterados. Esses genes têm sido descritos como importantes componentes produzidos pelo microambiente medular

queregulam tanto o número de CTH quanto a função. Com esses resultados, podemos sugerir que a MSC de pacientes com LMA apresentam alterações na sinalização no contexto da doença, e alterações na expressão dos genes *Ccl2* e *Bmp4* podem estar relacionados com o processo de transformação leucêmica.

Abstract
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous hematological disease characterized by proliferation and accumulation of myeloid precursors in the bone marrow, and can be classified into eight subtypes based on characteristics and behavior of leukocytes and cell differentiation blockage. Although several studies in the area, the events related to the beginning of disease as well as its progression is still unknown. The microenvironment have an important role in maintenance and differentiation of normal Hematopoietic Stem Cells (HSC) and is believed that changes in this niche could give rise to Leukemic Stem Cell (LSC). The bone marrow microenvironment is formed of a heterogeneous group of non-hematopoietic cells, among them, the multipotent mesenchymal stromal cell (MSC). In this context, the aim of this work is to analyze if the leukemia transformation of the HSC could be influenced by changes in MSC signaling of AML patients. For this purpose, bone marrow samples from patients diagnosed with AML previously and healthy donors (HD) were place in culture for isolation and cultivation of MSC. The characterization of the cultures was performed according to International Society of Cellular Therapy (SITC) and we verified that all cultures presented MSC morphology and expressed all cell surface markers. The MSCs cultures were tested for differentiation *in vitro* into adipogenic and osteogenic cells and the results showed that all cultures presented differentiation ability. However, the osteogenic differentiation potential of MSCs from LMA patients was decreased. We also compared proliferation and cell cycle profiles and we did not observe statistical differences between all MSCs. To verify if the MSCs cultures presented changes in gene expression profile we performed Chiparray assay. For this, we used seven AML patients' samples and compared with two pools of HD. Fifty-five genes differentially expressed were found and some of these genes were confirmed by real-time PCR with a larger number of patients' and donors samples (*Ccl2* and *Spond2* overexpressed, and *Mmp16*, *Bmp4*, *Cldn1* and *Opn* downregulate in AML patients). With these results, we can suggest that there is a common molecular signature to all MSCs AML patients, regardless of subtypes, when compared to donors. We also performed *in silico* analyzes to evaluate the signaling pathways and interactions that the differential genes found presented. In this analysis, the genes are mainly involved in processes of differentiation of osteoclast and *Wnt* pathway. We also evaluate the levels of the secreted proteins CCL2, BMP4 and OPN in plasma of patients with AML and HD. Our results confirmed the increase of CCL2 protein and the decrease of BMP4 in the plasma of AML patients. Nevertheless, OPN levels were not changed. These genes have been described as important components produced by the hematopoietic microenvironment that regulates both number and function of HSC. With these results, we could suggest that the MSCs from AML patients presented signaling alterations in the context of the

disease and changes in CCL2 and BMP4 expression could be related to the leukemogenic transformation process.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sistema Hematopoiético

A hematopoiese é o processo de formação, desenvolvimento e maturação de todas as células sanguíneas (Nemeth *et al.*, 2009). É organizada de maneira hierárquica, sendo sustentado por uma pequena população de células residentes na medula óssea (MO), capazes de se auto renovar e se diferenciar em todas as células do sistema hematopoiético – as Células Tronco Hematopoiéticas (CTH) (Wang & Dick, 2005). A hematopoiese ocorre de maneira altamente regulada e para garantir níveis adequados de células maduras no sangue, é necessário que exista um equilíbrio entre a diferenciação celular e a auto renovação das CTHs.

A hematopoiese ocorre de forma gradual a partir das CTHs denominada CTH a longo-termo (CTH-LT). Essas células são capazes de se auto renovar durante toda a vida do indivíduo e produzir todas as linhagens hematopoiéticas. O primeiro passo de diferenciação das CTH-LT dará origem as CTHs de curto-termo (CTH-CT). Essas CTH-CT tem capacidade limitada de auto renovação, mas mantém as características multipotentes, sendo capazes de diferenciar em células progenitoras multipotentes (MPPs). As MPPs são capazes de originar os demais progenitores mas não mais apresentam a capacidade de auto renovação. A partir desses progenitores multipotentes surgem os progenitores intermediários, que darão origem as linhagens linfoide e mieloide do sistema hematopoiético. O progenitor intermediário linfoide (CLPs do inglês *common lymphoid progenitors*) dará origem aos linfócitos T e B e as células natural killer, e o progenitor intermediário comum dos mieloeritroides (CMPs do inglês – *common myeloid progenitors*) dará origem a outros dois progenitores. Os CMPs irão se diferenciar nos progenitores mielocíticos (GMPs do inglês *granulocyte/macrophage progenitors*), que posteriormente darão origem aos granulócitos e monócitos, e nos progenitores megacariocíticos/eritrocíticos (MEPs do inglês *megakaryocytic/erythrocyte progenitors*), que irão produzir as plaquetas e os glóbulos vermelhos (Weissman, 2000) (figura 1).

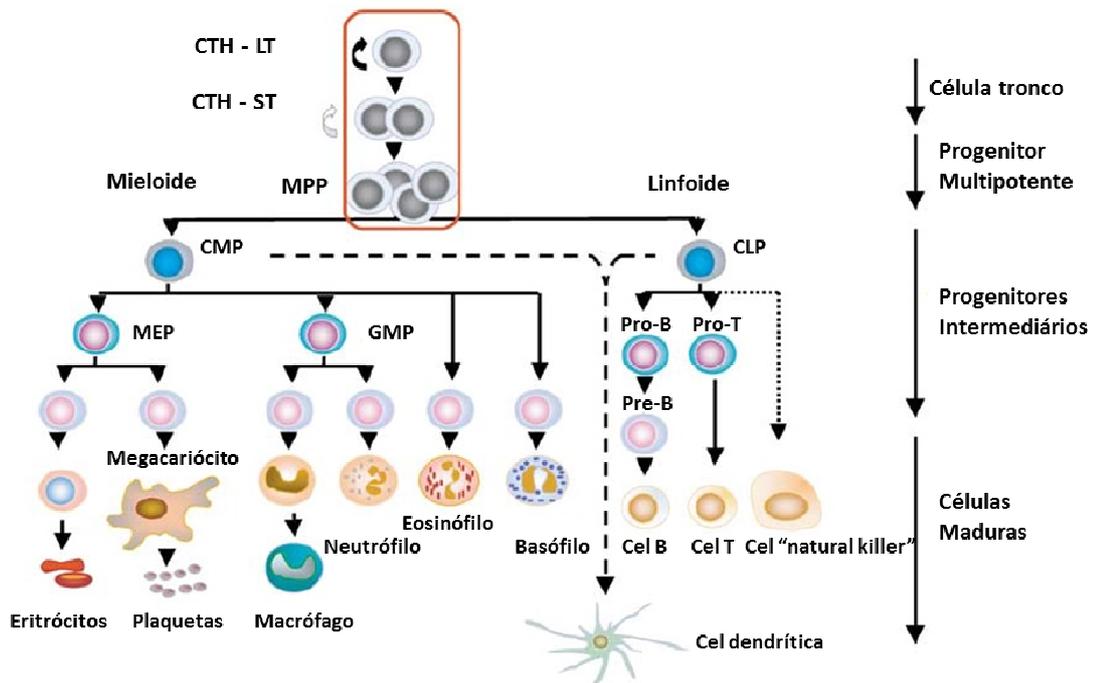


Figura 1: Esquema ilustrativo do Sistema Hematopoiético. Desenvolvimento de todas as linhagens hematopoiéticas, a partir de um precursor comum, que é capaz de se auto renovar e se diferenciar em todas as células sanguíneas. CTH-LT (célula tronco hematopoiética de longo-termo); CTH-CT (célula tronco hematopoiética de curto-termo); MPP (progenitor multipotente); CMP (progenitor comum mioeleroitroide); CLP (progenitor comum linfoide); MEP (progenitor megacariocítico/eritrocítico); GMP (progenitor mielomonocítico). Adaptado de J.Larsson e S. Karksson (Larsson & Karlsson, 2005).

1.2 Leucemias

Como mencionado, para o processo normal da hematopoiese é preciso ocorrer um fino balanço entre a auto renovação e a diferenciação das CTHs. Uma desregulação ou um não funcionamento de algum desses processos pode levar a um crescimento descontrolado e uma parada na diferenciação das CTHs, e por consequência, o aparecimento das neoplasias hematológicas (Zhang & Li, 2005).

As leucemias são neoplasias clonais do sistema hematopoiético, que se caracterizam pelo acúmulo de células imaturas (blastos) na MO que tiveram uma parada na diferenciação e assim perderam sua função normal. Elas podem ser classificadas em mieloides ou linfoides de acordo com a linhagem celular

acometida, e em agudas ou crônicas com base na rapidez que a doença evolui e torna-se grave, sendo aguda quando a progressão é rápida e crônica quando se agrava lentamente. Portanto, as leucemias podem ser classificadas em leucemia linfóide aguda (LLA), leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia linfóide crônica (LLC) e leucemia mieloide crônica (LMC).

1.3 Leucemia Mieloide Aguda

A Leucemia Mieloide Aguda (LMA) é uma neoplasia hematológica clonal, caracterizada pela perda da habilidade de diferenciação dos precursores mielóides, por uma diminuição no nível de apoptose, assim como uma não resposta aos estímulos regulatórios da proliferação (Estey & Dohner, 2006). Com isso, ocorre um acúmulo dos mieloblastos na medula óssea (MO) e conseqüentemente alterações no seu funcionamento normal. As células alteradas possuem uma vantagem de sobrevivência fazendo com que a medula óssea e o sangue periférico sejam caracterizados por leucocitose com predominância de células imaturas. A produção insuficiente dos precursores hematopoiéticos normais na medula óssea devido ao acúmulo dos mieloblastos, leva a perda da função da mesma e, como consequência, os pacientes apresentam sintomas de anemia, leucopenia ou disfunção leucocitária e trombocitopenia (Rulina *et al.*, 2010). O diagnóstico da LMA pode ser estabelecido baseado na presença de 20% ou mais de mieloblastos na MO (Vardiman *et al.*, 2009).

As leucemias constituem aproximadamente 2,8 a 3 % de todos os diagnósticos de câncer no mundo. No Brasil, as taxas de incidência estimadas das leucemias para 2014 foram de 5,2 casos para cada 100.000 homens e 4,3 casos para cada 100.000 mulheres (INCA 2015). Nos EUA e Europa, a LMA apresenta uma incidência anual de 3,8 casos por 100.00 habitantes (Showel & Levis, 2014) e segundo dados do *National Cancer Institute*, para 2014, foram projetados 18.860 novos casos de LMA e 10.460 mortes nos EUA (American Cancer Society, 2014).

A LMA é a leucemia aguda mais comum no adulto, representando cerca de 80% dos diagnósticos de leucemias agudas, e está altamente relacionada com a idade. Sua incidência após os 65 anos é de 15 casos por 100.000 habitantes e apresenta uma idade média ao diagnóstico de 68 anos, sendo muitas vezes conhecida como uma doença do idoso. Entretanto, a LMA também pode acometer

crianças, representando cerca de 15-20% das leucemias agudas na infância. Porém, apresenta uma biologia bastante diferente da apresentada pelos adultos (Showel & Levis, 2014).

1.4 Classificação da Leucemia Mieloide Aguda

Por ser uma doença heterogênea, o grupo Franco-Americano- Britânico (FAB) propôs uma classificação para a LMA, que a subdividiu em subtipos e, recentemente, a Organização Mundial da Saúde aprimorou essa classificação.

1.4.1 Classificação FAB para LMA

Em 1976, o grupo Franco-Americano-Britânico propôs uma classificação para as leucemias agudas baseado nas características morfológicas e citoquímicas das células blásticas. A classificação FAB estabeleceu que a presença de mais 30% de células blásticas na medula é uma característica de LMA, e que essa poderia ser subdividida em oito subtipos, de M0 a M7, de acordo com o grau de diferenciação dos progenitores mieloides (Tabela 1) (Bennett *et al.*, 1976; Rulina *et al.*, 2010). Assim, a classificação FAB leva em consideração a fase interrompida da diferenciação celular e passa ter importância na clínica, pois apresenta valor prognóstico e de escolha de tratamento. Embora exista uma classificação mais recente designada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), este sistema ainda é largamente utilizado.

Tabela 1: Classificação FAB para Leucemia Mieloide Aguda

Subtipo	Nome
M0	Leucemia mieloblástica aguda indiferenciada
M1	Leucemia mieloblástica aguda sem maturação
M2	Leucemia mieloblástica aguda com maturação
M3	Leucemia promielocítica aguda ou promielocítica
M4	Leucemia mielomonocítica aguda
M5	Leucemia monoblástica aguda (5a) ou Leucemia monocítica aguda (5b)
M6	Leucemia eritróide aguda ou Eritroleucemia
M7	Leucemia megacarioblástica aguda

1.4.2 Classificação da Organização Mundial da Saúde para LMA

A Organização mundial da Saúde (OMS), em 2001, publicou a Classificação dos Tumores Hematopoiéticos e Linfáticos. Pela primeira vez foi levado em consideração para o algoritmo de classificação das neoplasias mieloides a informação genética além da morfologia, imonofenotipagem, informações clínicas e citoquímicas. Além dessas diferenças em relação à classificação FAB, a classificação da OMS passa a considerar uma presença de 20% ou mais de células blásticas na medula ou sangue periférico suficiente para caracterizar um quadro de LMA. (Vardiman *et al.*, 2009) (tabela 2).

Tabela 2: Classificação da OMS para LMA.

Grupo	
LMA com anormalidades genéticas recorrentes	LMA com t(8;21)(q22;q22)/ AML1-ETO LMA com inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22)/ CBFβ/MYH11 LMA com t(15;17)(q22;q12)/ PML-RARα LMA com anormalidades de 11q23 / MLL
LMA com displasia de múltiplas linhagens	Pós-SMD ou doença mieloproliferativa Sem antecentes
LMA/SMD associada a tratamento	LMA/SMD associada com agentes alquilantes LMA/SMD associada com inibidores da topoisomerase II
LMA não categorizada nos itens anteriores	LMA com mínima diferenciação LMA sem maturação LMA com maturação Leucemia mielomonocitária aguda Leucemia monoblástica e monocitária aguda Leucemia eritróide aguda Leucemia megacariocitária aguda Leucemia basofílica aguda Pan-mielose com mielofibrose aguda Sarcoma mieloide
Leucemias agudas de origem ambígua	

1.5 Características moleculares da LMA

Estudos mostram que a LMA é uma neoplasia clonal que se origina a partir de uma única célula mutante hematopoiética, podendo ser o resultado da mutação cooperativa de diferentes genes. Em 2002, Kelly e Gilliland propuseram um modelo para explicar a patogênese da LMA, que consistia na necessidade de ocorrer no

mínimo dois eventos diferentes na célula para que essa apresentasse características leucêmicas. O modelo consiste no que foi observado na maioria das leucemias agudas, onde, uma classe de mutações ou genes rearranjados que impedem a diferenciação hematopoiética e subsequente apoptose dessas células seriam o primeiro evento. Posteriormente, uma segunda classe de mutações conferem uma vantagem proliferativa e/ ou sobrevida contribuindo assim para a leucemogênese (segundo evento). (Kelly & Gilliland, 2002).

O primeiro evento refere-se à parada da diferenciação, que é uma característica comum a todas LMAs, levando a um acúmulo de mais de 20% de células blásticas na MO. A não diferenciação dos precursores hematopoiéticos está frequentemente relacionada com translocações em genes que codificam fatores de transcrição, que são importantes para o desenvolvimento do sistema hematopoiético normal. Como consequência, a translocação cromossômica leva a uma perda de função gênica impedindo a maturação hematopoiética (Warner *et al.*, 2004).

Um exemplo de alteração relacionada com a parada da diferenciação é a alteração no gene *Cbf* (do inglês *core binding factor*), que está frequentemente alterado na LMA, ocorrendo em cerca de 15 a 20% das LMAs primárias do adulto. CBF é um fator de transcrição heterodimérico que codifica as subunidades α e β . Sabe-se que CBF está envolvido na regulação de diversos genes que participam do processo de desenvolvimento hematopoiético, logo, é provável que uma alteração funcional em *Cbf* devido a uma translocação cromossômica possa levar a um bloqueio da diferenciação hematopoiética (Dash & Gilliland, 2001). Duas translocações muito comuns envolvendo *Cbf* são t(8;21)(q22; q22) e a inv(16) (p13; q22).

A translocação cromossômica t(8;21)(q22; q22) está presente entre 12-15% dos casos de LMA e é associada ao subtipo FAB M2. *Cbfx2*, também denominado *Aml1*, localizado na região 21q22, sofre rearranjo com o gene *Eto*, localizado no cromossomo 8q22. O resultado desta translocação é a proteína quimérica AML1-ETO, um inibidor do fator transcricional CBF, que resulta na repressão de todos os genes alvos de AML1 (Dash & Gilliland, 2001; Warner *et al.*, 2004).

O rearranjo cromossômico inv(16)(p13; q22) está relacionado com a subunidade CBF β , que representa 8-10% dos casos de LMA e está associado com a classificação FAB M4. Neste contexto, foi identificada a proteína quimérica

CBF β -MYH11, que, assim como a proteína quimérica AML1-ETO, atua como inibidor transcricional. O interessante é observar que a perda de função de CBF pode resultar em diferentes subtipos de LMA. Isso pode ser explicado talvez pela maneira como o complexo é inibido. No caso do AML1-ETO, a porção ETO recruta um complexo co-repressor para os promotores dos genes alvos de *Aml-1*. Já com CBF β -MYH11, a proteína AML-1 é sequestrada por filamentos de actina do citoesqueleto. Essa diferença na localização pode afetar a habilidade de outros fatores de transcrição de compensar parcialmente a perda da transcrição ativa de AML-1, o que levaria ao bloqueio da diferenciação em diferentes estágios (Warner *et al.*, 2004).

Um outro exemplo de alteração relacionada com a parada na diferenciação na LMA são as translocações envolvendo o receptor do ácido retinóico no cromossomo 17 e que está associado clinicamente a Leucemia Promielocítica Aguda (LPA), subtipo FAB M3. A translocação cromossômica mais comum nesse caso é a t(15;17)(q22;q12), que dá origem a proteína quimérica PML/RAR α . A expressão dessa proteína resulta em um bloqueio da diferenciação no estágio de promielocítico que, nesse caso, pode ser revertido com a administração do ácido trans-retinoico (ATRA)(Kelly & Gilliland, 2002).

Conforme proposto por Kelly e Gilliland é necessário um segundo evento para que o processo leucemogênico aconteça. Nesse contexto, as mutações gênicas geralmente levam a uma vantagem no aumento da proliferação. Estas, por sua vez, estão geralmente associadas à ativação de receptores tirosino quinase. Essa teoria tem suporte, uma vez que os dois grandes fatores mitogênicos receptores tirosino quinase, FLT-3 e c-kit, estão frequentemente mutados na LMA.

O gene *Flt-3* (do inglês *Fms-like tyrosine kinase 3*) é um receptor tirosino quinase expresso principalmente nos progenitores hematopoiéticos e atua na proliferação e diferenciação dessas células (Gregory *et al.*, 2009). Esse gene é um dos mais comumente alterados na LMA e dois tipos de alterações podem ocorrer em *Flt-3*. A primeira é a duplicação interna em tandem (FLT-3-ITD) no domínio de justamembrana do gene, e, a segunda, é uma mutação pontual no domínio do receptor tirosino quinase (FLT-3-TKD). Ambas as alterações resultam numa ativação tirosino quinase constitutiva do *Flt-3*, que resulta na ativação de vias de sinalização e finalmente em uma ativação incontrolada da proliferação celular. Como os mecanismos de ativação do receptor são diferentes, isso poderia explicar

as diferenças biológicas encontradas nas duas classes (Levis, 2013). FLT3-ITD apresenta um importante valor prognóstico nos pacientes com LMA que apresentam cariótipo normal, pois, está correlacionado a um pior valor prognóstico. Já as mutações em FLT-3-TKD são menos comuns e não apresentam uma importância clínica como FLT3-ITD (Gregory *et al.*, 2009;Levis, 2013). Contudo, alterações apenas em *Flt-3* não são suficientes para levar ao desenvolvimento da LMA.

O receptor tirosino quinase *c-kit* e seu ligante *Scf* (do inglês *stem cell factor*) apresentam um importante papel na hematopoiese. O receptor *c-kit* é um membro tipo III da subfamília dos receptores tirosino quinase e está expresso nas CTHs, regulando a proliferação dessas células. A ligação do SCF ao *c-kit* promove a dimerização e ativação da proteína tirosino quinase que auto-fosforila o receptor. Mutações e superexpressão de *c-kit* conseguem ativar o receptor constitutivamente o que leva a um aumento da proliferação das células progenitoras. Na LMA as alterações em *c-kit* geralmente estão associadas com a presença de alterações cromossômicas como a translocação t(8,21) e inv(16) (Rulina *et al.*, 2010).

1.6 Célula Tronco Leucêmica

Por muito tempo o câncer foi tratado como uma entidade anormal homogênea. Acreditava-se que todas as células apresentavam as mesmas funções biológicas descontroladas. Como o passar dos anos e a melhora na especificidade do tratamento, foi possível o desenvolvimento de drogas alvo específicas, que poderiam agir de maneira igual em todo o tumor, esperando-se então a eliminação do mesmo. Entretanto, o que foi observado foi o surgimento de subclones resistentes a essas drogas (Dick, 2008). Além disso, experimentos usando tecidos tumorais demonstraram que apenas um pequeno grupo de células dentro do tumor apresentava uma extensa proliferação *in vivo* e *in vitro*, sugerindo a existência de uma heterogeneidade dentro dos tumores e a introdução do conceito de célula tronco tumoral. Nesse sentido, a LMA foi de grande importância para o entendimento da heterogeneidade tumoral, pois foi através do seu estudo que conseguiram demonstrar a existência da célula tronco tumoral (Wang & Dick, 2005).

Essa heterogeneidade não só funcional como morfológica das células tumorais, observada na LMA, pode ser explicada por dois modelos distintos: o

modelo da probabilidade ou estocástico e o modelo da hierarquia ou da célula tronco.

O primeiro modelo conhecido como modelo da probabilidade (modelo estocástico) postula que o tumor é biologicamente homogêneo e que as células são influenciadas por fatores intrínsecos e/ou extrínsecos que irão conferir a heterogeneidade ao tumor. Essas influências são imprevisíveis, ocorrem de forma randômica e são governadas pela probabilidade. Portanto, qualquer célula do tumor terá pouca porém igual probabilidade de se tornar uma célula capaz de dar início ao tumor, ou seja, uma célula tronco tumoral (Dick, 2008; Wang & Dick, 2005). Assim, na hierarquia da hematopoiese, qualquer célula, incluindo os progenitores comuns, seriam susceptíveis a transformação. Ao adquirir mutações leucemogênicas ocorreria uma alteração no programa de desenvolvimento normal, resultando de expansão anormal das células e bloqueio em estágios particulares da diferenciação (Warner *et al.*, 2004).

O segundo modelo, conhecido como modelo da hierarquia ou modelo da célula tronco, propõe que a transformação maligna ocorra apenas nas células primitivas. Assim como ocorre no tecido normal em desenvolvimento que é sustentado hierarquicamente por um grupo de células tronco, o mesmo ocorreria no tumor, sendo sustentado por um grupo de células tronco tumorais. Com isso, no modelo hierárquico, dentro do tumor existem diversas classes de células com capacidades diferentes de auto renovação e proliferação. Todavia, somente as células tronco leucêmicas teriam a capacidade de iniciar o crescimento tumoral e reproduzir a hierarquia celular da leucemia (Dick, 2008; Wang & Dick, 2005) (figura2).

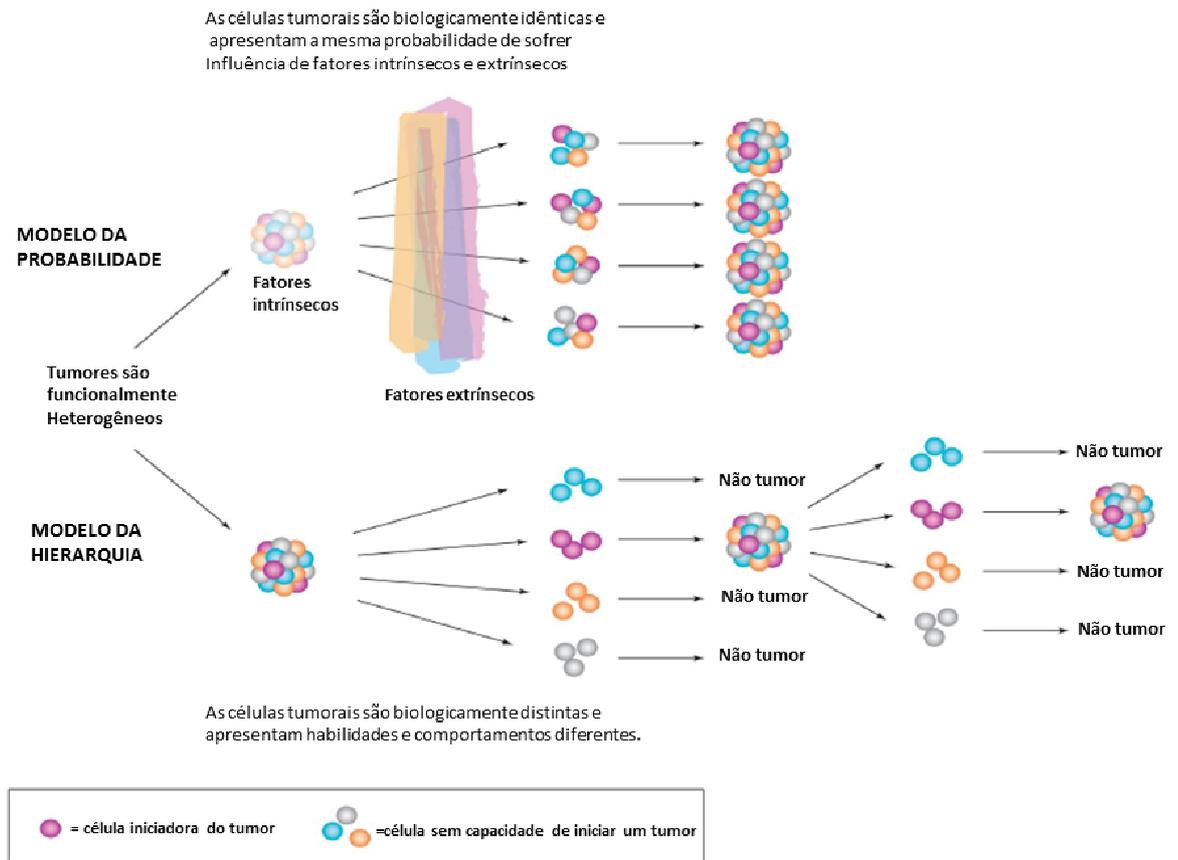


Figura 2: Esquema ilustrativo dos Modelos de heterogeneidade tumoral. Existem duas teorias que tentam explicar a heterogeneidade encontrada nas células de pacientes com LMA. De acordo com o modelo da probabilidade as células tumorais são biologicamente equivalentes e todas podem ser influenciadas por fatores intrínsecos e extrínsecos de maneira imprevisível. Em contraste, o modelo da hierarquia postula que existem diferentes classes de células com habilidades funcionais diferentes, e, portanto somente um pequeno grupo de células seria capaz de dar início ao crescimento tumoral. Adaptado de E. J. Dick.

Com os avanços no conhecimento no campo da hematopoiese, das tecnologias como a citometria de fluxo e do desenvolvimento de animais imunocomprometidos, em 1997, Bonnet e Dick tentaram demonstrar na LMA a existência de um tipo celular capaz de se auto renovar e sustentar o crescimento neoplásico *in vivo* (Bonnet & Dick, 1997). Para isso acontecer, uma célula leucêmica teria que ser capaz de reconstituir o fenótipo da leucemia. Entretanto, essa capacidade de auto renovação só poderia ser mensurada *in vivo*. Desta forma, foram separadas células CD34+ CD38+ e CD34+ CD38-, derivadas de sete

pacientes com LMA representando cada subtipo FAB e injetadas em camundongos imunossuprimidos (NOD/SCID). Da mesma forma, CTHs de doadores saudáveis também foram injetadas em camundongos imunossuprimidos (NOD/SCID). Ambas as células foram capazes de enxertar e proliferar no camundongo. Entretanto, as células CTHs enxertadas eram capazes de gerar todas as células do sistema hematopoiético, diferente das células enxertadas de LMA, que eram capazes de induzir todos os tipos de LMA (Huntly & Gilliland, 2005) (figura 3). Baseado nisto, os autores comprovaram pela primeira vez o que eles chamaram de células tronco leucêmicas (CTL) e, propuseram a mesma organização hierárquica do sistema hematopoiético normal para a LMA, ou seja, a LMA seria sustentada por um pequeno número de células: as células tronco leucêmicas (Wang & Dick, 2005).

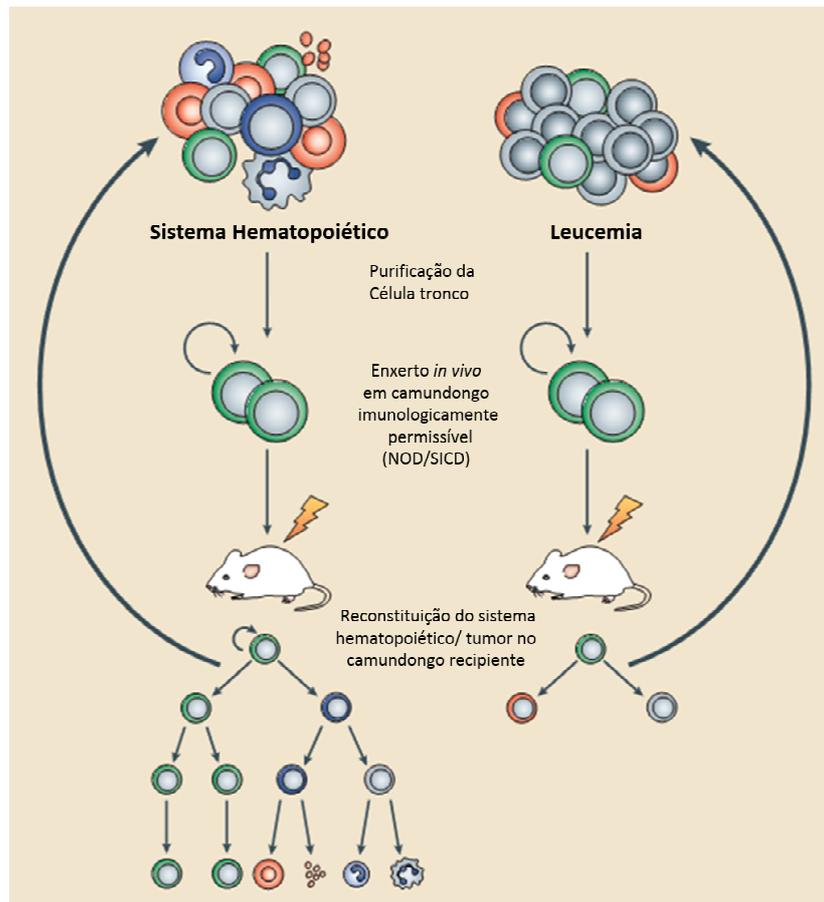


Figura 3: Desenho experimental que comprovou a existência da célula tronco leucêmica.
Adaptado de B.J Huntly e G.D Gilliland.

Além desse experimento realizado por Bonnet e Dick, o fenótipo da LMA e as similaridades funcionais entre a CTH e CTL sugerem que os eventos iniciais que

levaram a transformação leucêmica ocorrerem na célula tronco e não em células progenitoras intermediárias. Com isso, esses estudos contribuem com evidências para o modelo de hierarquia (Dick, 2008), e foram de extrema importância para o melhor entendimento da heterogeneidade da LMA.

Para o surgimento da CTL é preciso que ocorra uma desregulação na via de proliferação e na diferenciação das CTHs (Wang & Dick, 2005). Isso pode ocorrer devido a fatores intrínsecos da própria célula como mutações, translocações, deleções e/ou devido a fatores extrínsecos como uma sinalização errônea do microambiente medular (Rosen & Jordan, 2009) (figura 4). Entretanto, o que induz a transformação leucêmica ainda se mantém incerto.

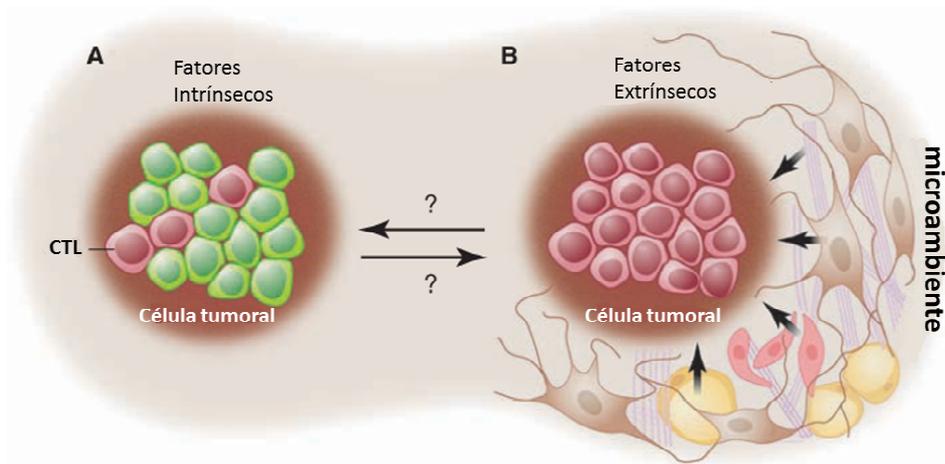


Figura 4: Influências no surgimento da célula tronco leucêmica. O surgimento da célula tronco leucêmica pode ser influenciado por fatores intrínsecos como mutações, translocações, instabilidade genética, como também por fatores extrínsecos através da desregulação das sinalizações realizada pelo microambiente medular para a célula tronco hematopoiética. CTL- célula tronco leucêmica. Adaptado de M.J Rosen e T.C Jordan.

1.7 Microambiente medular

As CTHs estão localizadas em uma região específica na medula óssea conhecida historicamente como “microambiente indutivo da hematopoiese”, “nicho hematopoiético” ou microambiente medular. Estruturalmente o microambiente

medular é formado pelas células estromais da medula que são um grupo heterogêneo de células não hematopoiéticas, derivadas do mesênquima (mesenquimais), que inclui fibroblastos, adipócitos, precursores osteogênicos, células reticulares e pelas células estromais mesenquimais; e pela matriz extracelular (Wilson & Trumpp, 2006). A manutenção das CTHs, assim como sua auto renovação, proliferação e diferenciação *in vivo* é altamente regulada pelos fatores fornecidos por esse microambiente medular específico no qual estas células residem (Ayala *et al.*, 2009).

O conceito de “nicho” das CTHs foi inicialmente proposto por Schofield em 1978, quando sugeriu que as células tronco hematopoiéticas mantinham um íntimo contato com a região do endósteo e que esse contato célula-célula seria aparentemente o responsável pela capacidade ilimitada de proliferação e pela inibição da maturação das CTHs (Schofield, 1978). De fato, a manutenção da auto renovação além dos diversos processos envolvidos na hematopoiese, parecem depender do suporte ativo da estrutura do nicho o que não é facilmente estimulado *in vitro* (Huang & Zhu, 2012).

Durante os 25 anos seguintes, os estudos do microambiente medular foram predominantemente baseados na microscopia ou em culturas celulares. Nesses estudos, foram descobertos os principais tipos celulares presentes na medula, entretanto, como cada célula estromal poderia influenciar o nicho hematopoiético ainda não estava claro (Purton & Scadden, 2008). Sabia-se que os sinais enviados pelo nicho para as CTHs incluíam a ação recíproca de citocinas, quimiocinas, enzimas proteolíticas e moléculas de adesão que ancoravam as células tronco hematopoiéticas ao nicho específico (Kollet *et al.*, 2006).

De acordo com sua localização, o nicho hematopoiético pode ser classificado em nicho vascular ou endósteo.

1.7.1 Microambiente vascular ou Nicho vascular

Diversos estudos demonstraram que as CTHs estão localizadas perto dos sinusóides na MO. Isso fez com que os pesquisadores assumissem a existência de um nicho vascular (Nakamura-Ishizu & Suda, 2013). Esse nicho é composto pelas células endoteliais sinusoidais e pelas células reticulares. As células endoteliais sinusoidais servem de barreira entre o estroma medular e a circulação. Além disso,

elas também regulam as CTHs e expressam SCF, que é extremamente importante na manutenção das CTHs no nicho. Diversos mecanismos através dos quais essas células regulam as CTHs têm sido descritos através de estudos *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, camundongos nocaute para o gene *Scf*, expresso nas células endoteliais, apresentam uma menor população de CTHs e uma menor capacidade de repopulação em experimentos de transplante medular (Nakamura-Ishizu & Suda, 2013), mostrando a importância das células endoteliais na manutenção das CTHs. O Nicho vascular é também o local onde ocorre a proliferação e a diferenciação dos progenitores celulares e, posteriormente, a saída para a corrente sanguínea (Konopleva & Jordan, 2011a).

1.7.2 Microambiente osteoblástico ou Nicho Endósteo

O nicho endósteo ou osteoblástico está localizado no eixo central da medula óssea, perto da superfície da cavidade do osso. Em 1975, foi demonstrada a localização física das CTHs perto do endósteo (Lord *et al.*, 1975). Sabe-se que o papel do endósteo é abrigar as CTH-LT e mantê-las em quiescência através da expressão de angiopoetina-1 (ANG-1), osteopontina (OPN) e N-caderina, que são expressos pelas células do endósteo (Isern & Mendez-Ferrer, 2011). O nicho osteoblástico é composto por diferentes tipos de células da linhagem osteogênica, incluindo as células estromais mesenquimais (que originam os osteoblastos), células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteócitos, além dos osteoclastos (origem hematopoiética).

Os osteoblastos são células da linhagem osteogênica que revestem a superfície do endósteo. Sua principal função é no remodelamento ósseo, onde secretam proteínas não-mineralizantes da matriz óssea e regulam a diferenciação dos osteoclastos (Purton & Scadden, 2008).

Através de observação microscópica foi possível observar que as CTHs aparentemente estão localizadas na área do periósteo, que é a membrana de tecido conjuntivo que envolve a cavidade medular, onde os osteoblastos representam um componente essencial desse nicho (Papadimitriou *et al.*, 1994). Por isso, foi sugerido a existência de uma interação entre as CTHs e os osteoblastos. A primeira evidência direta que os osteoblastos apresentavam atividade de suporte para as CTHs foi observado em um estudo *in vitro* de co-

cultura, que mostrou a capacidade de secreção de um grande número de citocinas hematopoiéticas pelos osteoblastos que facilitam a proliferação e sobrevivência dos progenitores hematopoiéticos (Taichman & Emerson, 1994). Em 2003, Calvi e colaboradores demonstraram em um modelo animal o papel dos osteoblastos no microambiente medular e sua relação com as CTHs. Utilizando camundongos transgênicos que expressavam constitutivamente o receptor ativo do hormônio para-tireoideano (HPT) – capaz de ativar os osteoblastos, observou-se um aumento no número de células osteoblásticas assim como um aumento significativo das CTHs na medula óssea. Os osteoblastos que expressavam o receptor HPT constitutivamente ativo apresentavam altos níveis do ligante Notch, assim como as CTHs expressavam altos níveis de Jagged 1, o que justificaria o aumento nos níveis de CTHs (Calvi *et al.*, 2003). Também em 2003, outro experimento animal demonstrou a importância dos osteoblastos na regulação das CTHs. Utilizando um camundongo nocaute para o receptor BMP1A, Zhang e colaboradores observaram um aumento significativo tanto dos osteoblastos quanto das CTHs sugerindo que os osteoblastos são um componente crucial do nicho hematopoiético e que atuam na regulação da proliferação dos progenitores hematopoiéticos (Zhang *et al.*, 2003).

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas dos macrófagos e que possuem a capacidade de reabsorção do osso. A interação entre os osteoblastos e osteoclastos é a chave para o remodelamento da MO.

Já as células estromais mesenquimais (MSCs do inglês *mesenchymal stromal cells*) ou células estromais da medula foram por muito tempo referidas como células tronco mesenquimais (CTMs). Entretanto, em 2005, a Sociedade Internacional de Terapia Celular publicou um esclarecimento em relação a nomenclatura das CTMs, justificando o uso desse termo apenas para um grupo de células de MO que demonstre os critérios específicos de célula tronco. (Horwitz *et al.*, 2005).

As MSCs são células multipotentes não hematopoiéticas essenciais do nicho hematopoiético, apesar de serem células extremamente raras (<0.01%). O primeiro grupo a descrever e identificar essas células *in vitro* foi o de Friedenstein em 1968, onde caracterizam essa célula em cultura como aderente ao plástico, semelhante a um fibroblasto e com uma capacidade rudimentar de regenerar tecido ósseo *in vitro* e *in vivo* (Friedenstein *et al.*, 1968). Posteriormente, foi

também demonstrado que essas células eram capazes de se diferenciar em adipócitos, condrócitos, osteócitos e mioblastos, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Pittenger *et al.*, 1999).

Em 2006 a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) propôs critérios mínimos para definir as MSCs humanas. Primeiro, as MSCs devem ser “aderentes ao plástico” (aderentes ao substrato), quando mantidas em condições padrão de cultivo *in vitro*. Segundo, as MSCs devem expressar as moléculas de superfície CD105, CD73 e CD90, e não expressar as moléculas de superfície CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19, e HLA-DR. Terceiro, as MSCs devem ser capazes de diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Dominici *et al.*, 2006).

Na MO, as MSCs são responsáveis por promover a estrutura física básica do nicho. Assim, essas células podem ser capazes de regular a auto renovação, proliferação e diferenciação das CTHs através da produção de citocinas e sinais intercelulares que são transmitidos através das interações célula-célula ou da secreção de proteínas (Shiozawa *et al.*, 2008).

1.8 Sinalização no Microambiente Hematopoiético

O processo de auto renovação e diferenciação das CTHs são controlados por vias genéticas intrínsecas que estão sujeitas a regulação por sinais extrínsecos do microambiente medular (Zhang & Li, 2005). Diversos experimentos têm demonstrado que as CTHs respondem a múltiplas citocinas e que a auto renovação, apoptose, mobilização para fora do nicho e formação de células progenitoras diferenciadas depende de múltiplas citocinas, proteínas de adesão, e outros sinais produzidos pelas células estromais mesenquimal. Dentre as sinalizações conhecidas mais importantes entre as CTHs e as MSCs estão as de BMP, Wnt e Notch. Além disso, algumas proteínas como OPN e ANG-1 também são importantes para a sinalização no nicho.

1.8.1 Via de sinalização BMP

As proteínas BMP (do inglês *bone morphogenetic protein*) são membros da superfamília dos fatores de crescimento TGF- β . Elas estão envolvidas na regulação celular da proliferação, diferenciação e apoptose e tem demonstrado um papel importante na indução do tecido hematopoiético durante o desenvolvimento embrionário (Zhang & Li, 2005).

As BMPs são proteínas secretadas que se ligam aos receptores heterodiméricos na superfície celular. Existem dois tipos de receptores de BMP, o tipo I (BMPRI) e o tipo II (BMPRII). A via canônica de BMP ocorre através atividade serino/ tirosino quinase do receptor tipo I resultando na fosforilação das proteínas SMAD1, SMAD5 ou SMAD8 (R-SMAD). R-SMADS fosforiladas formam um complexo heterotrimérico com a proteína SMAD4 (Co-SMAD). Esse complexo é translocado para o núcleo e interage com outros fatores de transcrição, regulando a expressão de genes alvos (Ross & Li, 2006; Zhang & Li, 2005) (figura 5).

O primeiro estudo a demonstrar que a via de BMP poderia ter um papel na regulação da hematopoiese foi um trabalho *in vitro* onde se observou que as CTHs humanas eram capazes de preservar sua atividade de reconstituição do sistema hematopoiético quando tratadas com BMP4 (Bhatia *et al.*, 1999). Em 2003, através do estudo com o camundongo mutante para BMPRI1A, Zhang e colaboradores demonstraram o papel chave da sinalização BMP na regulação das CTHs através do controle negativo do tamanho do nicho endósteo (Zhang *et al.*, 2003).

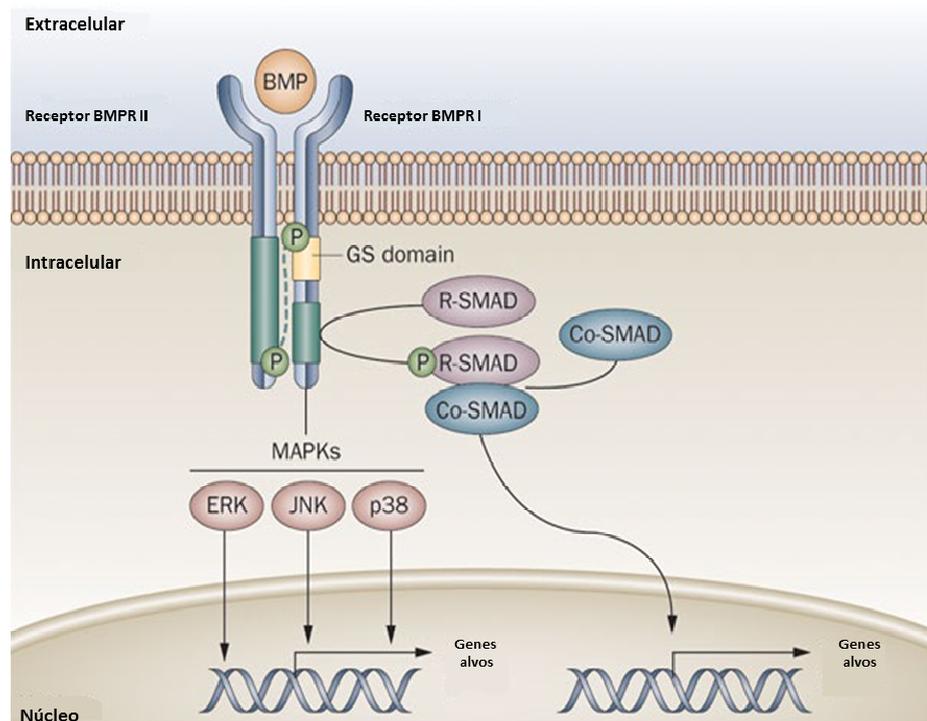


Figura 5: Modelo esquemático da via de sinalização de BMP. Adaptado de M.E Shore e S.F Kaplan (Shore & Kaplan, 2010)

1.8.2 Via de sinalização Wnt

Os ligantes WNT são glicoproteínas secretadas que ativam diversas vias de sinalização. A via de Wnt atua durante o desenvolvimento embrionário, assim como no adulto, dirigindo eventos como proliferação celular e diferenciação.

Existem três diferentes vias de sinalização de Wnt, sendo a via canônica a melhor caracterizada. A ativação da via canônica ocorre quando o ligante WNT interage com o receptor de superfície celular FRIZZLED e com uma de duas lipoproteínas de baixa densidade do receptor LPR5/6. Uma vez que ocorre essa ligação, a proteína GSK3 β é inativada, não formando assim o complexo de degradação de β -catenina. Com isso, a proteína β -catenina é estabilizada e acumulada no citoplasma com subsequente translocação para o núcleo, onde interage com os fatores de transcrição TCF (do inglês *T-cell transcriptional factor*) e LEF (do inglês *lymphoid enhancer factor-1*) regulando a expressão de diversos genes alvos. Na ausência do ligante WNT, β -catenina citoplasmática apresenta um curtíssimo tempo de vida, sendo degradada por um complexo de multiproteínas. Esse complexo consiste nos inibidores AXIN, APC, CK1 e GSK3 β . Após se ligar a

AXIN e a APC, β -catenina é fosforilada por duas quinases CK1 e por GSK3 β , o que gera uma modificação na estrutura da proteína que passa ser reconhecida pelo complexo E3-ubiquitina-ligase, que marca β -catenina com moléculas de ubiquitina que servem de sinalização para a degradação proteossomal (Nemeth *et al.*, 2009; Ross & Li, 2006; Staal & Clevers, 2005) (figura 6).

A sinalização de Wnt tem sido relacionada à hematopoiese, primeiro porque nesse tecido há expressão de diversos ligantes WNT e seus receptores e, segundo, devido à ativação da via Wnt resultar na proliferação e expansão das CTHs (Ross & Li, 2006).

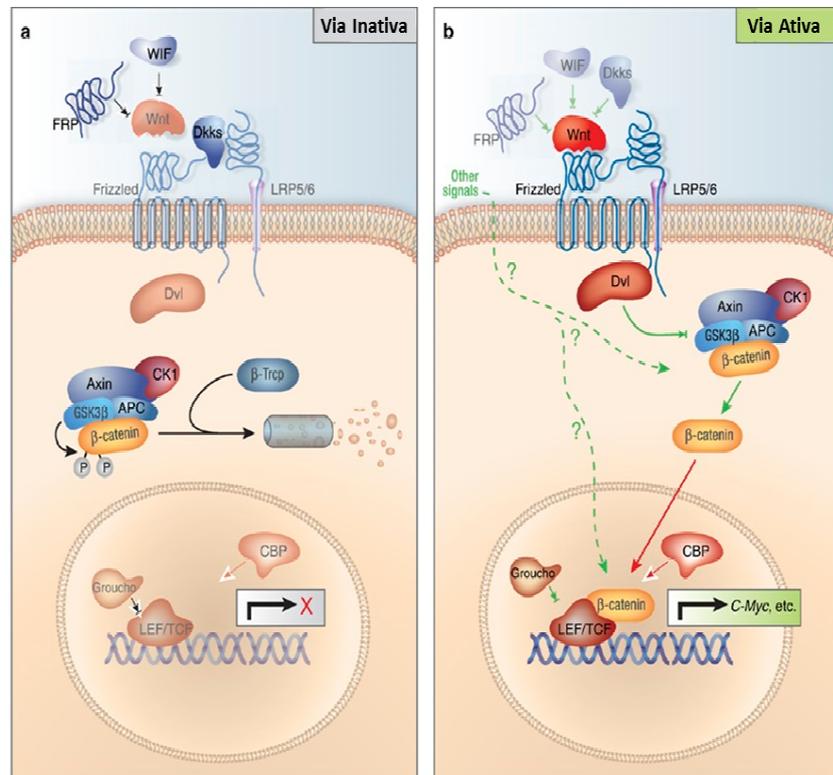


Figura 6: Modelo esquemático da via canônica de Wnt a) via inativa, b) via ativa. Adaptado de J. Luo (Luo *et al.*, 2007)

1.8.3 Via de sinalização de Notch

A via de sinalização de Notch é uma via altamente conservada e está envolvida na regulação do destino celular. Além disso, esta via controla uma enorme variedade de processos celulares, incluindo proliferação, apoptose,

regulação de auto renovação do tecido, diferenciação e manutenção de células precursoras (Azizidoost *et al.*, 2014).

NOTCH é um receptor de superfície celular composto por três partes, incluindo domínios extracelular, intracelular e transmembranar e possui várias funções celulares. Ele é capaz de interagir com dois ligantes transmembranares, DELTA e JAGGED. A ligação de qualquer um dos ligantes ao receptor resulta na clivagem proteolítica de NOTCH liberando o domínio citoplasmático denominado domínio intracelular de NOTCH (NICD). NICD é translocado para o núcleo onde se liga às proteínas CBF-1 e RBP-Jk, convertendo esses fatores de transcrição, normalmente repressores, em ativadores dos genes alvos de NOTCH (Ross & Li, 2006).

Diversos estudos têm demonstrado que a ativação da via de sinalização Notch apresenta um papel na regulação das CTHs. Calvi e colaboradores demonstraram isso no trabalho em que osteoblastos que produzem altos níveis de Jagged 1 podiam auxiliar no aumento do número de CTHs (Calvi *et al.*, 2003).

1.8.4 Osteopontina

A Osteopontina (OPN) é uma glicoproteína fosforilada secretada na matriz óssea por diversos tipos celulares. Ela está envolvida em diversos processos fisiológicos e patológicos como, adesão celular, angiogênese, apoptose, resposta inflamatória e metástase tumoral. A OPN interage com as CTHs através da ligação com as β 1-integrinas assim como as várias isoformas de CD44, ativando diversas vias de sinalização (Nilsson *et al.*, 2005; Stier *et al.*, 2005).

Estudos com camundongos deficientes em OPN demonstraram que um mecanismo pelo qual os osteoblastos podem regular o número das CTHs na medula é através da secreção de OPN. Esses camundongos apresentaram um aumento no número de células hematopoiéticas primárias e este aumento não era devido a alterações na cinética do ciclo celular dessas células. Esses resultados sugerem que o mecanismo de ação da OPN para aumentar o número de CTHs pode ser a diminuição da morte celular. Dessa forma, OPN é um regulador negativo da proliferação das CTHs no nicho medular e também atua na manutenção da quiescência das CTHs no nicho endósteo (Nilsson *et al.*, 2005; Stier *et al.*, 2005; Wilson & Trumpp, 2006).

1.8.5 Angiopoetina

A angiopoetina1 (Ang-1) pertence a uma família de fatores de crescimento composta de quatro membros que se ligam ao receptor tirosina quinase Tie-2. A evidência genética da necessidade da interação de Tie-2 foi obtida através de camundongos negativos para Tie-1 e Tie-2. Foi demonstrado que Tie-1 e Tie-2 não são necessários para o desenvolvimento e diferenciação fetal das CTHs, entretanto a falta de Tie-1 e Tie-2 prejudica a manutenção do microambiente adulto. Na MO adulta, Tie-2 (que é expresso especificamente pelas CTHs-LT) é ativado pela Ang-1, que é secretada pelos osteoblastos, levando a uma super expressão de N-caderina nas CTHs, promovendo adesão celular. A interação entre Ang-1 – Tie2 previne a divisão da CTHs e mantém as células em quiescência (Wilson & Trumpp, 2006).

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Devido a grande heterogenicidade da doença, muitos estudos tem se acumulado nos últimos anos sobre processos leucemogênicos da LMA do adulto. Entretanto, os eventos relacionados com o início da doença assim como sua progressão ainda não foram claramente elucidados. Ainda se mantém controverso se alterações nas MSCs podem influenciar, através de sinalizações errôneas, a transformação leucêmica das CTHs e o quanto essa alteração pode contribuir para progressão da doença. Na última década, descobertas têm sido feitas para elucidar as alterações moleculares que levam a LMA. Embora haja diversos estudos na área, o papel do microambiente na iniciação e progressão da leucemia ainda é desconhecido.

As células leucêmicas, assim como as células normais, estão sob a influência do microambiente. Assim, a interação entre o microambiente e as células leucêmicas, podem estar afetando a apoptose, diferenciação e proliferação dos blastos na LMA.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

Verificar se o processo leucemogênico pode ser influenciado pela sinalização realizada pelas Células Mesenquimais Estromais da Medula Óssea em pacientes com Leucemia Mieloide Aguda.

3.2 Objetivos secundários

Utilizando culturas de MSCs de pacientes com LMA e de doadores saudáveis, pretendemos:

- Caracterizar as MSCs de pacientes com LMA e de doadores saudáveis.
- Avaliar o perfil de proliferação e de ciclo celular das MSCs de pacientes com LMA.
- Determinar por análises transcriptômicas o perfil de expressão das MSCs de paciente com LMA e comparar com doadores saudáveis.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras dos pacientes com LMA e doadores saudáveis

As amostras de medula óssea (MO) foram coletadas por punção da crista ilíaca posterior. Para realização desse trabalho utilizamos 33 amostras de pacientes previamente diagnosticados com LMA e sendo 14 do sexo feminino com média de idade de 40,8 anos (9-70) e 19 do sexo masculino com média de idade de 36,9 anos (14-78), e 13 amostras controles de doadores de medula óssea, com média de idade de 40,3 anos (32-47) para os transplantes realizados no Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO). Só foram incluídos no estudo amostras ao diagnóstico. As amostras dos pacientes foram provenientes de diversas unidades hospitalares do Rio de Janeiro e outros estados do Brasil. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do INCA (099/06-CEP INCA n° 034/06) e todo o material do estudo só foi utilizado após o Termo de Consentimento livre e esclarecido ter sido assinado pelos pacientes. As características de cada paciente utilizado no estudo encontram-se na tabela 3.

Tabela 3: Dados dos pacientes com LMA utilizados neste estudo.

Cód LCT	Diagnóstico	%Blastos	Sexo	Idade	Citogenética
005/12	M4/M5	80%	Masculino	43	46,XY,i(9)(q10)[20]
006/12	M3	85%	Masculino	68	não foi solicitado nos laboratórios do CEMO
007/12	M1/M2	75%	Feminino	9	46,XX,t(3;13)(q13;11),t(16;21)(p11q22)
009/12	M3	80%	Masculino	30	Sem condições de análise (sem mitoses)
010/12	M1/M2	36%	Masculino	18	não foi solicitado nos laboratórios do CEMO
011/12	M1/M2	64%	Feminino	13	45,X,-X,t(8;13;21)(q22;q34;q22)
012/12	M1/M2	60%	Feminino	13	45,XX,inv(3)(q21q26),-7[20]
017/12	M0	40%	Feminino	62	não foi solicitado nos laboratórios do CEMO
002/13	M1	29%	Feminino	70	Cariótipo normal
007/13	M2	23%	Masculino	14	não foi solicitado nos laboratórios do CEMO
008/13	M2	98%	Masculino	42	Sem condições de análise (sem mitoses)
009/13	M2	56%	Masculino	30	Cariótipo normal
010/13	M2	38%	Masculino	25	Sem condições de análise (sem mitoses)
017/13	M3	71,80%	Feminino	21	não foi solicitado nos laboratórios do CEMO
021/13	M4/M5	60%	Feminino	22	Fish: Positivo para rearranjo CBFb em 45 das 100 núcleos analisadas
025/13	M4/M5	75%	Masculino	46	Cariótipo normal
028/13	M2	17%	Masculino	26	Cariótipo normal
031/13	M2	70%	Feminino	61	Cariótipo normal
036/13	M3	84%	Feminino	29	Fish: Positivo para a fusão PML/RARA nas 100 núcleos analisadas
037/13	M4/M5	80%	Masculino	35	Sem condições de análise (sem mitoses)
040/13	M2	84%	Masculino	28	não foi solicitado nos laboratórios do CEMO
041/13	LMA	56%	Masculino	45	47,XY,+8, add(22)(p11)[8]/46, XY [12]
042/13	LMA	90%	Masculino	78	Cariótipo normal
043/13	M3	80%	Feminino	53	Fish:Negativo para fusão PML/RARA nas 100 núcleos analisadas
045/13	M3	75%	Masculino	31	Fish:Positivo para a fusão PML/RARA nas 75 das 100 núcleos analisadas
047/14	M2	87%	Feminino	47	Sem condições de análise (sem mitoses)
050/14	M2	25%	Masculino	28	Sem condições de análise (sem mitoses)
051/14	M1	67%	Masculino	50	Cariótipo normal
053/14	M1	90%	Masculino	32	Sem condições de análise (sem mitoses)
054/14	LMA	60%	Masculino	32	Fish: Negativo para fusão PML/RARA nas 100 núcleos analisadas
056/14	M4/M5	90%	Feminino	60	47,XX,+8t(9;11)(p22q23)[22]
059/14	M3	98%	Feminino	47	Cariótipo normal
061/14	M4/M5	84%	Feminino	65	Cariótipo normal

4.2 Isolamento e cultivo de MSC

Para o isolamento e cultivo das MSCs, foram utilizados entre 500ul – 2000ul de amostras de medula óssea dos pacientes com LMA e de doadores saudáveis. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 15 min. O plasma foi coletado e transferido para um eppendorf de 1,5 ml, tratado com 1uL/mL do inibidor de protease mix (Biosciences, EUA) e congelado a - 70° C para posterior análise. O sedimento celular da centrifugação foi plaqueado em garrafas de 25 cm² de poliestireno (Sarstedt, Alemanha). Foi adicionado a cultura meio DMEM com baixa concentração de glicose (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Invitrogen, EUA) acrescido de 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (Sigma-Aldrich, EUA), 2mM de glutamina (Invitrogen, EUA) e 10% de soro bovino fetal – (SBF Hyclone, EUA) - (meio completo para MSC) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de

CO₂. Após uma semana, as culturas foram lavadas 2 vezes em PBS 1X para remoção das células não aderentes e adicionado meio completo para MSC novo. O meio de cultura foi trocado 2 vezes por semana até que as culturas de MSC atingissem uma confluência de 80%. Atingida a confluência (aproximadamente uma semana), as MSCs foram submetidas a uma solução de tripsina 0,05%-EDTA (ácido etileno diamino tetraacético 0.53mM - Invitrogen, EUA) por 3 min a 37°C, para que as células aderentes se soltassem da placa. A ação da tripsina foi interrompida adicionando 2x o volume de tripsina de meio DMEM com baixa glicose. As células foram centrifugadas a 1.500 rpm por 5min e o sobrenadante foi removido. O “pellet” de células foi ressuspendido em meio completo para MSC e as células foram contadas na câmara de Neubauer. As células foram distribuídas em novas placas/garrafas, na proporção de 2.000 células/ cm² (passagem 1). Quando as células atingiram 80% de confluência (7-10 dias de cultura) foram novamente tripisinizadas e plaqueadas em novas garrafas (passagem 2). As células foram cultivadas até a passagem 3.

4.3 Caracterização das culturas de MSC

4.3.1 Análise ao Microscópio Ótico

Todas as culturas foram observadas rotineiramente em microscópio invertido de contraste de fase (Zeiss, Alemanha). Para uma análise morfológica mais detalhada, as células foram coradas em May – Grunwald/ Giemsa após lavagem em PBS 1x e fixação com paraformaldeído 4%.

4.3.2 Análise de Marcadores de Superfície

A caracterização dos marcadores de superfície das MSCs foi realizada para todas as culturas analisadas, através de ensaios de citometria de fluxo. A uma suspensão de 8×10^4 células, obtidas após tripsinização de culturas de MSC foi resuspendida em meio de cultura e adicionados anticorpos conjugados aos fluorocromos FITC, PE e Cy5-FITC. As células foram adquiridas no citômetro de fluxo Fluorescence Activated Cell Analyser (FACScan, BD Biosciences, EUA) e

analisadas no software CellQuest (BD Biosciences, EUA). Os anticorpos que utilizamos reconhecem os seguintes marcadores de superfície: CD105, CD73 e CD90, CD45, CD14, CD19, CD34 e HLA-DR. (BD Bioscience, EUA).

4.3.3 Ensaios de diferenciação in vitro

O potencial de diferenciação das MSCs tanto de pacientes com LMA quanto dos doadores saudáveis, foi avaliado na passagem 3. Foram realizados ensaios para a diferenciação adipogênica e osteogênica para todas as culturas analisadas, utilizando-se protocolos específicos para cada caso.

4.3.3.1 Diferenciação Osteogênica

Cerca de 10^4 células foram cultivadas em poços de 9cm^2 em meio de diferenciação basal osteogênico (Gibco, EUA), por no mínimo 3 semanas, com troca de meio 2 vezes por semana. Posteriormente, as células foram fixadas com PFA (Paraformaldeído) 4% por 20 min. Após a coloração com solução de Vermelho de Alizarina S (Isofar, Brasil) pH4,2 por 5 minutos a temperatura ambiente, a diferenciação das células mesenquimais pode ser detectada pela observação de depósitos de Cálcio nas culturas, (o corante vermelho de alizarina S cora em vermelho depósitos de cálcio).

4.3.3.2 Diferenciação Adipogênica

Cerca de 10^4 células foram cultivadas em poços de 9cm^2 em meio de diferenciação basal adipogênico (Gibco, EUA), por no mínimo 2 semanas, com troca de meio 2 vezes por semana. O fenótipo adipogênico das culturas foi confirmado pela presença de gotículas de gordura após fixação das células em PFA 4% por 20 min e coloração com corante Oil-red-O (Sigma-Aldrich, EUA) em isopropanol por 5 minutos.

4.4 Ensaio de proliferação por WST-1

Nesse ensaio foram utilizadas 5 amostras de MSC de pacientes com LMA (pacientes com cód. LCT – 051/13; 053/13; 054/13; 056/13; 059/13) e 5 amostras de MSC de doadores saudáveis. A proliferação celular das culturas de MSCs foi determinada através do ensaio de WST-1 (Roche, Suíça) seguindo as instruções do fabricante. Trata-se de um ensaio colorimétrico baseado na capacidade de células converterem o sal Tetrazolium (4-[3-(4-Iodophenyl) -2-(4-nitrophenyl) -2H-5-tetrazolio] -1,3-benzene disulphonate) em corante Formazan. Essa conversão é realizada pela enzima mitocondrial Succinato-tetrazolium redutase. Um aumento na atividade enzimática mitocondrial na amostra leva a um aumento na formação de Formazan, que está diretamente correlacionado com o número de células metabolicamente ativas na cultura. Para os ensaios de WST-1, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de $6,2 \times 10^2$ células por poço. Após 2, 4 e 6 dias foi adicionado 3 μ L WST-1 em cada poço e, em seguida, as placas foram incubadas por 3h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A quantificação das variações colorimétricas foi realizada em um leitor de Elisa (Asys modelo Expert Plus) utilizando o comprimento de onda de 450 nm com a referência de 630 nm. Como branco foi utilizado 200 μ L de meio de cultivo sem células e 3 μ L de WST-1. As análises e gráficos foram feitos no GraphPad Prism versão 6 (GraphPad Software, EUA.).

4.5 Ensaio de Ciclo Celular por citometria de fluxo

Nesse ensaio foram utilizadas 5 amostras de MSC de pacientes com LMA (pacientes com cód. LCT – 051/13; 053/13; 054/13; 056/13; 059/13) e 5 amostras de MSC de doadores saudáveis. O Ciclo Celular foi analisado usando iodeto de propídio (IP; Sigma–Aldrich, EUA). Para esse ensaio, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços a uma densidade celular de 3×10^4 células por poço e

deixadas por 24h em meio completo com 10% SBF. Após as 24 horas, o meio foi trocado por um meio contendo 0,1% SBF e incubado por 48h para bloquear o ciclo celular. Passadas às 48h, um dos poços foi tripsinizado e chamado de D0, que foi usado como controle da parada do ciclo celular. Nos outros poços restantes, o meio completo com 10% SBF foi repostado a cultura por mais 72h e após esse período o poço foi tripsinizado. As células foram ressuspensas em PSB 1x e fixadas em etanol 70% gelado por 16 horas. Para marcação com IP, a suspensão de células fixadas foi centrifugada a 1.500rpm por 5min e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com PBS 1x, ressuspensas em 250µl de solução IP (0,1% de NP40, 0,2 mg/mL RNase, 0,2mg/mL PI) e incubadas por 30 min a 4°C. As células marcadas foram adquiridas no citômetro de fluxo Fluorescence Activated Cell Analyser (FACScan, BD Biosciences, EUA) e os dados obtidos foram analisados no programa CellQuest (BD Biosciences, EUA). Para as análises foram adquiridos 5000 eventos dentro do R2.

4.6 Análise molecular

4.6.1 Análise da Expressão Gênica Diferencial

4.6.1.1 Extração de RNA total

A extração de RNA total foi realizada com auxílio do reagente TRIzol (Invitrogen, EUA) seguindo instruções do fabricante. Na passagem 3 as culturas de MSCs foram submetidas a uma solução de tripsina 0,05%-EDTA e o pellet de células formado foi posteriormente lavado em PBS 1X por 2 vezes e adicionado a ele 1mL de Trizol. Após homogeneização, a solução foi centrifugada por 10 minutos a 12.000g a 4°C, e o sobrenadante foi recuperado em um tubo novo. Ao sobrenadante foram adicionados 200 µL de clorofórmio para cada 1mL de Trizol, e em seguida a solução foi misturada vigorosamente por 15 segundos e incubada por 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. O tubo foi então centrifugado por 15 minutos a 12.000g a 4°C. A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um novo tubo de 1,5ml. Foram adicionados então 500 µL de isopropanol 100% para cada 1mL de Trizol, e a mistura incubada por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, o material foi centrifugado por 10 minutos a 12.000g a 4°C e o

sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 1mL de etanol 75%, sendo centrifugado por 5 minutos a 7.500g a 4°C, e o sobrenadante descartado. O precipitado foi reconstituído em 25 µL de água livre de RNase. Os RNAs obtidos foram quantificados em espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific, EUA). A avaliação da qualidade do RNA foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,8%. Os RNAs foram estocados a -70°C até o uso.

4.6.1.2 Purificação do RNA total

Para os ensaios de Chiparray foi preciso purificar o RNA extraído pelo TRIzol. A purificação do RNA total foi realizada utilizando o RNeasy Mini Kit (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração do RNA total e quantificação foi separado uma massa de 10µg para purificação. Os volumes das amostras foram ajustados para 100µL de água livre de RNA e adicionado 350µL do tampão RLT. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas e a elas foi adicionado 250µL de etanol 100% e agitado gentilmente com pipeta. Metade dessa solução (350µL) foi transferida para a coluna de purificação que foi centrifugada a 8.000g por 15 segundos e o eluído foi descartado. O restante da amostra (350µL) foi adicionado à coluna de purificação e novamente centrifugado a 8.000g por 15 segundos e o eluído descartado. Adicionamos 500µL de tampão RPE à coluna de purificação que foi novamente centrifugada a 8.000g por 15 segundos e o eluído descartado. O processo foi repetido e novamente 500µL de tampão RPE foi adicionado à coluna, centrifugada a 8.000g por 2 minutos e posterior descarte do eluído. Em seguida, a coluna foi centrifugada a 22.000g por um minuto a fim de eliminar todo líquido remanescente. Para eluição do RNA, foram adicionados 25µL de água livre de RNase a coluna e a mesma foi centrifugada a 8.000g por 1 minuto. O eluído correspondente ao RNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific, EUA).

4.6.1.3 Chiparray

Nesse ensaio utilizamos 7 amostras de MSC de pacientes com LMA (pacientes com cód. LCT – 005/12; 006/12; 007/12; 008/13; 009/13; 017/13; 028/13; 031/13) e 2 pools MSC de doadores saudáveis. Para o ensaio de Chiparray utilizamos 100 nanogramas (100ng) de RNA previamente extraído e purificado e adicionamos 2 µL de Poly-A controle (amostras de RNA exógeno de procarioto que irão auxiliar no monitoramento de todo o experimento), em um volume final de 5µL. Na primeira etapa do experimento foram realizadas as sínteses da primeira fita de cDNA, segunda fita do cDNA e síntese de um cRNA por transcrição *in vitro* de acordo com as instruções do fabricante (Ambion, EUA). Para a síntese da primeira fita de cDNA foi adicionado 5 µL de “First-Strand Master Mix” (Ambion, EUA) e a reação foi incubada a 25°C por 60 min; 42°C por 60 min e 4°C por 2 min no termociclador (MyCycle, Bio-Rad, EUA). Para a síntese da segunda fita do cDNA foi adicionado a reação 50 µL “Second-Strand Master Mix” (Ambion, EUA) e incubada no termociclador (MyCycle, Bio-Rad, EUA) a 16°C por 60 min; 65°C por 10 min e 4°C por 2 min. Após a realização da síntese do cDNA fita-dupla foi adicionado ao tubo 30 µL do “IVT master mix” (Ambion, EUA) para a síntese de cRNA por transcrição *in vitro*. A reação foi incubada a 40°C por 16 horas no termociclador (MyCycle, Bio-Rad, EUA). Posteriormente, esse cRNA recém sintetizado foi purificado de acordo com o protocolo do fabricante (Ambion, EUA) e quantificado no espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific, EUA). Em seguida, 10 µg deste cRNA purificado foi utilizado para nova síntese de cDNA (Ambion, EUA). Para isso, 2 µL de *Random Primers* e 16 µL do “2nd-Cycle Master Mix” foram adicionados a reação e incubados a 25°C por 10 min; 42°C por 90min; 70°C por 10 min e 4°C por pelo menos 2 min. Para hidrolisar qualquer cRNA remanescente foi adicionado 2µL de RNase H a cada amostra e incubado a 37°C por 45min; 95°C por 5 min e 4°C por 2 min. Esse novo cDNA sintetizado foi purificado de acordo com o protocolo do fabricante (Ambion, EUA) e quantificado no espectrofotômetro Nanodrop ND-100 (Thermo Scientific, EUA). A partir deste momento o cDNA purificado foi fragmentado e marcado. Para a fragmentação do cDNA foi utilizado 5,5 µg em um volume máximo de 31,2µL e adicionado 16,8µL de mix de fragmentação e incubado a 37°C por 60 min; 93°C por 2 min e 4°C por pelo menos 2 min. Após a fragmentação 45µL da reação foi transferido para um novo tubo. O cDNA fragmentado foi então marcado com 15µL do mix contendo TdT e incubado a 37°C por 60 min; 70°C por 10 min e 4°C por 2 min. Ao final da

incubação foi adicionada a reação um mix de hidridização contendo um controle de hibridização eucariótico (hibridiza em locais pré-determinados no chip - utilizados como controle do array), sendo a reação novamente encubada a 99°C por 5 mim e 45°C por 5 mim. Posteriormente, 200µL de cada amostra foi depositada em cada Chiparray e esses foram colocados no forno de hibridização a 45°C por 17 horas a uma rotação de 60 RPM. Na manhã do dia seguinte, os arrays foram lavados e marcados na estação fluídica da *Affymetrix*. As informações sobre hibridização foram avaliadas no *scanner GeneChip® Scanner 3000* e analisadas no programa *GeneChip® Operating Software (GCOS)* (Affymetrix, EUA). Os dados obtidos foram então analisados com o auxílio do software Partek (Partek Inc.EUA).

4.6.2 Análise de diferença de expressão gênica por PCR em tempo real (RT-qPCR)

Para confirmar os resultados do Chiparray realizamos o ensaio de PCR em tempo real (RT-qPCR) em uma gama maior de pacientes, sendo 19 MSCs de pacientes com LMA (pacientes com cód. LCT – 005/12; 006/12; 007/12; 008/13; 009/13; 010/13; 011/13; 012/13; 017/13; 025/3; 028/13; 031/13; 036/13; 037/13; 045/13; 051/14; 053/14; 054/14; 056/14) e 13 MSCs de doadores saudáveis, para alguns genes selecionados que foram encontrados diferencialmente expressos.

4.6.2.1 Tratamento com DNase

Após a extração do RNA total, as amostras foram tratadas com DNase para degradação de quaisquer resquícios de moléculas de DNA remanescentes da extração de RNA. Para isso, foi utilizado a DNase amplification grade I (Invitrogen, EUA), segundo instruções do fabricante. Utilizamos 2µg de RNA total e incubamos com 1U de DNase e 1X de tampão DNase 10X em um volume total de 10µL, durante 15 minutos a 25°C. Após esse período, foi adicionado 1µL de EDTA 25mM a reação para inativação da enzima DNase. A reação foi incubada por 10 minutos a 65°C no termociclador (MyCycle, Bio-Rad, EUA).

4.6.2.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

Para realização da conversão do RNA em cDNA utilizamos o kit SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Após o tratamento com DNase e sua inativação, foi adicionado à reação 1 µL de OligodT (500ug/mL, IDT) e 1 µL de dNTP Mix (10mM cada) à um volume final de 12 µL seguido de incubação por 5 minutos a 65°C. Posteriormente, adicionou-se a reação 4 µL de Tampão 5X First-Strand, 2 µL de DTT 0,1 mM, 1 µL RNAout (40u/µL) e 1 µL SuperScript II. A síntese de cDNA procedeu incubando a reação a 42°C por 50 minutos com posterior inativação da enzima mantendo-a durante 15 minutos a 70°C. As incubações foram realizadas no termociclador (MyCycle, Bio-Rad, EUA).

4.6.2.3 Desenhos dos Iniciadores

Os iniciadores utilizados para a reação de PCR em tempo real foram desenhados de acordo com instruções contidas no manual do Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA). As seqüências dos mRNA foram obtidas no banco de dados do genoma humano (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene). Com auxílio da ferramenta disponível *on-line* na página da IDT (Integrated DNA Technologies - www.idt.org) os iniciadores foram desenhados e a especificidade dos oligonucleotídeos foram determinadas previamente *in silico* diante de sua similaridade aos dados de mRNA humanos através da ferramenta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) / HumanGenome (www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

4.6.2.4 Reação de PCR em tempo real (RT-qPCR)

Os cDNAs obtidos previamente foram diluídos para concentrações de 4ng/µL e 8ng/µL e utilizados para amplificação por PCR utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems). As reações de PCRs foram realizadas utilizando 10ng de cDNA, 2,5µL de mix dos primers (senso e anti-senso a 2,0 µM de cada) (ver tabela 2) e 5,0 µl de Power SYBR Green PCR Master Mix® (Applied Biosystems). As RT-qPCRs foram realizadas no termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, EUA). As análises foram realizadas com auxílio do programa Rotor-

Gene Q - Pure Detection Software Version 2.2.3 (Qiagen, EUA). Todas as reações foram submetidas a uma incubação inicial de 95°C por 10min, seguidos de 40 ciclos, para amplificação. Quando as Temperaturas de anelamento (TA) eram menores que 60°C as ciclagens foram realizadas em três passos (desnaturação de 95°C por 30s, seguida de anelamento com temperatura menor que 60°C por 30s e síntese em 72°C por 30s). Quando as TAs eram maiores ou iguais a 60°C foram realizadas ciclagens em dois passos (desnaturação de 95°C por 30s, seguida de anelamento com temperatura maior ou igual que 60°C por 60s). As TA utilizadas nas reações das PCRs assim como os iniciadores de cada gene analisado encontram-se na Tabela 2. As reações de RT-qPCRs foram normalizadas em relação aos níveis de transcritos de *Gapdh* (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e de *B2m* (β -2 Microglobulina). As alterações nos níveis de mRNA foram calculadas pelo método de análise de Livak e Schmittgen delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$) (Livak and Schmittgen, 2001). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para RT-qPCR e suas respectivas TAs

Gene	Primer Senso (5'-3')	Primer Antisenso (5'-3')	TA (°C)
<i>Gapdh</i>	GTCAACGGATTTGGTCGTATTG	TGGAAGATGGTGATGGGATTT	62
<i>B2m</i>	ATGAGTATGCCTGCCGTGTGA	CGGCATCTTCAAACCTCCATG	60
<i>Spond2</i>	CCAAATACAGCATCACCTTCAC	GCCTCGATCTCCTTCATCAG	60
<i>Ccl2</i>	CCCAGTCACCTGCTGTTAT	GGAGTTTGGGTTTGCTTGTC	62
<i>Mmp16</i>	TATTCGCCGTGCCTTTGAT	CCACATCACGTTTGCCATTT	62
<i>Bmp4</i>	CCATGATTCCTGGTAACCGA	CCTGAATCTCGGCGACTT	60
<i>Cldn1</i>	TCTTTGACTCCTTGCTGAATCT	GCCAGACCTGCAAGAAGAATA	60
<i>Spp1</i>	GCTAAACCCTGACCCATCTC	CTACATCATCAGAGTCGTTTCGAG	64

4.7 Análise *in silico*

Para as análises *in silico* utilizamos o software Metacore™ (GeneGO Inc. EUA). Foram identificados os processos biológicos e as vias de sinalização mais relevantes nas quais os genes diferencialmente expressos estão relacionados.

4.8 Elisa

Para a verificação de algumas proteínas específicas no plasma dos pacientes com LMA e doadores saudáveis utilizamos o método de Elisa. Para esse ensaio utilizamos 33 amostras de plasma de pacientes com LMA, sendo todos os pacientes listados na tabela 3 e 11 amostras de plasma de doadores saudáveis. Foram utilizados os kits, BMP4 Elisa kit humano e OPN Elisa kit humano (Sigma-Aldrich, EUA) e o CCL2 Elisa kit (Peprtech, Brasil) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de plasma foram adicionadas aos poços nas placas de Elisa contendo o anticorpo primário, e incubadas por 2 horas e meia a temperatura ambiente e agitação moderada. Após esse período, os poços foram lavados 4 vezes com tampão de lavagem (PBS) e foi adicionado o anticorpo de detecção biotinizado a cada poço da placa, a qual foi incubada por 1 hora a temperatura ambiente e agitação moderada. Passado o período de incubação, os poços foram novamente lavados por 4 vezes e adicionado à solução de HRP-streptavidina. A placa foi novamente incubada por 45 min a temperatura ambiente e agitação moderada. Após esse período, os poços foram lavados 4 vezes com tampão de lavagem e foi adicionado o substrato TMB que foi incubado por 30 min a temperatura ambiente e agitação moderada no escuro. Posteriormente, foi adicionada nos poços uma solução de parada da reação. A leitura da placa foi realizada imediatamente no leitor de Elisa (Asys modelo Expert Plus) utilizando o comprimento de onda de 450 nm. As concentrações das proteínas específicas de cada kit foram determinadas através da utilização de uma curva padrão realizada juntamente com o experimento.

4.9 Análises estatísticas

O teste estatístico utilizado foi o de Mann Whitney. Foram considerados estatisticamente significativos experimentos cujo *P Value* foi menor que 0,05

(* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). As análises estatísticas e as representações gráficas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., USA). A dispersão dos dados em relação à média foi representada graficamente na forma de desvio padrão(DP).

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização das culturas de células estromais mesenquimais (MSC)

Em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC) publicou os três critérios mínimos necessários para caracterizar uma cultura de MSC que são: as células devem ser aderentes ao plástico; devem expressar os marcadores de superfície CD90, CD105 e CD73 e não devem expressar os marcadores CD34, CD45, CD14, CD19 e HLA DR; e devem ser capazes de diferenciar *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condrócitos em meios indutores de diferenciação (Dominici et al., 2006). Com base nesses critérios, realizamos a caracterização das culturas de MSCs de pacientes com LMA e de doadores saudáveis e posteriormente comparamos as duas culturas.

5.1.1 Análise ao microscópio ótico das culturas de MSC de pacientes com LMA e de doadores saudáveis confirma o primeiro critério mínimo estabelecido pela SITC.

A aderência das células ao plástico foi observada rotineiramente através da análise ao microscópio ótico. Para uma análise mais detalhada as culturas foram coradas na passagem 3 com May-Grunwald/ Giensa e fotografadas. Na figura 7 é possível observar que tanto as culturas de MSC de pacientes com LMA (figura 7A) quanto a de doadores saudáveis (figura 7B) são aderentes ao plástico. Com isso, podemos afirmar que ambas atendem ao primeiro critério estabelecido pela SITC. Analisamos também a morfologia dessas células e observamos que tanto as MSCs de pacientes com LMA quanto às de doadores saudáveis apresentavam um formato fibroblastóide, característico das células MSCs. Essas culturas quando comparadas em relação à morfologia não apresentaram diferenças.

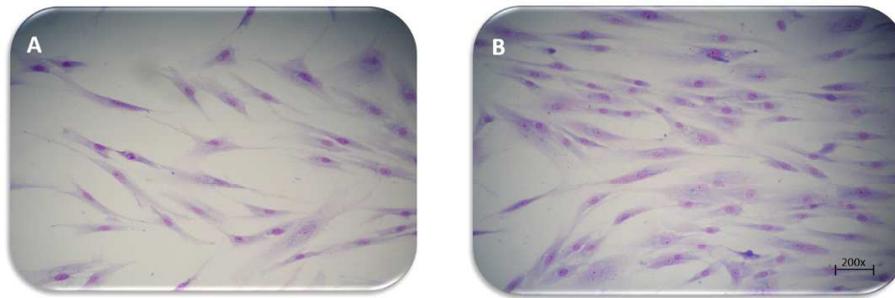


Figura 7: Análise ao microscópio óptico de culturas de MSC de pacientes com LMA e doadores saudáveis coradas com May-Grunwald. (A) MSC de paciente com LMA na P3 e (B) MSC de doador saudável na P3. Ambas as culturas apresentam características morfológicas de MSC (aumento de 200X). Figura representativa de todos os pacientes e doadores analisados.

5.1.2 Confirmação do segundo critério mínimo através da análise do perfil imunofenotípico das MSCs de pacientes com LMA e doadores saudáveis.

Para a caracterização dos marcadores de superfície, as culturas de MSCs na passagem 3, foram analisadas por citometria de fluxo para os marcadores CD90, CD73, CD105, CD34, CD14 e CD19. No histograma da figura 8, a população de células MSC de pacientes é representado pela linha preta, sendo a linha cinza a população de células MSC não marcadas.

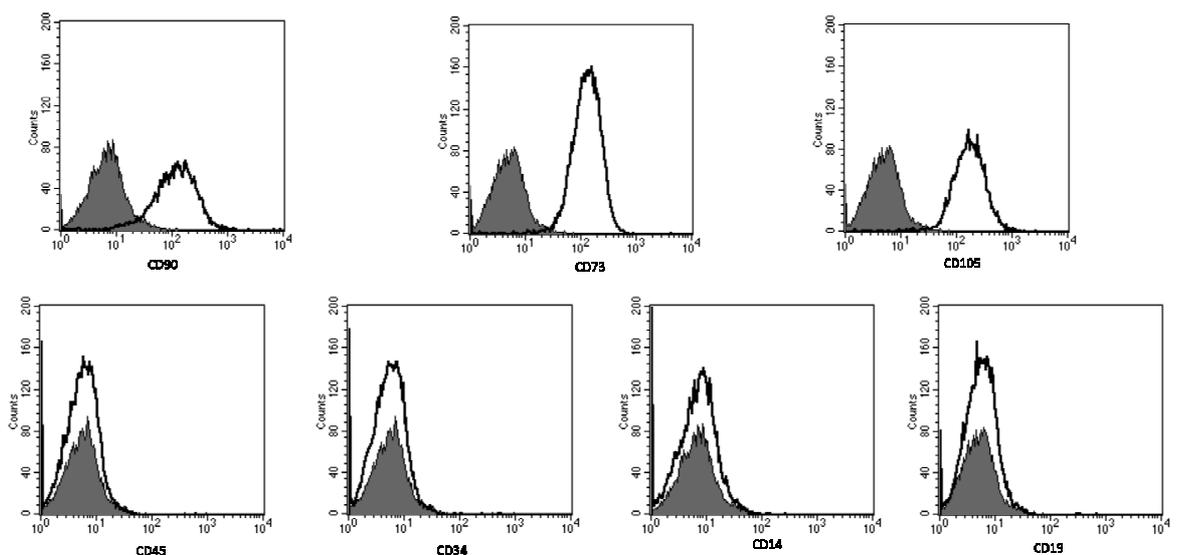


Figura 8: Perfil imunofenotípico das MSCs de pacientes com LMA. Os histogramas mostram a expressão dos marcadores celulares CD90, CD76 e CD 105 e ausência de marcação para CD34, CD45, CD14 e CD19, conforme estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. A

população de células MSC não marcadas está representada em cinza e, representado pela linha preta, a população de MSC dos pacientes com LMA.

Quando comparamos o perfil imonofenótico entre as culturas, podemos observar no histograma da figura 9, que a população de células MSCs de doadores saudáveis, representada em cinza, e a população de células de pacientes com LMA, representado pela linha preta, não apresentam diferenças significativas. Observa-se a marcação positiva para CD90, CD73 e CD105, tanto para as MSCs de pacientes com LMA quanto para as de doadores saudáveis. Em relação aos marcadores CD45, CD34, CD14 e CD19, que são marcadores negativos de MSC, não observamos marcação em ambas as culturas.

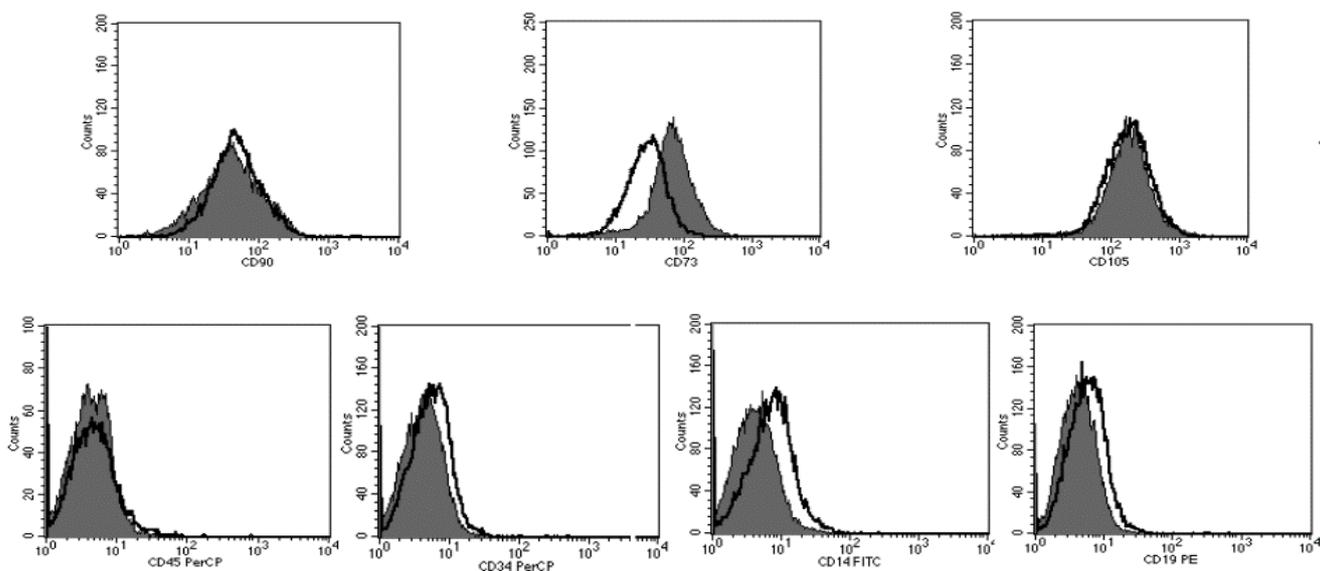


Figura 9: Confirmação do perfil imunofenótico das MSCs. Os histogramas mostram a expressão dos marcadores celulares CD90, CD76 e CD 105 e ausência de marcação para CD34, CD45, CD14 e CD19, conforme estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. A população de células MSC de doadores saudáveis está representada em cinza e, representado pela linha preta, a população de MSC dos pacientes com LMA.

5.1.3 Ensaios de diferenciação *in vitro* mostram que as MSCs em cultura obedecem ao terceiro critério mínimo da SITC.

As MSC são conhecidas por serem células multipotentes com potencial de diferenciação em adipócitos, osteoblastos e condrócitos quando estimuladas. Para avaliarmos se as culturas de MSC apresentavam esse potencial, foram realizadas induções de diferenciação adipogênica e osteogênica *in vitro* nas MSCs de pacientes com LMA e doadores saudáveis na passagem 3.

Para verificarmos a capacidade das MSCs em se diferenciar *in vitro* em adipócitos as culturas foram expostas ao meio indutor de diferenciação adipogênica por duas semanas. Como podemos observar na figura 10, as células diferenciadas foram coradas com Oil Red O, corante que evidencia a deposição de gotículas de gordura nas células. Nesse contexto, ambas as culturas de pacientes com LMA e de doadores saudáveis demonstraram preservar o potencial de diferenciação adipogênico determinado pela SITC e não foram observadas diferenças visuais entre as culturas.

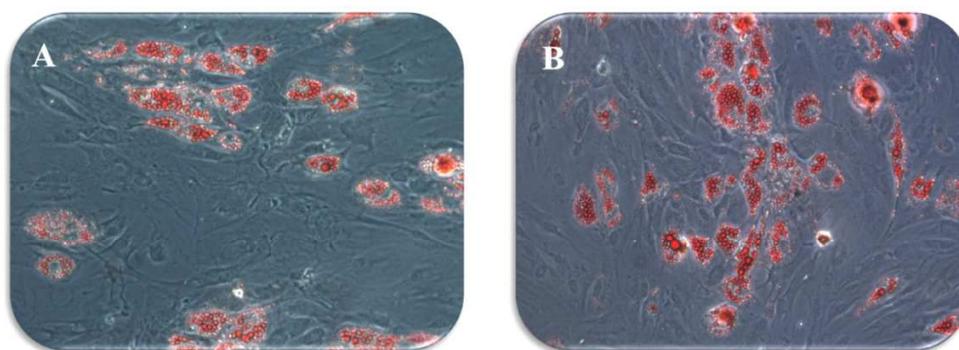


Figura 10: Diferenciação adipogênica das MSCs de pacientes com LMA (A) e de doadores saudáveis (B). A coloração com Oil Red O confirma a presença de gotículas de gordura nas células (aumento de 200x). Figura representativa de todas as culturas analisadas.

Para a diferenciação osteogênica, as culturas na passagem 3, tanto de MSC de pacientes com LMA quanto de doadores saudáveis foram mantidas em meio de indutor de diferenciação osteogênica por três semanas. A diferenciação osteogênica foi observada pela deposição de cálcio marcado com vermelho de Alizarina (figura 11).

Apesar de ambas as culturas de MSC apresentarem o potencial de diferenciação osteogênico estabelecido pela SITC, quando comparamos o potencial das MSCs de pacientes com LMA (figura 11A) com as de doadores saudáveis (figura 11B), observamos que a diferenciação das MSCs de pacientes com LMA foi visivelmente menor, indicando uma redução no potencial osteogênico.

Mesmo apresentando uma diminuição no potencial de diferenciação osteogênico, as MSCs de pacientes com LMA assim como as de doadores saudáveis obedecem ao terceiro critério mínimo da SITC.

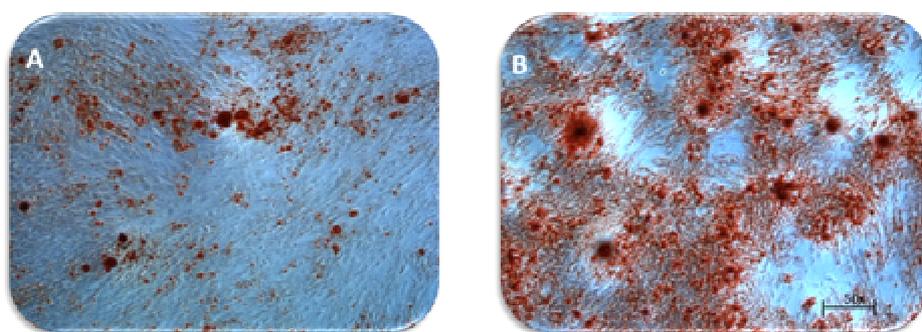


Figura 11: Diferenciação osteogênica das MSCs de pacientes com LMA (A) e doadores saudáveis(B). A diferenciação das culturas é observada pela deposição de cálcio marcado com vermelho de Alizarina (aumento 50x). Figura representativa de todas as culturas analisadas.

5.2 O perfil de proliferação celular é conservado entre as culturas de MSCs de pacientes com LMA e as de MSCs de doadores saudáveis.

As MSCs no microambiente medular apresentam um importante papel de suporte da hematopoiese. Isso ocorre devido ao contato célula-célula entre as MSCs e as CTHs através de uma interação bidirecional que desencadeia diversas vias de sinalização (Blau, 2014;Zhang et al., 2003). Dessa forma, um dos papéis das MSCs é controlar a proliferação das CTHs. Sabe-se que para o desenvolvimento da LMA é preciso que ocorra alterações em fatores de crescimento mitogênicos que irão garantir uma vantagem proliferativa em relação as células normais (Warner et al., 2004). Além disso, já foi demonstrado que as CTLs interagem com as MSCs e essa interação é essencial para a manutenção da

leucemia e progressão da doença (Blau, 2014). Assim, a fim de observar se em cultura as MSCs apresentavam alguma alteração no perfil de proliferação, realizamos o ensaio de WST-1 e comparamos os perfis de proliferação dessas células de pacientes com LMA com o perfil de proliferação dos doadores saudáveis. Sabendo-se que as MSCs de doadores, quando plaqueadas com 2.000 células/cm², chegam à confluência de 90% em uma semana e duplicam em aproximadamente 48h (Binato et al., 2013), realizamos os ensaios de proliferação nos dias 2,4 e 6, em culturas na passagem 3. Como podemos verificar nos resultados encontrados na figura 12, não foram observadas diferenças significativas entre as MSCs em nenhum dos dias avaliados, mostrando que, em cultura, as MSCs de pacientes com LMA não apresentam alteração na proliferação celular quando comparadas com as MSCs de doadores saudáveis.

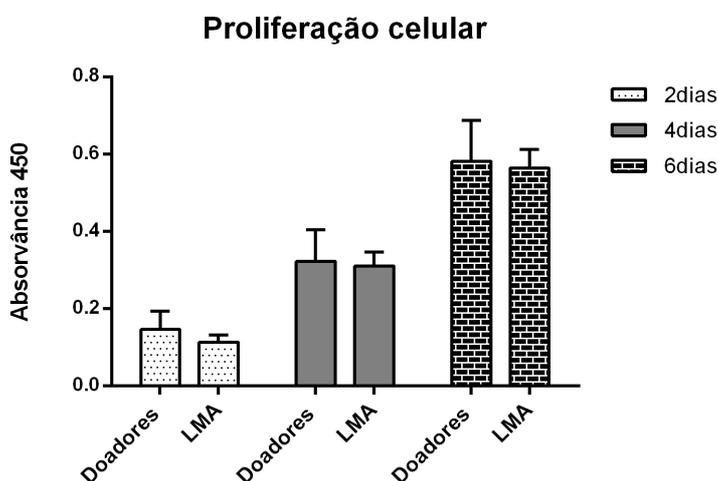


Figura 12: Perfil de proliferação celular usando o ensaio de WST-1. A proliferação celular das MSCs de pacientes com LMA e de doadores saudáveis foram comparadas nos dias 2, 4 e 6 após o repique para a passagem 3. Não foram observadas diferenças significativas de proliferação entre as culturas em todos os dias analisados. As barras indicam as medias das absorvâncias dos cinco pacientes e cinco doadores analisados.

5.3 Manutenção do perfil de Ciclo Celular entre as MSCs de pacientes com LMA e de doadores saudáveis

Apesar de não termos observado diferenças na taxa proliferativa das culturas estudadas, nos questionamos se não existiria alguma diferença no ciclo celular dessas células. Para verificarmos se houve ou não uma parada no ciclo celular das MSCs de pacientes com LMA, realizamos ensaio de Ciclo Celular

utilizando citometria de fluxo e marcação com Iodeto de Propídeo (IP). Para isso, realizamos a sincronização das culturas com privação de soro fetal bovino e, posteriormente, medimos o conteúdo de DNA das MSCs utilizando IP. O iodeto de propídeo é um fluorocromo que se liga ao DNA, de maneira que a quantidade de fluorescência é diretamente proporcional à quantidade de DNA de cada célula. Assim as células podem ser separadas pelas fases do ciclo, sendo a fase G0/G1 aquela que não apresenta o DNA replicado, a fase S sendo uma fase de conteúdo intermediário de DNA e a fase G2/M a que apresenta o DNA totalmente replicado, ou seja, o dobro da quantidade de DNA da fase G0/G1. Dessa forma, foi possível avaliar como essas células progrediram ao longo do ciclo. Os resultados apresentados na figura 13 mostram que as MSCs de pacientes com LMA não apresentaram diferenças significativas no ciclo celular quando comparadas com as de doadores saudáveis. A porcentagem de células encontradas em G0/G1 foi de 81,5% nas MSCs de pacientes com LMA e 80,6% nas MSCs de doadores saudáveis. Nas MSCs de pacientes com LMA, 4,8% encontravam-se na fase S assim como 7,4% das MSCs de doadores saudáveis encontravam-se na mesma fase. Já na fase G2/M tínhamos 13,2% das MSCs de pacientes e 12,5% das MSCs de doadores (figura 13).

Com esses resultados, juntamente com os resultados obtidos no ensaio de proliferação, podemos considerar que o perfil de proliferação e o ciclo celular das MSC de pacientes com LMA, em cultura, não estão alterados.

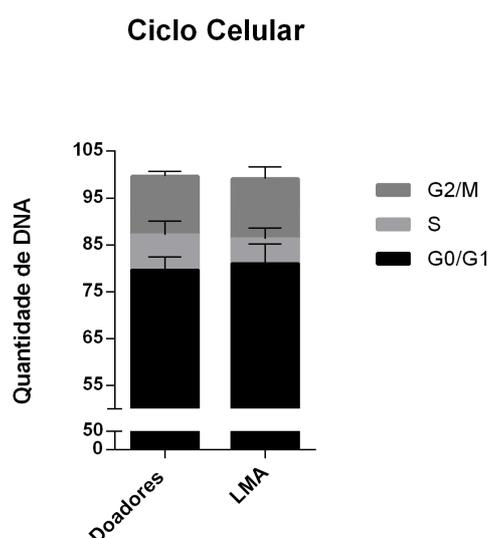


Figura 13: Perfil do ciclo celular por citometria de fluxo. Não é possível observar diferenças significativas entre as fases do ciclo celular quando comparamos as MSCs de pacientes com LMA

com as de doadores saudáveis. As barras representam a média dos cinco pacientes e cinco doadores analisados

5.4 Análise molecular das culturas de MSCs

5.4.1 Análise da Expressão Gênica Diferencial sugere uma assinatura molecular característica das MSCs de LMA.

O conhecimento sobre os genes e a identificação de suas funções tornou-se fundamental para a compreensão de processos biológicos. Nesse sentido, determinar alterações nos perfis de expressão gênica podem fornecer informações importantes para o entendimento dos complexos sistemas regulatórios além de permitir a identificação dos genes relevantes para determinados processos biológicos funcionais ou doenças.

Como a metodologia de microarranjos, como o chiparray, tornou possível o estudo de expressão gênica em larga escala, permitindo analisar o perfil de expressão de milhares genes ao mesmo tempo. As identificações de genes diferencialmente expressos podem estar direta ou indiretamente relacionadas com a etiologia da doença.

Como não observamos diferenças em relação à proliferação nas culturas de MSCs analisadas, nos perguntamos se poderia existir alguma diferença na expressão gênica entre essas células. Portanto, para avaliarmos a diferença de expressão gênica global entre as MSCs de pacientes com LMA e MSC de doadores saudáveis, realizamos o ensaio de ChipArray.

Para a realização desse ensaio, utilizamos 7 amostras de MSC de pacientes com LMA, sendo três provenientes de pacientes com LMA subtipo M1/M2, uma de paciente com LMA subtipo M2, duas de pacientes com subtipo M3 e uma de pacientes com LMA subtipo M4/M5, e comparamos com dois pools de doadores saudáveis.

Como ponto de corte, selecionamos os genes diferencialmente expressos com expressão diferencial de no mínimo 2 vezes para mais ou para menos. Assim, determinamos os genes aumentados e diminuídos na comparação. Em nossos resultados, encontramos 55 genes diferencialmente expressos sendo que 11 desses genes foram encontrados aumentados nas MSCs de pacientes com LMA e 44 diminuídos quando comparados com as MSCs de doadores saudáveis. A lista

dos genes diferencialmente expressos encontra-se na tabela 5. Quando esses resultados foram dispostos em *cluster*, utilizando programa Partek, fica evidente a separação entre as amostras analisadas (figura14), sugerido a existência de uma assinatura molecular comum a todas as MSCs de pacientes com LMA quando comparadas com a de doadores saudáveis.

Tabela 5: Genes diferencialmente expressos encontrados nas MSC de pacientes com LMA quando comparados com doadores saudáveis.

Gene Symbol	Gene_assignment	Fold-Change	AML vs. POOL DONORS
NLGN4Y	NR_028319 // NLGN4Y // neuroligin 4, Y-linked // Yq11.221 // 22829 /// NM_001164	5,55	AML up vs POOL DONORS
SPON2	NM_012445 // SPON2 // spondin 2, extracellular matrix protein // 4p16.3 // 10417	2,62	AML up vs POOL DONORS
UIMC1	AF284753 // UIMC1 // ubiquitin interaction motif containing 1 // 5q35.2 // 51720	2,47	AML up vs POOL DONORS
MUC12	NM_001164462 // MUC12 // mucin 12, cell surface associated // 7q22 // 10071 ///	2,42	AML up vs POOL DONORS
CCL2	NM_002982 // CCL2 // chemokine (C-C motif) ligand 2 // 17q11.2-q12 // 6347 /// E	2,31	AML up vs POOL DONORS
RASD1	NM_016084 // RASD1 // RAS, dexamethasone-induced 1 // 17p11.2 // 51655 /// ENST0	2,23	AML up vs POOL DONORS
LGALS3BP	NM_005567 // LGALS3BP // lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein	2,08	AML up vs POOL DONORS
LOC151009	AK095678 // LOC151009 // hypothetical LOC151009 // 2q13 // 151009 /// AK056084 /	2,06	AML up vs POOL DONORS
RUNDC2C	NR_002939 // RUNDC2C // RUN domain containing 2C // 16p11.2 // 440352 /// ENST00	2,04	AML up vs POOL DONORS
TP53I11	NM_001076787 // TP53I11 // tumor protein p53 inducible protein 11 // 11p11.2 //	2,02	AML up vs POOL DONORS
C6orf138	NM_207499 // C6orf138 // chromosome 6 open reading frame 138 // 6p12.3 // 442213	2,01	AML up vs POOL DONORS
EZR	NM_003379 // EZR // ezrin // 6q25.3 // 7430 /// NM_00111077 // EZR // ezrin //	-2,02	AML down vs POOL DONORS
SH3BGR	NM_007341 // SH3BGR // SH3 domain binding glutamic acid-rich protein // 21q22.3	-2,02	AML down vs POOL DONORS
RDH10	NM_172037 // RDH10 // retinol dehydrogenase 10 (all-trans) // 8q21.11 // 157506	-2,03	AML down vs POOL DONORS
IRF6	NM_006147 // IRF6 // interferon regulatory factor 6 // 1q32.3-q41 // 3664 /// EN	-2,05	AML down vs POOL DONORS
FRY	NM_023037 // FRY // furry homolog (Drosophila) // 13q13.1 // 10129 /// ENST00000	-2,05	AML down vs POOL DONORS
RAP1GDS1	NM_001100426 // RAP1GDS1 // RAP1, GTP-GDP dissociation stimulator 1 // 4q23-q25	-2,09	AML down vs POOL DONORS
PGM5P2	NR_002836 // PGM5P2 // phosphoglucosylase 5 pseudogene 2 // 9q12 // 595135 /// N	-2,11	AML down vs POOL DONORS
MEGF9	NM_001080497 // MEGF9 // multiple EGF-like domains 9 // 9q32-q33.3 // 1955 /// E	-2,11	AML down vs POOL DONORS
CYFIP2	NM_001037332 // CYFIP2 // cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 // 5q33.3 // 26	-2,11	AML down vs POOL DONORS
NT5DC3	NM_001031701 // NT5DC3 // 5'-nucleotidase domain containing 3 // 12q22-q23.1 //	-2,11	AML down vs POOL DONORS
NCAM1	NM_181351 // NCAM1 // neural cell adhesion molecule 1 // 11q23.1 // 4684 /// NM_	-2,17	AML down vs POOL DONORS
ELN	NM_000501 // ELN // elastin // 7q11.23 // 2006 /// NM_001081754 // ELN // elasti	-2,18	AML down vs POOL DONORS
MMP16	ENST00000286614 // MMP16 // matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted) // 8q	-2,25	AML down vs POOL DONORS
SDC2	NM_002998 // SDC2 // syndecan 2 // 8q22-q23 // 6383 /// ENST00000302190 // SDC2	-2,26	AML down vs POOL DONORS
CPA4	NM_016352 // CPA4 // carboxypeptidase A4 // 7q32 // 51200 /// NM_001163446 // CP	-2,28	AML down vs POOL DONORS
CD9	NM_001769 // CD9 // CD9 molecule // 12p13.3 // 928 /// ENST00000382518 // CD9 //	-2,30	AML down vs POOL DONORS
DAPK1	NM_004938 // DAPK1 // death-associated protein kinase 1 // 9q34.1 // 1612 /// EN	-2,32	AML down vs POOL DONORS
SLC22A15	NM_018420 // SLC22A15 // solute carrier family 22, member 15 // 1p13.1 // 55356	-2,33	AML down vs POOL DONORS
HAUS6	NM_017645 // HAUS6 // HAUS augmin-like complex, subunit 6 // 9p22.1 // 54801 ///	-2,40	AML down vs POOL DONORS
BMP4	NM_001202 // BMP4 // bone morphogenetic protein 4 // 14q22-q23 // 652 /// NM_130	-2,50	AML down vs POOL DONORS
JAKMIP2	NM_014790 // JAKMIP2 // janus kinase and microtubule interacting protein 2 // 5q	-2,59	AML down vs POOL DONORS
NOV	NM_002514 // NOV // nephroblastoma overexpressed gene // 8q24.1 // 4856 /// ENST	-2,61	AML down vs POOL DONORS
ANOS5	NM_213599 // ANOS5 // anoctamin 5 // 11p14.3 // 203859 /// NM_001142649 // ANOS5 /	-2,64	AML down vs POOL DONORS
SNCA	NM_000345 // SNCA // synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor) //	-2,66	AML down vs POOL DONORS
PRSS12	NM_003619 // PRSS12 // protease, serine, 12 (neurotrypsin, motopsin) // 4q28.1 //	-2,81	AML down vs POOL DONORS
CPE	NM_001873 // CPE // carboxypeptidase E // 4q32.3 // 1363 /// ENST00000402744 //	-2,82	AML down vs POOL DONORS
GALNT3	NM_004482 // GALNT3 // UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylga	-2,89	AML down vs POOL DONORS
SCN9A	NM_002977 // SCN9A // sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit // 2	-2,91	AML down vs POOL DONORS
IGF2BP3	NM_006547 // IGF2BP3 // insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 // 7	-2,94	AML down vs POOL DONORS
AHNAK2	NM_138420 // AHNAK2 // AHNAK nucleoprotein 2 // 14q32.33 // 113146 /// ENST00000	-3,06	AML down vs POOL DONORS
SCIN	NM_001112706 // SCIN // scinderin // 7p21.3 // 85477 /// NM_033128 // SCIN // sc	-3,25	AML down vs POOL DONORS
TM4SF20	NM_024795 // TM4SF20 // transmembrane 4 L six family member 20 // 2q36.3 // 7985	-3,27	AML down vs POOL DONORS
CLDN1	NM_021101 // CLDN1 // claudin 1 // 3q28-q29 // 9076 /// ENST00000295522 // CLDN1	-3,34	AML down vs POOL DONORS
DMKN	NM_001126056 // DMKN // dermatokine // 19q13.12 // 93099 /// NM_001190347 // DMKN	-3,41	AML down vs POOL DONORS
FRMD4B	NM_015123 // FRMD4B // FERM domain containing 4B // 3p14.1 // 23150 /// ENST00000	-3,43	AML down vs POOL DONORS
FBN2	NM_001999 // FBN2 // fibrillin 2 // 5q23-q31 // 2201 /// ENST00000262464 // FBN2	-3,52	AML down vs POOL DONORS
S100A4	NM_019554 // S100A4 // S100 calcium binding protein A4 // 1q21 // 6275 /// NM_00	-3,87	AML down vs POOL DONORS
CMKLR1	NM_001142343 // CMKLR1 // chemokine-like receptor 1 // 12q24.1 // 1240 /// NM_00	-4,07	AML down vs POOL DONORS
LPCAT2	NM_017839 // LPCAT2 // lysophosphatidylcholine acyltransferase 2 // 16q12.2 // 5	-4,41	AML down vs POOL DONORS
MAMDC2	NM_153267 // MAMDC2 // MAM domain containing 2 // 9q21.12 // 256691 /// ENST00000	-5,02	AML down vs POOL DONORS
FLG	NM_002016 // FLG // filaggrin // 1q21.3 // 2312 /// ENST00000368799 // FLG // fi	-5,33	AML down vs POOL DONORS
SPP1	NM_001040058 // SPP1 // secreted phosphoprotein 1 // 4q22.1 // 6696 /// NM_00058	-5,95	AML down vs POOL DONORS
C20orf103	NM_012261 // C20orf103 // chromosome 20 open reading frame 103 // 20p12 // 24141	-6,11	AML down vs POOL DONORS
CD24	NM_013230 // CD24 // CD24 molecule // 6q21 // 100133941 /// BC064619 // CD24 //	-7,58	AML down vs POOL DONORS

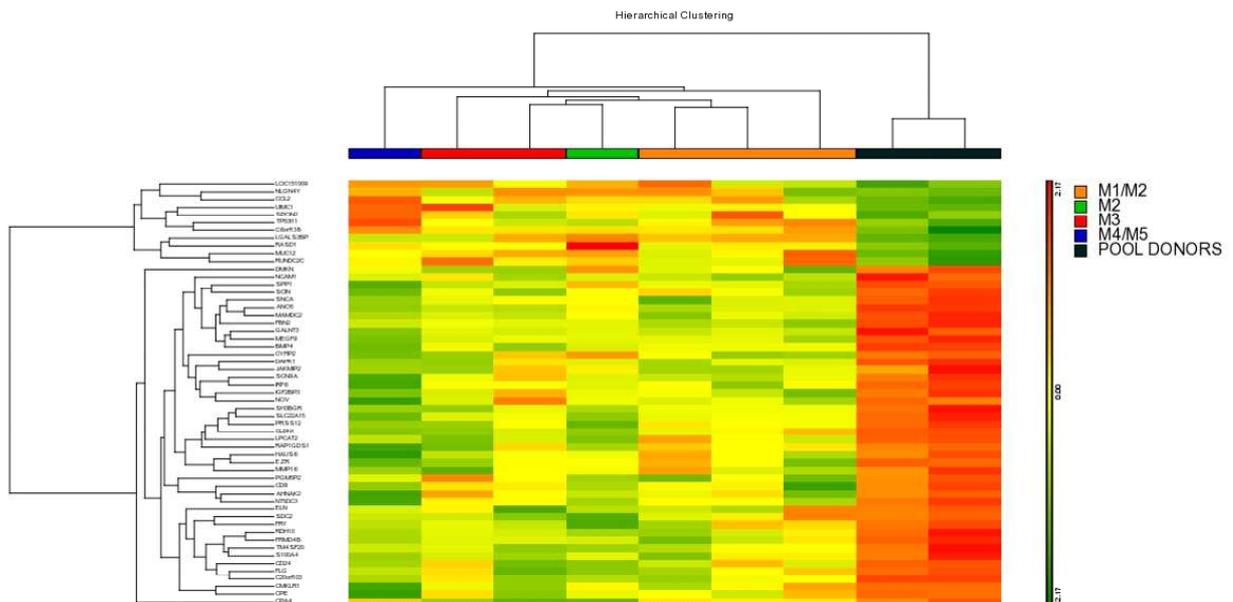


Figura 14: Apresentação na forma de *cluster* dos 55 genes diferencialmente expressos encontrados no ensaio de chiparray. Para esse ensaio foram utilizadas 7 amostras, sendo três provenientes de pacientes com LMA subtipo M1/M2, uma M2, duas M3 e uma M4/M5 e comparadas com dois pools de doadores saudáveis. Em vermelho os genes aumentando e em verde os diminuídos.

5.4.2 Confirmação dos resultados obtidos no ChipArray

5.4.2.1 Análise não supervisionada confirma os resultados obtidos no ChipArray

A fim de validarmos os resultados encontrados no primeiro ensaio de chiparray, onde encontramos 55 genes diferencialmente expressos quando comparamos culturas de MSCs de pacientes com LMA com a de doadores saudáveis, realizamos um novo ensaio de ChipArray com mais 3 amostras, sendo uma proveniente de paciente com LMA subtipo M3 e duas M4/M5. Posteriormente, juntamos os resultados deste novo ensaio com os outros e realizamos uma análise não supervisionada com base nos 55 genes previamente encontrados. Esta análise foi realizada no intuito de verificarmos se esses 55 genes encontrados eram capazes de separar as MSCs de pacientes das de doadores. Podemos observar na figura 14 que as MSCs de pacientes, com base nos 55 genes se agrupam em um cluster separado das MSCs de doadores saudáveis, corroborando com os

resultados obtidos no ChipArray. Esses resultados sugerem que a assinatura molecular encontrada é capaz de separar pacientes de doadores.

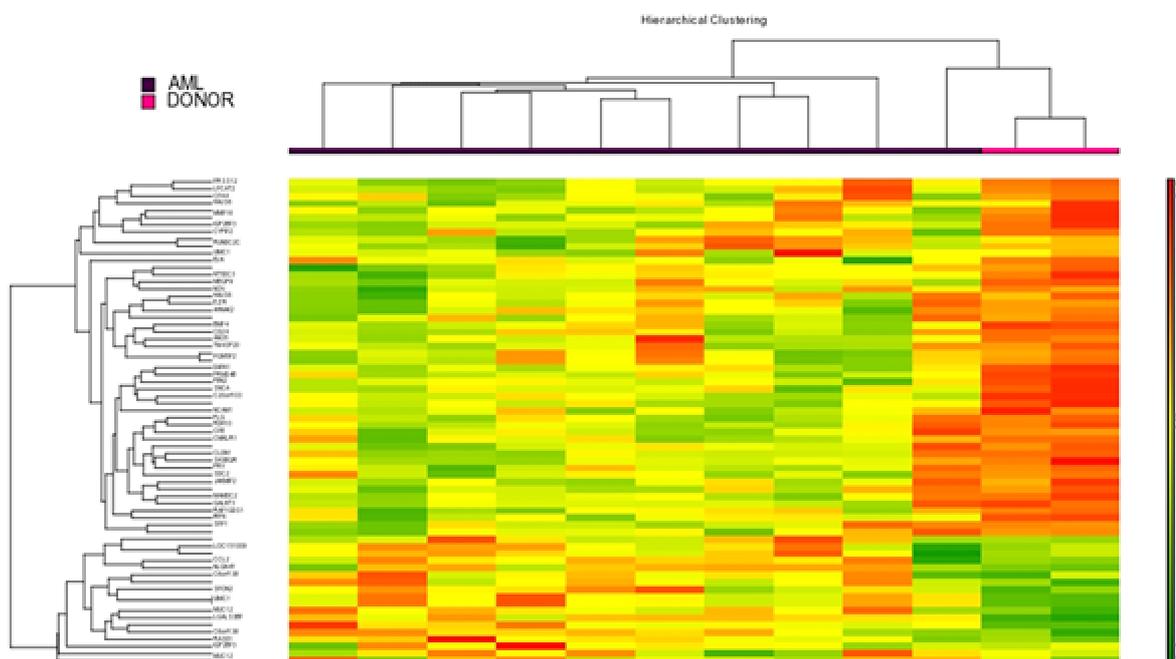


Figura 15: Análise não supervisionada com os 55 genes encontrados diferencialmente expressos no ensaio de chiparray. Podemos observar que as amostras se agrupam em *clusters* que separam as MSC de pacientes com LMA de doadores saudáveis.

5.4.2.2 Ensaio de RT-qPCR confirmam a assinatura molecular capaz de separar MSCs de pacientes com LMA das de doadores saudáveis.

Outra maneira de validarmos os resultados do ensaio de ChipArray foi através da técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR). Neste caso, selecionamos alguns genes encontrados diferencialmente expressos para a confirmação. Os genes escolhidos foram *Ccl2* e *Spond2*, encontrados aumentados e *Mmp16*, *Bmp4*, *Cldn1* e *Opn*, encontrados diminuídos nas MSCs de pacientes com LMA. Os genes *Ccl2* e *Mmp16* foram escolhidos para confirmação pois já haviam sido descritos na literatura como genes relacionados com o microambiente medular ou com LMA (Ayala *et al.*, 2009; Civini *et al.*, 2013). *Bmp4* e *Opn* foram selecionados por apresentarem importantes funções para o desenvolvimento e manutenção das CTHs (Zang & Li, 2005; Stier *et al.*, 2005) e *Spond2* e *Cldn1* foram escolhidos por já

terem apresentado alguma relação com o desenvolvimento de neoplasias (Qian *et al.*, 2012; Kwon 2013).

Para a realização do RT-qPCR, utilizamos uma gama maior de amostras sendo 19 de MSC de pacientes com LMA e 13 de doadores saudáveis.

Os resultados encontrados na figura 16A indicam que os níveis de mRNA de *Spond2* estão aumentados três vezes nas MSCs de pacientes com LMA quando comparados com doadores saudáveis. Este aumento, além de ser estatisticamente significativo confirma os resultados encontrados no ensaio de Chiparray. Ainda não se sabe ao certo o papel da *Spond2* no contexto hematopoiético, entretanto, o aumento da expressão de *Spond2* tem sido descrito em diversos tipos de câncer. (Qian *et al.*, 2012).

Os níveis de transcritos de *Ccl2* (figura 16B) estavam aproximadamente duas vezes aumentados nas MSCs de pacientes com LMA, contudo, apesar do resultado estar de acordo com o encontrado no chiparray, esse resultado não apresentou estatística significativa. CCL2 é uma citocina pro-inflamatória e seu aumento está relacionado com a resposta das MSCs a presença dos blastos leucêmicos (Civini *et al.*, 2013).

Na figura 16C podemos observar que os níveis de mRNA de *Bmp4* estão diminuídos em aproximadamente duas vezes nas MSCs de pacientes com LMA, sendo estatisticamente significativo e confirmando o ensaio de chiparray. A via de sinalização de *Bmp4* tem sido descrita como uma importante via na regulação da proliferação das CTHs. Assim, a baixa expressão de *Bmp4* pode estar contribuindo para o aumento da proliferação dos blastos leucêmicos (Zhang & Li, 2005).

Analisamos os níveis de mRNA de *Mmp16* e como pode ser observado na figura 16D, a expressão de *Mmp16* condiz com o resultado encontrando no chiparray, onde os níveis de mRNA de *Mmp16* encontram-se reduzidos pela metade nas MSCs de pacientes com LMA. Contudo, para esse gene, não observamos diferenças estatisticamente significativas. As metaloproteinases de matriz (MMP) estão envolvidas na regulação da progressão tumoral e são produzidas tanto pelas células estromais da medula quanto pelas células leucêmicas. Expressões anormais de MMPs têm sido descritas na LMA quando comparados com amostras de medula normal (Ayala *et al.*, 2009).

Os níveis de mRNA de *Opn* também foram avaliados, como pode ser observado na figura 16E. Os resultados mostram que a expressão de *Opn* foi

reduzida pela metade nas MSCs de pacientes com LMA, apresentando estatística significativa e confirmando o chiparray. OPN é um importante regulador negativo da proliferação das CTHs, logo sua ausência favorece o crescimento dessas células (Stier *et al.*,2005).

Outro gene escolhido para a validação foi o *Cldn1* (figura 16F). Os níveis de mRNA de *Cldn1* encontram-se reduzidos significativamente nas MSCs de pacientes com LMA. Esse resultado também corrobora com o encontrado no ensaio de chiparray. As claudinas são proteínas transmembranares importantes componentes das junções oclusivas. Alterações na expressão de diversas claudinas, em particular da claudina-1 tem sido associado ao desenvolvimento de diversos tipos de câncer (Kwon, 2013).

Em resumo, todos os resultados encontrados utilizando o RT-qPCR, confirmaram não só o ensaio de chiparray, como também a existência de uma assinatura molecular para as MSCs de pacientes com LMA quando comparadas com as de doadores saudáveis.

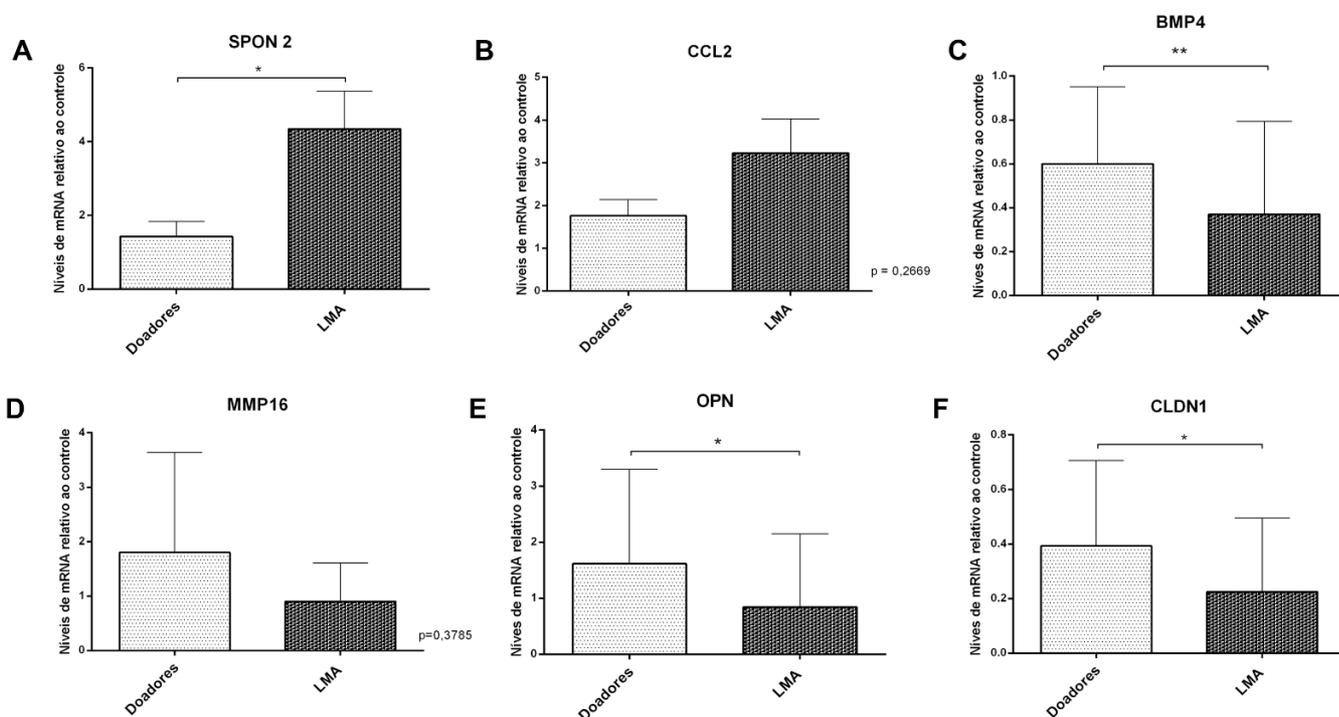


Figura 16: RT-qPCR na validação do Chiparray. Foi extraído RNA total de 19 culturas de MSC de pacientes com LMA e 13 doadores saudáveis. Utilizamos o ensaio de RT-qPCR para determinar as diferenças de expressão gênica depois de normalizados por *B2m* e *Gapdh*. A análise de RT-qPCR

para (A) *Spond2* e (B) *Ccl2* (aumentados em MSC de pacientes com LMA) e (C) *Bmp4* (D) *Mmp16* (E) *Opn* e (F) *Cldn1* (diminuídos em MSC de pacientes com LMA) confirmam o ensaio de ChipArray e a assinatura molecular comum em pacientes com LMA. As barras indicam as medias nos níveis de mRNA (+- desvio padrão). * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$.

A fim de verificarmos se a diferença de expressão gênica encontrada é realmente comum a todos os subtipos de LMA, analisamos os resultados do RT-qPCR por subtipo. Separamos os pacientes pelos subtipos M1, M1/M2, M2, M3 e M4/M5 e as análises foram realizadas apenas com os genes cuja diferença encontrada foi estatisticamente significativa.

Os resultados apresentados na figura 17 mostram que os níveis de mRNA para o gene *Spond2* apresentaram aumentados nas MSCs de pacientes com LMA quando comparados com as de doadores saudáveis em todos os subtipos (figura17). Entretanto, apenas o resultado para o subtipo M4/M5 (figura17D) apresentou estatística significativa. Isso pode ser devido ao número reduzido de MSCs de pacientes quando separados por subtipo.

Como encontrado na figura 16C, os níveis de mRNA de *Bmp4* das MSC de pacientes com LMA também estavam reduzidos quando separamos por subtipos (figura 18). Neste caso, o subtipo M2 (figura 18C) foi o único que não apresentou diferença estatística significativa.

Os resultados para o gene *Cldn1* podem ser observados na figura 19. Como podemos verificar, há uma redução de expressão de *Cldn1* quando as MSCs foram separadas por subtipos. Contudo, somente os subtipos M1/M2 (figura 19C) e M4/M5 (figura 19E) apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Os níveis de *Opn* também foram separados por subtipo de LMA. Como podemos observar na figura 20 houve uma diminuição dos níveis de mRNA de *Opn* nos diversos subtipos, sendo os subtipos M1 e M4/M5 aqueles que apresentaram diferenças estatística significativas (figuras 20A e 20E).

Como podemos observar, quando separamos as análises por subtipos de LMA, alguns genes não apresentaram diferenças estatísticas. Isso pode ser devido ao número reduzido de pacientes quando separamos por subtipo ou a uma não homogeneidade de expressão, que é justificável, uma vez que estamos trabalhando com pacientes. De qualquer forma, mesmo separando as análises dos

genes diferencialmente expressos por subtipos de LMA, nossos resultados corroboram com os encontrados no ensaio de chiparray.

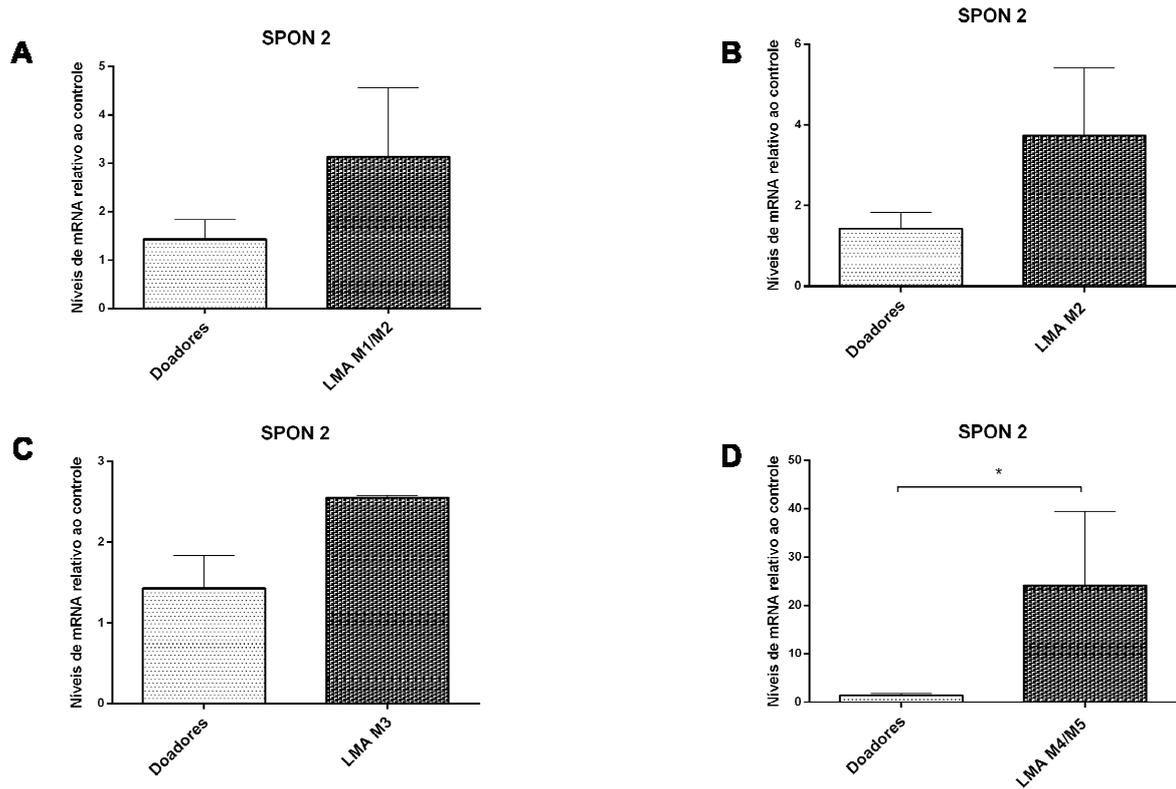


Figura 17: RT-qPCR do gene *Spond2* separado pelos subtipos de LMA. Comparação entre níveis de mRNA de *Spond2* entre doadores saudáveis e os subtipos depois de normalizados por *B2m* e *Gapdh*. (A) LMA subtipo M1/M2; (B) LMA subtipo M2; (C) LMA subtipo M3; (D) LMA subtipo M4/M5. As barras representam as médias dos níveis de mRNA (+/- desvio padrão) do gene *Spond2*. * $p < 0,05$.

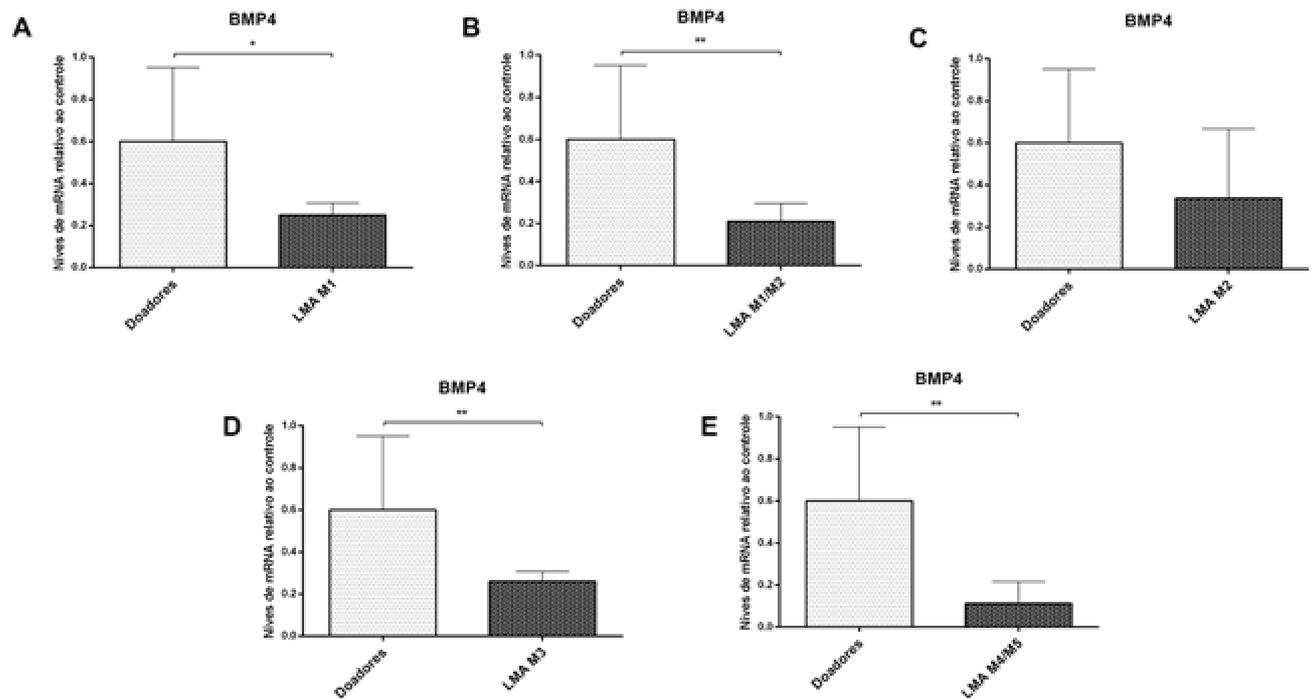


Figura 18: Avaliação dos níveis de mRNA de *Bmp4* por PCR em tempo real de acordo com os subtipos de LMA. A expressão diminuída de *Bmp4* nas MSC de pacientes com LMA quando comparada com a de doadores permanece diminuída quando separamos por subtipos (A) LMA subtipo M1; (B) LMA subtipo M1/M2; (C) LMA subtipo M2; (D) LMA subtipo M3; (E) LMA subtipo M4/M5. As barras representam a média de expressão do gene *Bmp4*. * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$.

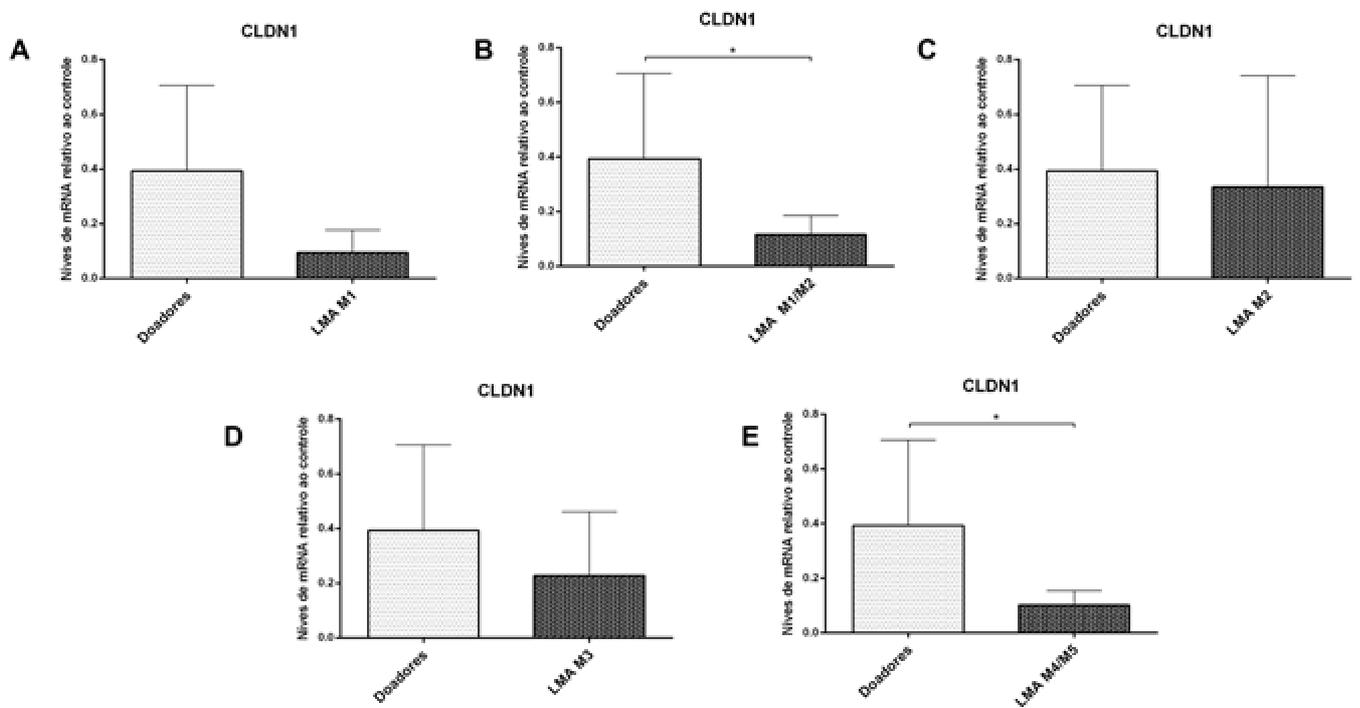


Figura 19: Comparação dos níveis de mRNA de *Cldn1* entre as MSC de doadores saudáveis e de pacientes com LMA de acordo com cada subtipo. Os níveis de mRNA de *Cldn1* permanecem reduzidos nos subtipos(A) LMA subtipo M1; (B) LMA subtipo M1/M2; (C) LMA subtipo M2; (D) LMA subtipo M3; (E) LMA subtipo M4/M5. As barras representam os níveis de mRNA (+-desvio padrão) de *Cldn1*. * $p < 0,05$

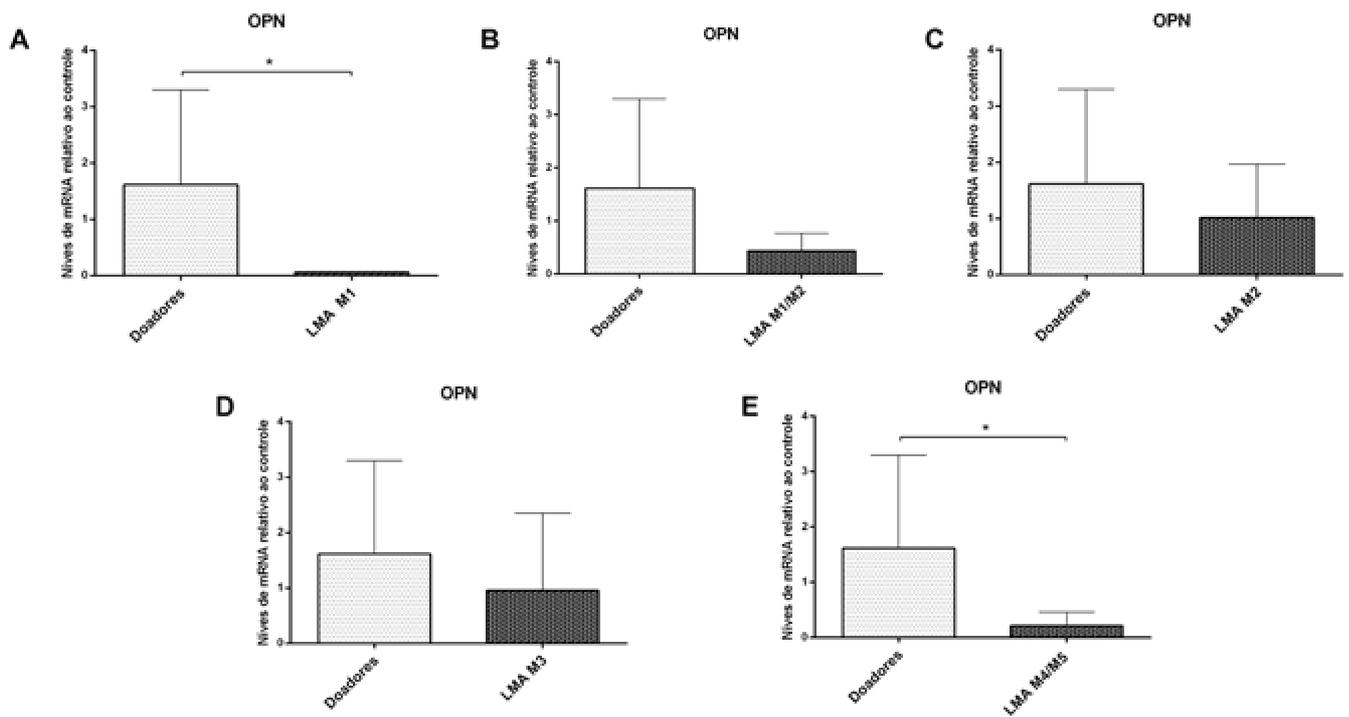


Figura 20: RT-qPCR do gene *Opn* separado pelos subtipos de LMA. Comparação dos níveis de mRNA de *Opn* entre doadores saudáveis e os subtipos (A) LMA subtipo M1; (B) LMA subtipo M1/M2; (C) LMA subtipo M2; (D) LMA subtipo M3; (E) LMA subtipo M4/M5. As barras representam a média dos níveis de mRNA (+/- desvio padrão) de *Opn*. * $p < 0,05$

5.5 As vias de sinalização de osteopontina e de WNT estão relacionadas com os genes diferencialmente expressos encontrados na comparação entre as MSC de pacientes com LMA e as de doadores saudáveis

A regulação gênica determina os diversos processos do organismo, desde a duplicação da célula até a sua morte programada. Esses processos são coordenados por vias de sinalização nas quais diversos genes estão inseridos. Dessa forma, torna-se importante o estudo das vias de sinalização, uma vez que nos ajuda a entender a regulação do processo e nos permite a busca de alvos para futuras terapias.

No intuito de verificar em quais vias de sinalização os genes diferencialmente expressos encontrados no chiparray estavam inseridos, realizamos uma análise *in silico* utilizando o software Metacore™. Os resultados dessas análises mostraram que os genes encontrados diferencialmente expressos estão inseridos em diversas vias, sendo a via de osteopontina (figura 21) e a via de diferenciação de Wnt (figura 22) as abordadas nesse trabalho. A via de osteopontina sinalizando em osteoclastos (figura 21)

é uma via importante para a manutenção das CTHs. A osteopontina atua na regulação do número de CTHs no nicho hemapoietico, como descrito por Stier e colaboradores (Stier et al., 2005), além de ser um importante fator na ativação dos osteoclastos. Para um perfeito funcionamento da medula óssea é preciso que ocorra um balanço entre o número de osteoclastos e osteoblastos, uma vez que esses são responsáveis pela formação e reabsorção da medula. Já a via de WNT (figura 22) é uma importante via relacionada com a diferenciação das CTHs. BMP4 é uma proteína secretada para o microambiente medular e uma baixa expressão de *Bmp4* pode implicar no não funcionamento normal das CTHs (Godman et al., 2009).

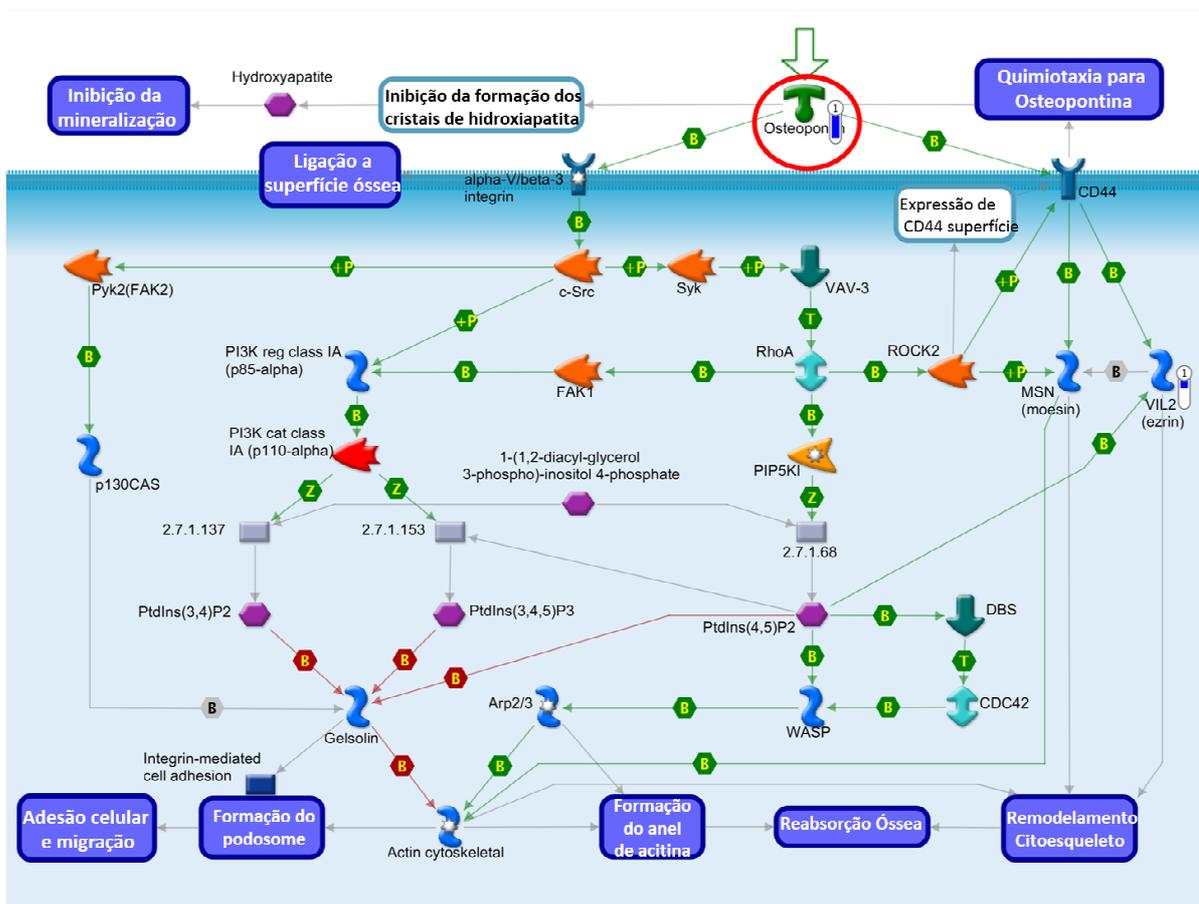


Figura 21: Via de sinalização de Osteopontina na diferenciação de osteoclastos. Os genes encontrados no ensaio de chiparray estão representados com um termômetro ao lado onde a cor azul indica os genes diminuídos nas MSCs de pacientes com LMA quando comparadas com as de doadores saudáveis.

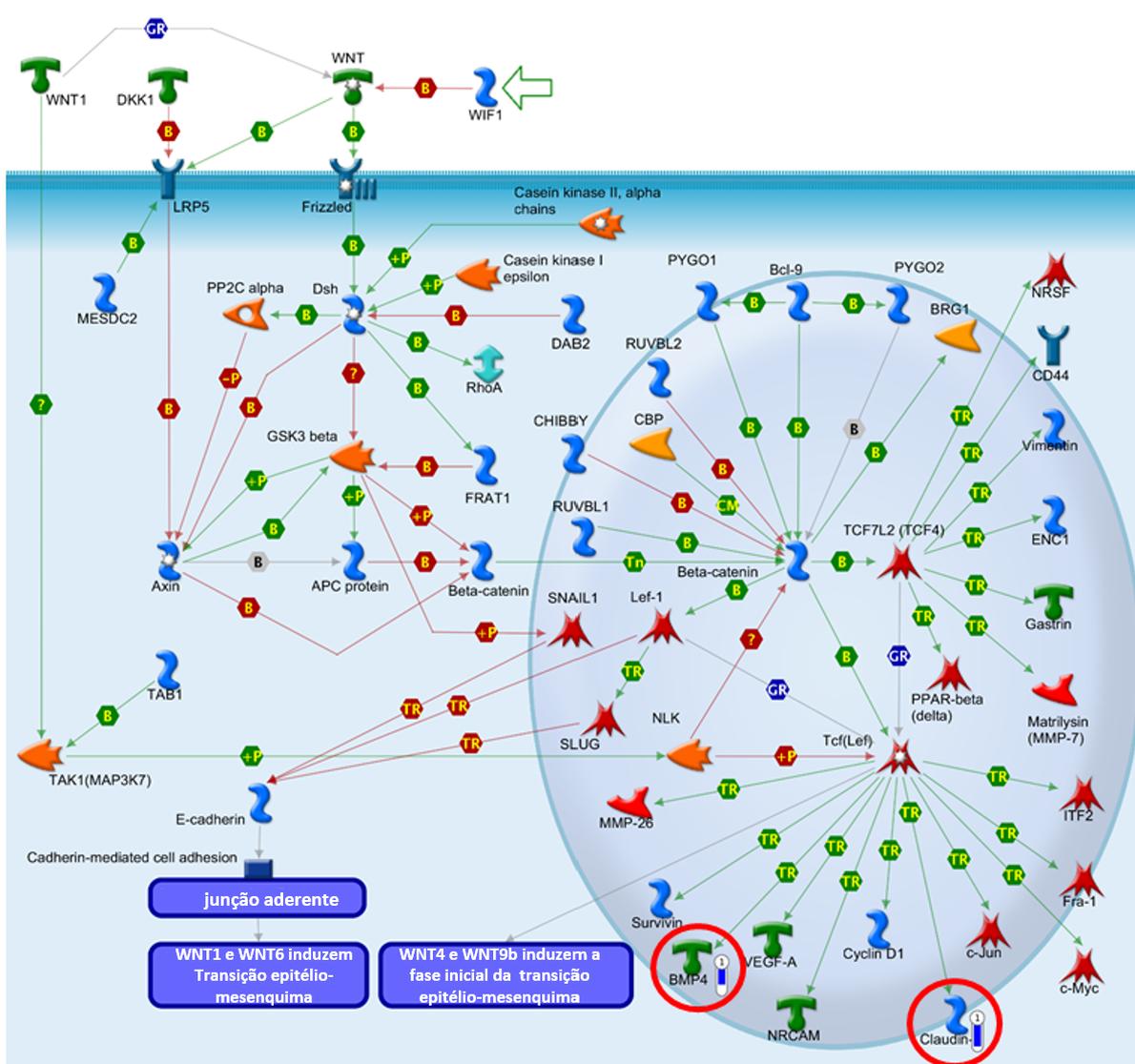


Figura 22: Via de sinalização de Wnt encontrada na análise *in silico*. Os genes encontrados no ensaio de chiparray estão representados com um termômetro ao lado de cor azul indicando diminuição de expressão nas MSCs de pacientes com LMA quando comparadas com as de doadores saudáveis.

5.5 As concentrações das proteínas CCL2, BMP4 e OPN estão alteradas no plasma de pacientes com LMA.

A diferença de expressão gênica muitas vezes não é refletida ao nível proteico. Entretanto, é através da expressão das proteínas que os genes irão realizar as diversas funções celulares. No contexto medular, inúmeras proteínas são secretadas pelas células estromais da medula e atuam no nicho hematopoético e nas CTHs, realizando as mais diversas funções, desde o controle

da proliferação até a morte celular. Dentre os 55 genes diferencialmente expressos encontrados em nosso estudo, os genes *Ccl2*, *Bmp4* e *Opn*, chamaram a atenção, pois dão origem a proteínas que são secretadas para o microambiente medular. Além disso, essas proteínas estão diretamente relacionadas com a homeostase do sistema hematopoiético.

A fim de verificarmos se as diferenças de expressão de mRNA encontradas tanto no ChipArray quanto no RT-qPCR também refletiam na expressão proteica, dosamos a concentração das proteínas CCL2, BMP4 e OPN no plasma através de ensaios de Elisa. Nesses ensaios, utilizamos 29 amostras de plasma de pacientes com LMA, sendo quatro provenientes de pacientes com LMA inclassificável, uma do subtipo M0, três M1, três M1/M2, oito M2, cinco M3 e cinco M4/M5 e comparamos com o plasma de 11 doadores saudáveis. Os resultados encontrados na figura 22 confirmam o aumento da expressão proteica de CCL2 (figura 23A) e a diminuição de BMP4 (figura 23B) no plasma dos pacientes com LMA. Entretanto, em relação aos níveis de OPN não observamos diferenças na concentração desta proteína no plasma (figura 23C).

Em resumo, todos esses resultados encontrados sugerem que além de encontrarmos uma assinatura molecular para as MSCs de pacientes com LMA, a sinalização realizada pelas MSCs de pacientes com LMA é diferente das MSCs de doadores saudáveis.

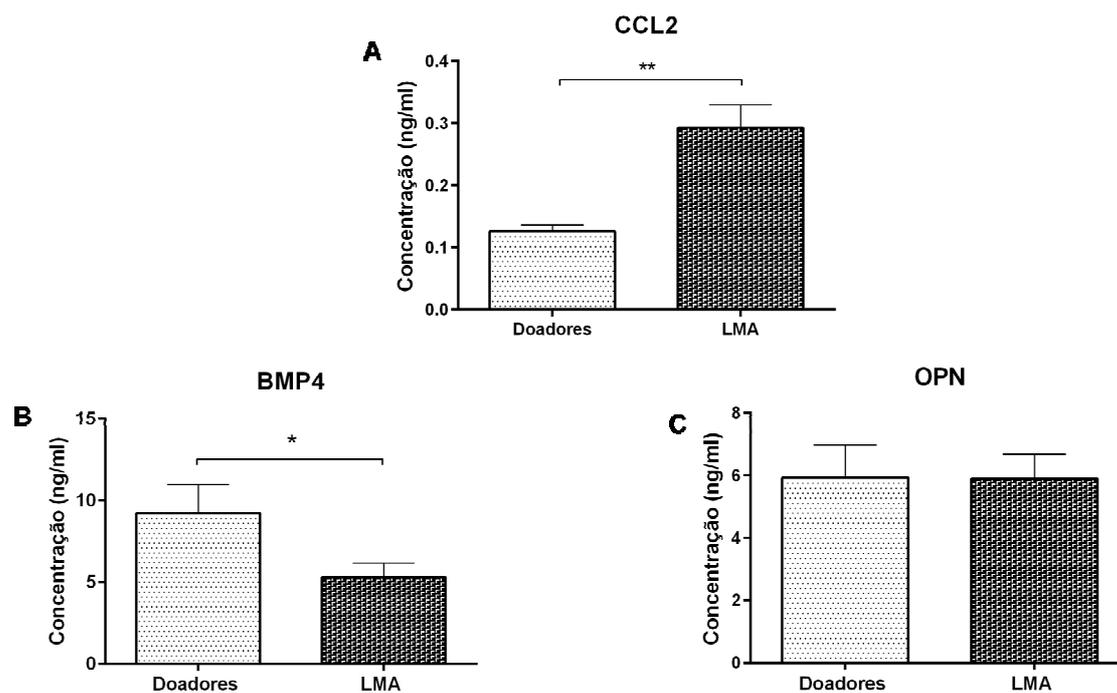


Figura 23: Ensaio de ELISA para verificar se as proteínas secretadas CCL2, BMP4 E OPN apresentam-se diferencialmente expressas no plasma de pacientes com LMA quando comparado com doadores saudáveis. Os resultados confirmam o aumento de expressão da proteína CCL2 (A) e diminuição da expressão das proteínas BMP4. Entretanto, não observamos diferenças nos níveis de OPN nos pacientes com LMA. As barras representam as medias da concentração de CCL2, BMP4 e OPN (+- desvio padrão). * $p < 0,05$ / ** $p < 0,01$.

6. DISCUSSÃO

A Leucemia mieloide aguda é uma neoplasia que apresenta uma alta taxa de proliferação celular e uma não maturação dos progenitores hematopoiéticos. Essa parada de maturação pode ocorrer em diferentes etapas do processo de diferenciação (Estey and Dohner, 2006). Com isso, a LMA é considerada uma doença altamente complexa e heterogênea, onde cada paciente apresenta uma parada diferente na diferenciação do progenitor mieloide. Além disso, cada paciente pode apresentar ou não translocações cromossômicas e alterações genéticas distintas que podem ser associadas com um comportamento clínico e a um tratamento específico.

A heterogeneidade da LMA pode ser explicada por duas teorias, sendo uma a teoria estocástica ou da probabilidade e a outra a teoria da hierarquia, que é a que acreditamos ser a mais contundente. Nessa teoria, acredita-se que exista uma pequena população de células capaz de dar início ao tumor – as Células tronco leucêmicas. Essas células, além da capacidade de auto renovação, dariam origem a uma célula progenitora leucêmica e que, por consequência, daria origem às células leucêmicas. Essas células dariam origem a um clone com alterações no perfil de proliferação e essa proliferação exacerbada favoreceria o surgimento das diferentes alterações genéticas encontradas da LMA (Bonnet & Dick,1997; Dick,2008). Com isso, apesar da heterogeneidade encontrada na LMA, acredita-se que ela teve origem a partir de uma mesma célula – a Célula tronco leucêmica.

Os primeiros estudos demonstrando a importância do microambiente hematopoiético foram realizados com camundongos deficientes de PTEN (do inglês *phosphatase and tensin homolog*). Quando Yilmaz e colaboradores realizaram ensaio com células hematológicas e o microambiente deficiente de PTEN, o resultado foi o aparecimento de mielodisplasia com progressão para leucemia. Entretanto, quando realizaram o mesmo ensaio com apenas as células hematopoiéticas deficientes de PTEN e o microambiente normal, ocorria a redução do número de CTHS, no entanto, não era observado o desenvolvimento de mielodisplasia ou leucemia. Com esses achados, foi ficando mais evidente a importância da interação entre as células hematopoiéticas e o microambiente e indicando que para o surgimento da leucemia era necessário que o microambiente também fosse alterado (Yilmaz et al., 2006)

Vários estudos vêm descrevendo a importância do microambiente hematopoiético para a leucemia, seja no favorecimento da proliferação e/ou sobrevivência dos blastos leucêmicos, ou na resistência a terapia. Konopleva e colaboradores demonstraram que células estromais da medula apresentavam efeitos anti-apoptóticos em linhagens e culturas primárias de LMA. Eles observaram que ao realizar o co-cultivo de duas linhagens mieloides com células estromais havia uma redução da apoptose nessas linhagens. Esse efeito foi associado ao aumento de BCL-2 e BCL-XL as células estromais que suportavam as linhagens mieloides. Com isso, foi confirmada a habilidade das células estromais de regular a sobrevivência das células leucêmicas. Além disso, o aumento de BCL-2 nas células estromais, que foram co-cultivadas com os blastos de LMA *in vitro*, foi associado com a resistência dos blastos leucêmicos a quimioterapia *in vivo* (Konopleva et al., 2002).

Alterações no microambiente medular também têm sido descritas em diferentes desordens hematológicas. Estudos com Síndrome Mielodisplásica (SMD) demonstraram que as MSCs de todos os subtipos desta doença apresentavam alterações epigenéticas e funcionais que comprometiam a habilidade dessas células de auxiliar no desenvolvimento das CTHs. Com isso, essas MSCs alteradas contribuíam para uma hematopoiese ineficiente. Essa disfunção do estroma foi associada como sendo um importante mecanismo da fisiopatologia da SMD (Geyh et al., 2013).

Assim, para compreendermos melhor o processo de transformação leucêmica, faz-se necessário o estudo do microambiente medular no qual a CTL está inserida.

A célula tronco hematopoiética apresenta duas características fundamentais, que são a capacidade de se diferenciar em todos os componentes do sistema hematopoiético e a capacidade de auto renovação. Contudo, essas propriedades são mantidas e reguladas pelo microambiente medular onde estão localizadas (Isern and Mendez-Ferrer, 2011).

Durante os estudos da composição do microambiente medular foi observado que as CTHs eram preferencialmente encontradas perto da superfície do osso, propondo-se então o nome de nicho endósteo pra essa região e que esse seria responsável por manter as CTHs em quiescência. Entretanto, foi observado que as CTHs também se encontravam localizadas muito próximas dos sinusóides da

medula óssea, sugerindo então que existisse um nicho vascular e que esse seria o local onde as CTHs iriam proliferar e se diferenciar nos progenitores hematopoiéticos. Recentes estudos vêm sugerindo que os nichos trabalham juntos tanto na regulação da sobrevivência das CTHs, como na regulação de proliferação, da diferenciação e na mobilização para fora da MO (Blau, 2014; Isern and Mendez-Ferrer, 2011).

A existência do nicho vascular para as CTHs é lógica do ponto de vista fisiológico, uma vez que as células sanguíneas deveriam estar próximas do sistema circulatório. Portanto, o nicho vascular seria o local ideal para o desenvolvimento e diferenciação das células tronco hematopoiéticas, além de ser o local onde ocorre a mobilização para a circulação periférica (Kopp et al., 2005).

O nicho endósteo é composto pelas células pré-osteogênicas, pelos osteoblastos, osteócitos, osteoclastos e pelas células estromais mesenquimais (MSCs) que dão origem aos osteoblastos. A interação das CTHs com essas células ocorre de maneira bidirecional, através de moléculas de adesão ou secreção de proteínas (Blau, 2014).

Friedenstein e colaboradores foram os primeiros a descrever as MSCs *in vitro* e ao colocar as células da MO em cultura, observaram que existia uma pequena população celular que era capaz de aderir plástico, apresentavam uma morfologia fibroblastóide e possuíam uma capacidade de formar unidades formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos. Essas células foram denominadas células estromais mesenquimais (MSC) (Friedenstein et al., 1968). A partir de então, diversos grupos começaram a trabalhar com as MSCs, entretanto, cada grupo apresentava uma forma de isolamento diferente, onde utilizavam diferentes fontes primárias e diferentes protocolos para cultivo e expansão. Além do mais, as MSC não apresentavam marcadores de superfície celular exclusivos, o que gerou grande dificuldade de comparação dos resultados no meio científico. Então, em 2006, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), na tentativa de diminuir esses problemas, publicou três critérios mínimos necessários para definir uma célula estromal mesenquimal em cultura (Dominici et al., 2006).

O primeiro e o segundo critérios estavam relacionados com a capacidade das MSCs de aderirem ao plástico e com a presença de marcadores de superfície celulares específicos. Já o terceiro estava relacionado com a capacidade de diferenciação dessas MSCs em cultura, as quais deveriam ser capazes de se

diferenciar *in vitro* quando cultivadas em meio indutor em: osteoblastos, adipócitos e condrócitos.

Em nosso trabalho, utilizamos os critérios estabelecidos pela SITC na caracterização das culturas de MSC de pacientes com LMA e nas de doadores saudáveis. Foi possível observar que ambas as culturas analisadas eram aderentes ao plástico e apresentavam um formato fibroblastóide, característico das células MSCs. Já em relação aos marcadores de superfície nossos resultados são condizentes com as marcações específicas para ambas as culturas analisadas e não foram observadas diferenças significativas em relação aos marcadores quando comparamos as culturas. Isso já era esperado, uma vez que, por se tratar de culturas de MSCs, não deveriam apresentar marcadores diferentes.

As MSCs normalmente permanecem em estado indiferenciado até que recebam os estímulos necessários para a diferenciação. O destino das MSCs para a adipogênese ou osteogênese depende de várias vias de sinalização e fatores de transcrição. Para a diferenciação adipogênica ocorrer, todas as vias envolvidas no processo convergem para a ativação do gene *Ppar γ* (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*). Para que ocorra a diferenciação osteogênica é necessária a expressão de *Runx2* (do inglês Runt-related transcription fator 2), um fator de transcrição essencial nesse processo (James, 2013;Zhang et al.,2012).

Ppar γ é o principal regulador da adipogênese, sendo que nenhum outro fator pode induzir a diferenciação adipogênica na ausência dele. Além disso, com o uso de antagonista de *Ppar γ* fica evidente seu papel anti-osteoblástico e pró-adipogênico (James, 2013).

Em nossos resultados não observamos diferença no potencial de diferenciação adipogênica quando comparamos as MSCs de pacientes com LMA com as de doadores saudáveis. Isso nos sugere que as MSCs de pacientes com LMA não apresentam nenhuma desregulação nas vias que ativam o *Ppar γ* .

Já em relação à diferenciação osteogênica, nossos resultados demonstraram que ambas as culturas mantiveram a capacidade de realizar a diferenciação osteogênica. Porém, há uma diferença no potencial de formação dos osteoblastos quando comparamos as MSCs de pacientes com LMA com as de doadores saudáveis. Essa redução no potencial de diferenciação osteogênica também foi observada em MSCs de pacientes com SMD. Geyh e colaboradores mostraram que a redução da potencial de diferenciação osteogênica das MSCs de

pacientes com SMD estava associada com a fisiopatologia da doença e relacionaram essa diminuição do potencial de diferenciação com a redução da capacidade dessas células de regular a hematopoiese. (Geyh et al., 2013).

A redução do potencial de diferenciação osteogênica observada em nosso estudo pode ser devido a diversos fatores, dentre eles a uma não ativação das várias vias de sinalização envolvidas no processo de diferenciação osteogênica. As duas principais vias que estimulam essa diferenciação são as vias de Wnt e de BMP.

A via de sinalização de Wnt tem sido identificada como essencial na determinação do destino celular, assim como da proliferação e diferenciação. Tanto a via canônica (dependente de β -catenina), quanto na via não canônica têm atuado no processo de formação e remodelamento ósseo pois apresentam atividade pro-osteogênica e anti-adipogênica (Fakhry et al., 2013; Zhang et al., 2012).

A via canônica de Wnt consiste na interação do ligante WNT extracelular com seu receptor FRIZZLEde com o co-receptor LRP5/6. Essa interação inibe o complexo Axin/GSK3/APC que normalmente fosforila β -catenina promovendo sua degradação. Com o acúmulo de β -catenina no citoplasma essa proteína é translocada para o núcleo onde irá se ligar ao sítio TCF/LEF atuando como fator de transcrição e ativando diversos genes como o gene *Runx2*. O papel da via de Wnt na diferenciação osteoblástica tem sido sugerido principalmente através dos estudos do co-receptor de Wnt LRP5/6. Mutações nesse co-receptor foram associadas com diminuição da massa óssea, devido à redução da proliferação dos osteoblastos, enquanto que um aumento da massa óssea foi relacionado com uma mutação que ativava o co-receptor LRP5/6 (Etheridge et al., 2004).

A via de BMP é responsável por regular inúmeros processos celulares, sendo uma potente via indutora da diferenciação das MSCs. Esta via realiza a regulação tanto da diferenciação adipogênica quanto osteogênica e sua ativação ocorre quando o ligante BMP interage com o receptor BMPRII que irá autofosforilar e ativar o receptor BMPRI, ativando a cascata Smad. O termo BMP (do inglês *bone morphogenetic protein*) foi introduzido para descrever um componente presente na desmineralização óssea que era capaz de induzir a formação óssea em camundongos quando injetado intramuscular ou subcutâneo (Fakhry et al., 2013).

Mais de 20 tipos diferentes de BMP já foram descritos, entretanto BMP-2,-4,-5,-6 e -7 são os mais estudados no contexto da diferenciação osteogênica das

MSCs. Diversos estudos em camundongos têm demonstrado a importância de BMP para a indução da diferenciação e regulação da formação óssea, desde modificação gênica nos ligantes, receptores e inibidores da via. BMP induz a osteogênese utilizando tanto as sinalizações autócrinas quanto parácrinas e ativa Osterix de maneira dependente e independente de *Runx2* (James, 2013).

Dessa forma, por observarmos uma diferença no potencial de formação de osteoblastos nas MSCs de pacientes com LMA, podemos sugerir que a diminuição no potencial pode estar relacionada com uma dificuldade na ativação de *Runx2*. Isso pode estar ocorrendo devido a uma alteração na sinalização de qualquer uma das vias que induzem a diferenciação osteogênica. No caso da via de Wnt, a alteração pode ocorrer tanto na interação do ligante ao receptor quanto na translocação de β -catenina para o núcleo. Já, se formos considerar que a redução no potencial de diferenciação esteja relacionada com a via de BMP, isso pode ocorrer devido diversos fatores como a não expressão de BMP-2, resultando numa severa diminuição da osteogênese, uma alta expressão do antagonista de BMP, Noggin, ou até mesmo devido a uma não ativação ou ausência do receptor BMPR-1B que é o responsável pela indução da osteogênese. Para podermos compreender o que de fato está ocorrendo na diferenciação osteogênica é preciso um estudo mais detalhado das vias que regulam essa diferenciação.

No microambiente medular as MSCs interagem com as CTHs através das interações célula-célula e da secreção de proteínas, tais como os fatores de crescimento e citocinas. Estudos demonstram que as CTHs expressam a maioria das moléculas de adesão identificadas nas CTHs (Ayala et al., 2009). Logo, por serem muito semelhantes, é provável que as MSCs também possam interagir com os blastos leucêmicos (ou melhor CTHs) e possam regular sua proliferação, contribuindo para o crescimento e progressão da LMA (Giles et al., 2002).

Existem diversas evidências que as CTHs realizam uma sinalização para o microambiente medular e dessa forma poderiam influenciar o perfil de proliferação das MSCs e criar um microambiente tumoral (Konopleva and Jordan, 2011).

Nesse sentido, avaliamos o perfil de proliferação das MSCs de pacientes com LMA e comparadas com doadores saudáveis. Nas análises *in vitro*, não observamos diferenças na proliferação quando comparamos as culturas de MSCs de pacientes com LMA com doadores saudáveis. Esses resultados nos mostram que as MSCs sozinhas em cultura não apresentam seu perfil de proliferação

alterado. Entretanto, é possível que as MSCs tenham sua proliferação alterada no contexto da doença. Porém, seria necessário um estímulo das CTLs para isso acontecer.

Todavia, a ausência de alteração do perfil de proliferação das MSCs de pacientes com LMA não significa que essas células não possam estar com o perfil de ciclo celular alterados. Diversos fatores podem levar uma célula a estacionar em uma fase do ciclo celular. Quando não existem estímulos suficientes para as células proliferarem, a progressão a um novo ciclo celular é bloqueada e as células entram num estado de não divisão chamado G_0 . No entanto, ao realizamos ensaios de ciclo celular para as MSCs de pacientes com LMA e doadores saudáveis também não foi observado diferenças nas fases do ciclo celular quando comparamos as culturas.

Como já mencionado, o microambiente medular tem um importante papel no controle da hematopoiese, e uma alteração nesse nicho pode contribuir para o processo de leucemogênese através da expressão de fatores de crescimento que podem promover a proliferação e/ou inibição da apoptose (Blau, 2014). Uma maneira de avaliar se os processos fisiológicos estão sendo alterados é avaliar a expressão gênica global de uma determinada célula. Nesse trabalho, comparamos o perfil de expressão gênica das MSCs de pacientes com LMA e de doadores saudáveis e encontramos 55 genes diferencialmente expressos. Destes 55 genes, 11 estavam aumentados e 44 estavam diminuídos nas MSCs de pacientes com LMA em relação aos doadores saudáveis, sugerindo a existência de uma assinatura molecular comum a todas as MSCs de pacientes com LMA. Entretanto, os ensaios de chiparray precisavam ser validados.

Para a validação do chiparray, o ensaio foi repetido de maneira não supervisionada com novas amostras de MSCs de pacientes com LMA. Dessa maneira foi possível verificar que os 55 genes encontrados diferencialmente expressos eram capazes de separar amostras de pacientes das de doadores. Com isso, podemos afirmar que o resultado encontrado corrobora como o primeiro ensaio de chiparray e nos sugere que a assinatura molecular encontrada é capaz de separar as MSCs de pacientes com LMA das de doadores.

Realizamos uma segunda validação com alguns genes encontrados no primeiro ensaio de chiparray através de ensaios de RT-qPCR utilizando em uma gama maior de pacientes. Os genes escolhidos foram *Spond2* e *Ccl2*, encontrados

aumentados e *Bmp4*, *Mmp16*, *Cldn1* e *Opn*, diminuídos nas MSCs de pacientes com LMA. Apesar dos genes *Ccl2* e *Mmp16* não terem apresentando estatística significativa, todos os genes selecionados confirmaram o ensaio de chiparray e confirmam a existência de uma assinatura molecular para as todas as MSCs de pacientes com LMA. Os genes validados por PCR em tempo real estão relacionados ou com o processo tumoral ou com a fisiologia do microambiente medular.

O gene *Spond2* pertence à família das F-Spondinas e é uma proteína secretada da matriz extracelular que apresenta um papel essencial na ativação da resposta imune inata. Diferenças de expressão gênica de *Spond2* já foram descritas em células normais e cancerosas de pulmão. Entretanto, sua maior relevância clínica tem sido no estudo de câncer de próstata. Qian e colaboradores realizaram um estudo onde avaliavam a quantidade de SPOND2 presente no soro de pacientes com câncer de próstata e doadores saudáveis e compararam as análises de sensibilidade e especificidade da SPOND2 com o PSA (antígeno prostático específico). A conclusão do estudo foi que SPOND2 apresentava maior sensibilidade e especificidade do que o PSA e sugeriram que *Spond2* pudesse ser um novo biomarcador para o câncer de próstata (Qian et al., 2012). Na LMA, por apresentar um papel na resposta imune, o aumento de *Spond2* pode estar de alguma maneira favorecendo a manutenção da LMA. Contudo, é preciso mais estudos para compreendermos melhor o papel de SPOND2 nessa neoplasia.

As Claudinas são proteínas transmembranares, importantes componentes das junções oclusivas. Elas são o centro da regulação da permeabilidade da membrana a soluto e água e também atuam na manutenção da polaridade da célula epitelial. Sua expressão está alterada em diversos tipos de câncer quando comparado com tecidos normais, sendo o gene *Claudina-1* (*Cldn1*) um dos mais regulados negativamente. Em estudos de tumores gástricos, a supressão de *Cldn1* aumentou *in vivo* a tumorigênese das células gástricas. Dessa forma, a baixa expressão de *Cldn1* encontrada nas MSCs de pacientes pode estar aumentando de alguma forma a tumorigênese da LMA. O que podemos afirmar é que *Cldn1* é um importante gene dentro do contexto tumoral (Kwon, 2013).

A matriz extracelular da medula óssea apresenta um papel importante para o funcionamento normal da hematopoiese, pois suas moléculas como fibronectina, laminina e proteoglicanas interagem com as CTHs. As metaloproteinases (MMP)

de matriz também são componentes importantes da matriz extracelular, pois atuam clivando importantes componentes dessa, mobilizando e ativando certos fatores de crescimento que estavam na forma inativa. Na LMA, já foram descritas expressões aumentadas das MMP-2 e MMP-9 e essas parecem estar envolvidas principalmente na angiogênese e na progressão tumoral. Além disso, foi demonstrado que as MMPs podem ser produzidas tanto pelas células leucêmicas quanto pelas células do estroma (Ayaka et al., 2009; Travaglino et al., 2008). Por ter sido encontrada diminuída em nossas análises, a proteína MMP16 pode não estar clivando importantes fatores para o desenvolvimento normal da hematopoiese. Entretanto, o papel da MMP16 precisa ser investigado na LMA, pois não há relatos na literatura de sua alteração nessa doença.

As células do organismo se comunicam através das vias de sinalização por meio das quais enviam e recebem informações para outras células. Identificar em quais vias de sinalização os genes encontrados diferencialmente expressos estão, auxilia no processo de compreensão dos processos alterados nas células. Em nosso estudo, realizamos uma análise *in silico* dos 55 genes diferencialmente expressos encontrados para identificarmos em quais vias de sinalização esses genes estavam inseridos e buscar compreender qual a importância da alteração do perfil de expressão gênica para o ambiente medular. Nessa análise encontramos diversas vias que poderiam estar alteradas, mas, escolhemos dar enfoque a duas vias importantes para a regulação das CTHs.

A primeira via é a da osteopontina sinalizando em osteoclastos. A osteopontina é uma glicoproteína fosforilada, secretada na matriz extracelular. Ela pode ser sintetizada por diversos tipos celulares e está envolvida em vários processos fisiológicos e patológicos incluindo apoptose, resposta inflamatória, angiogênese, adesão celular e metástase tumoral. A OPN se liga a diversas integrinas e ao CD44, que está expresso nas CTHs, ativando diversas vias de sinalização (Nilsson et al., 2005; Stier et al., 2005).

A osteopontina é um importante fator na ativação dos osteoclastos. Para um perfeito funcionamento da medula óssea é preciso que ocorra um balanço entre o número de osteoblastos e osteoclastos, uma vez que esses são responsáveis pela formação e reabsorção da medula. Uma não ativação dos osteoclastos devido aos baixos níveis de osteopontina pode levar a um aumento no número de osteoblastos

e estes, como foi descrito por Calvi e colaboradores, ao ter seu número aumentando, podem também aumentar a população de CTHs (Calvi et al., 2003).

Assim, como a osteopontina é um regulador negativo das CTHs, na LMA a sua baixa expressão pode estar favorecendo a proliferação das células leucêmicas.

Em 2005 dois estudos publicaram o papel da osteopontina na regulação das CTHs. Em um deles, Nilsson e colaboradores utilizaram camundongos deficientes em osteopontina e observaram um aumento da proliferação das CTHs. Além disso, demonstraram *in vitro* que osteopontina exógena era capaz de suprimir a proliferação de células progenitoras e que essa superexpressão não estava associada com a indução da apoptose. Com isso, eles sugeriram que a osteopontina é um regulador negativo da proliferação das CTHs ativando a manutenção da quiescência dessas células (Nilsson et al., 2005). O segundo estudo realizado por Stier e colaboradores também demonstrou que camundongos deficientes para osteopontina aumentavam o tamanho da população de células tronco hematopoiéticas. Entretanto, ao adicionarem *Opn* a cultura celular, observaram um aumento na apoptose. Eles ainda observaram que a deficiência de osteopontina não afetava a diferenciação hematopoiética. Assim, ausência de *Opn* resulta em um aumento do número de CTHs. Contudo, osteopontina não atua sozinha no controle do tamanho da população de células tronco, existem outros produtos do microambiente medular que podem atuar nesse controle (Stier et al., 2005).

Em nossos resultados de chiparray o gene *Bmp4* encontra-se diferencialmente expresso nas MSCs de pacientes com LMA. Análises *in silico* mostraram que esse gene pode ser regulado pela via de sinalização Wnt. Essa segunda via importante encontrada na análise *in silico* está relacionada com a proliferação e diferenciação das CTHs. No sistema hematopoiético, Zhang e colaboradores demonstraram que a via de sinalização de Bmp tem um importante papel no controle do número de CTHs influenciando o tamanho do nicho hematopoiético (Stier et al., 2005; Zhang et al., 2003).

BMP4 é uma proteína secretada, membro da família TGF- β , e apresenta um importante papel no desenvolvimento hematopoiético. BMP4 é expresso e secretado pelas células do microambiente medular, incluindo os osteoblastos, as células endoteliais e as MSCs. Em 2009, Goldman e colaboradores demonstraram que BMP4 era um componente crucial do microambiente hematopoiético e que

regulava as CTHs de maneira autônoma independente da célula. Utilizando um camundongo que apresentava deficiência na expressão de *Bmp4* e redução da sua sinalização na MO, eles demonstraram, *in vivo*, que a sinalização BMP4 era necessária para manter as células CTHs adultas funcionais (Goldman et al., 2009; Stier et al., 2005).

As MSC suportam tanto a hematopoiese normal quanto a anormal. Entretanto, os recentes estudos indicam que as CTLs interagem com as MSCs de maneira a mudar o microambiente medular e deixá-lo favorável para seu crescimento. Os mesmos mecanismos que regulam as CTHs, podem favorecer a sobrevivência dos blastos leucêmicos, dessa forma, ambos os nichos, vascular e endósteo são cruciais para a proliferação, diferenciação e sobrevivência das CTLs (Konopleva and Jordan, 2011b).

Além disso, trabalhos vêm demonstrando que as CTLs modificam o perfil de citocinas e quimiocinas produzidas pelas MSCs, o que também altera o microambiente hematopoiético. As quimiocinas são pequenas moléculas proteicas que apresentam diversos papéis no sistema imune, regulando o desenvolvimento, diferenciação e recrutamento de leucócitos nas reações imunes e inflamatórias. Algumas quimiocinas influenciam a produção de interleucinas, angiogênese e apresentam efeitos parácrinos e autócrinos que estimulam o crescimento e expansão de diversos tumores. Dentre as quimiocinas, CCL2 demonstra quimiotaxia para ativar monócitos, células “natural killer” e linfócitos T de memória (Mazur et al., 2007).

Civini e colaboradores, em 2013, confirmaram a influência das MSC nas CTLs e também mostraram, através de ensaios de co-cultura, que as MSCs na presença das células leucêmicas apresentavam diferenças de expressão das proteínas CCL2 e IL-8 que fazem parte da via de sinalização IL-17. Essa via está altamente relacionada com os processos pro-inflamatórios, doenças autoimunes e ao microambiente tumoral (Civini et al., 2013).

Apesar da importância do estudo da regulação gênica e das vias de sinalização, é através da expressão proteica que os genes conseguem realizar suas funções. Alguns genes encontrados diferencialmente expressos em nosso trabalho, geram proteínas que são secretadas para que possam exercer suas funções. Logo, torna-se importante avaliar a concentração dessas proteínas no plasma celular para tentarmos compreender se existe alteração na sinalização das

MSCs e quais os processos desregulados na doença. Através de ensaios de ELISA verificamos que há uma maior concentração da proteína CCL2 e uma menor concentração da proteína BMP4 no plasma de pacientes com LMA quando comparados com doadores saudáveis. O aumento de expressão de CCL2 (importante quimiocina pro-inflamatória) no plasma dos pacientes com LMA, pode favorecer a progressão tumoral e a baixa expressão de BMP4 pode alterar funcionamento normal do sistema hematopoiético (Civini et al., 2013;Goldman et al., 2009;Nilsson et al., 2005;Stier et al., 2005). Entretanto, os níveis de OPN no plasma foram mantidos tanto nos pacientes com LMA quanto nos doadores. Logo, para certificarmos que a expressão da proteína OPN apresenta diferenças entre as MSCs, seria necessário quantificar essa proteína através de ensaios utilizando o sobrenadante da cultura celular.

Com isso, a diferença de expressão das proteínas encontradas no plasma nos indica que há alterações na sinalização do microambiente medular na leucemia mieloide aguda.

Em resumo, neste estudo, encontramos 55 genes diferencialmente expressos, o que nos sugere uma assinatura molecular comum a todas as MSC de pacientes com LMA, independente do subtipo. Essa assinatura molecular é capaz de separar as MSCs de pacientes com LMA de MSCs de doadores saudáveis. Além disso, diferenças de concentrações de CCL2 e BMP4 no plasma de pacientes com LMA indicam uma alteração na sinalização das MSCs, que pode ser importante fator no processo de transformação leucêmica. As MSCs de pacientes encontram-se alteradas na LMA e essas alterações podem tanto favorecer o surgimento da leucemia como a manutenção da manutenção doença.

7. CONCLUSÃO

1) Nossos resultados da caracterização das MSCs de pacientes com LMA e das MSCs de doadores saudáveis mostram que:

- As culturas de MSCs de pacientes com LMA e de doadores saudáveis atenderam aos critérios mínimos estabelecidos pela SITC confirmando as características de uma cultura de MSC.
- Em relação à morfologia e aos marcadores de superfície, as MSCs de pacientes com LMA não apresentaram diferenças quando comparadas com MSCs de doadores.
- MSCs de pacientes com LMA e de doadores saudáveis não apresentaram diferenças em relação à diferenciação adipogênica *in vitro*.
- O potencial de diferenciação osteogênica encontra-se diminuído nas MSCs de pacientes com LMA quando comparado com o de doadores saudáveis. E essa diminuição pode estar relacionada com a desregulação das vias de BMP ou WNT.

2) Na avaliação do perfil de proliferação e de ciclo celular das MSCs de pacientes com LMA verificamos que:

- O perfil de proliferação e de ciclo celular das MSCs de pacientes com LMA não apresenta diferenças em relação o perfil de doadores saudáveis.

3) Após as análises do perfil de expressão das MSCs de paciente com LMA e de doadores saudáveis nosso trabalho mostrou que:

- As MSCs de pacientes com LMA apresentam uma assinatura molecular de 55 genes característica de todos os subtipos de LMA.
- Os genes encontrados diferencialmente expressos, quando separados por subtipos continuam a apresentar o mesmo perfil de expressão gênica, confirmando a assinatura molecular.
- As concentrações de CCL2 e BMP4 apresentam diferenças quando comparamos o plasma de pacientes com LMA e o de doadores saudáveis.

- Os genes *Ccl2* e *Bmp4* estão alterados nas MSCs de pacientes com LMA, e essa alteração pode estar favorecendo processo de transformação leucêmica ou ajudando na manutenção da leucemia.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Facts & Figures 2014. 2014.

AYALA, F.; DEWAR, R.; KIERAN, M. e KALLURI, R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. **Leukemia** v. 23, n. 12, p. 2233-2241, Dec 2009. Disponível em: PM:19727127.

AZIZDOOST, S.; SHANAKI, B. M.; SHANAKI, B. M.; SHAHRABI, S.; JASEB, K.; RAHIM, F.; SHAHJAHANI, M.; SABA, F.; GHORBANI, M. e SAKI, N. The role of notch signaling in bone marrow niche. **Hematology**. Apr 12 2014. Disponível em: PM:24724873.

BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R. e SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. **Br.J.Haematol.** v. 33, n. 4, p. 451-458, Aug 1976. Disponível em: PM:188440.

BHATIA, M.; BONNET, D.; WU, D.; MURDOCH, B.; WRANA, J.; GALLACHER, L. e DICK, J. E. Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. **J.Exp.Med.** v. 189, n. 7, p. 1139-1148, Apr 5 1999. Disponível em: PM:10190905.

BINATO, R.; DE SOUZA, F. T.; LAZZAROTTO-SILVA, C.; DU, R. B.; MENCALHA, A.; PIZZATTI, L.; BOUZAS, L. F. e ABDELHAY, E. Stability of human mesenchymal

stem cells during in vitro culture: considerations for cell therapy. **Cell Prolif.** v. 46, n. 1, p. 10-22, Feb 2013. Disponível em: PM:23163975.

BLAU, O. Bone marrow stromal cells in the pathogenesis of acute myeloid leukemia. **Front Biosci.(Landmark.Ed)** v. 19, p. 171-180, 2014. Disponível em: PM:24389180.

BONNET, D. e DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nat.Med.** v. 3, n. 7, p. 730-737, Jul 1997. Disponível em: PM:9212098.

CALVI, L. M.; ADAMS, G. B.; WEIBRECHT, K. W.; WEBER, J. M.; OLSON, D. P.; KNIGHT, M. C.; MARTIN, R. P.; SCHIPANI, E.; DIVIETI, P.; BRINGHURST, F. R.; MILNER, L. A.; KRONENBERG, H. M. e SCADDEN, D. T. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature** v. 425, n. 6960, p. 841-846, Oct 23 2003. Disponível em: PM:14574413.

CIVINI, S.; JIN, P.; REN, J.; SABATINO, M.; CASTIELLO, L.; JIN, J.; WANG, H.; ZHAO, Y.; MARINCOLA, F. e STRONCEK, D. Leukemia cells induce changes in human bone marrow stromal cells. **J.Transl.Med.** v. 11, p. 298, 2013. Disponível em: PM:24304929.

DASH, A. e GILLILAND, D. G. Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. **Best.Pract.Res.Clin.Haematol.** v. 14, n. 1, p. 49-64, Mar 2001. Disponível em: PM:11355923.

DICK, J. E. Stem cell concepts renew cancer research. **Blood** v. 112, n. 13, p. 4793-4807, Dec 15 2008. Disponível em: PM:19064739.

DOMINICI, M.; LE, B. K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D. e HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006. Disponível em: PM:16923606.

ESTEY, E. e DOHNER, H. Acute myeloid leukaemia. **Lancet** v. 368, n. 9550, p. 1894-1907, Nov 25 2006. Disponível em: PM:17126723.

ETHERIDGE, S. L.; SPENCER, G. J.; HEATH, D. J. e GENEVER, P. G. Expression profiling and functional analysis of wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. **Stem Cells** v. 22, n. 5, p. 849-860, 2004. Disponível em: PM:15342948.

FAKHRY, M.; HAMADE, E.; BADRAN, B.; BUCHET, R. e MAGNE, D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. **World J.Stem Cells** v. 5, n. 4, p. 136-148, Oct 26 2013. Disponível em: PM:24179602.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PETRAKOVA, K. V.; KUROLESOVA, A. I. e FROLOVA, G. P. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. **Transplantation** v. 6, n. 2, p. 230-247, Mar 1968. Disponível em: PM:5654088.

GEYH, S.; OZ, S.; CADEDDU, R. P.; FROBEL, J.; BRUCKNER, B.; KUNDGEN, A.; FENK, R.; BRUNS, I.; ZILKENS, C.; HERMSEN, D.; GATTERMANN, N.; KOBBE, G.; GERMING, U.; LYKO, F.; HAAS, R. e SCHROEDER, T. Insufficient stromal support in MDS results from molecular and functional deficits of mesenchymal stromal cells. **Leukemia** v. 27, n. 9, p. 1841-1851, Sep 2013. Disponível em: PM:23797473.

GILES, F. J.; KEATING, A.; GOLDSTONE, A. H.; AVIVI, I.; WILLMAN, C. L. e KANTARJIAN, H. M. Acute myeloid leukemia. **Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.**, p. 73-110, 2002. Disponível em: PM:12446420.

GOLDMAN, D. C.; BAILEY, A. S.; PFAFFLE, D. L.; AL, M. A.; CHRISTIAN, J. L. e FLEMING, W. H. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. **Blood** v. 114, n. 20, p. 4393-4401, Nov 12 2009. Disponível em: PM:19759357.

GREGORY, T. K.; WALD, D.; CHEN, Y.; VERMAAT, J. M.; XIONG, Y. e TSE, W. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **J.Hematol.Oncol.** v. 2, p. 23, 2009. Disponível em: PM:19490647.

HORWITZ, E. M.; LE, B. K.; DOMINICI, M.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; DEANS, R. J.; KRAUSE, D. S. e KEATING, A. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. v. 7, n. 5, p. 393-395, 2005. Disponível em: PM:16236628.

HUANG, M. M. e ZHU, J. The regulation of normal and leukemic hematopoietic stem cells by niches. **Cancer Microenviron.** v. 5, n. 3, p. 295-305, Dec 2012. Disponível em: PM:23055016.

HUNTLY, B. J. e GILLILAND, D. G. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. **Nat.Rev.Cancer** v. 5, n. 4, p. 311-321, Apr 2005. Disponível em: PM:15803157.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. 2015.

ISERN, J. e MENDEZ-FERRER, S. Stem cell interactions in a bone marrow niche. **Curr.Osteoporos.Rep.** v. 9, n. 4, p. 210-218, Dec 2011. Disponível em: PM:21932020.

JAMES, A. W. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. **Scientifica.(Cairo.)** v. 2013, p. 684736, 2013. Disponível em: PM:24416618.

KELLY, L. M. e GILLILAND, D. G. Genetics of myeloid leukemias. **Annu.Rev.Genomics Hum.Genet.** v. 3, p. 179-198, 2002. Disponível em: PM:12194988.

KOLLET, O.; DAR, A.; SHIVTIEL, S.; KALINKOVICH, A.; LAPID, K.; SZTAINBERG, Y.; TESIO, M.; SAMSTEIN, R. M.; GOICHBERG, P.; SPIEGEL, A.; ELSON, A. e LAPIDOT, T. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization

of hematopoietic progenitor cells. **Nat.Med.** v. 12, n. 6, p. 657-664, Jun 2006.
Disponível em: PM:16715089.

KONOPLEVA, M.; KONOPLEV, S.; HU, W.; ZARITSKEY, A. Y.; AFANASIEV, B. V.
e ANDREEFF, M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of
anti-apoptotic proteins. **Leukemia** v. 16, n. 9, p. 1713-1724, Sep 2002. Disponível
em: PM:12200686.

KONOPLEVA, M. Y. e JORDAN, C. T. Leukemia stem cells and microenvironment:
biology and therapeutic targeting. **J.Clin.Oncol.** v. 29, n. 5, p. 591-599, Feb 10
2011b. Disponível em: PM:21220598.

KOPP, H. G.; AVECILLA, S. T.; HOOPER, A. T. e RAFII, S. The bone marrow
vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization.
Physiology.(Bethesda.) v. 20, p. 349-356, Oct 2005. Disponível em:
PM:16174874.

KWON, M. J. Emerging roles of claudins in human cancer. **Int.J.Mol.Sci.** v. 14, n.
9, p. 18148-18180, 2013. Disponível em: PM:24009024.

LARSSON, J. e KARLSSON, S. The role of Smad signaling in hematopoiesis.
Oncogene v. 24, n. 37, p. 5676-5692, Aug 29 2005. Disponível em: PM:16123801.

LEVIS, M. FLT3 mutations in acute myeloid leukemia: what is the best approach in 2013? **Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.** v. 2013, p. 220-226, 2013. Disponível em: PM:24319184.

LIVAK, K. J. e 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, Dec 2001. Disponível em: PM:11846609.

LORD, B. I.; TESTA, N. G. e HENDRY, J. H. The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. **Blood** v. 46, n. 1, p. 65-72, Jul 1975. Disponível em: PM:1131427.

LUO, J.; CHEN, J.; DENG, Z. L.; LUO, X.; SONG, W. X.; SHARFF, K. A.; TANG, N.; HAYDON, R. C.; LUU, H. H. e HE, T. C. Wnt signaling and human diseases: what are the therapeutic implications? **Lab Invest** v. 87, n. 2, p. 97-103, Feb 2007. Disponível em: PM:17211410.

MAZUR, G.; WROBEL, T.; BUTRYM, A.; KAPELKO-SLOWIK, K.; POREBA, R. e KULICZKOWSKI, K. Increased monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1/CCL-2) serum level in acute myeloid leukemia. **Neoplasma** v. 54, n. 4, p. 285-289, 2007. Disponível em: PM:17822317.

NAKAMURA-ISHIZU, A. e SUDA, T. Hematopoietic stem cell niche: an interplay among a repertoire of multiple functional niches. **Biochim.Biophys.Acta** v. 1830, n. 2, p. 2404-2409, Feb 2013. Disponível em: PM:22967757.

NEMETH, M. J.; MARK KK e YANG, Y. beta-Catenin expression in the bone marrow microenvironment is required for long-term maintenance of primitive hematopoietic cells. **Stem Cells** v. 27, n. 5, p. 1109-1119, May 2009. Disponível em: [PM:19415781](#).

NILSSON, S. K.; JOHNSTON, H. M.; WHITTY, G. A.; WILLIAMS, B.; WEBB, R. J.; DENHARDT, D. T.; BERTONCELLO, I.; BENDALL, L. J.; SIMMONS, P. J. e HAYLOCK, D. N. Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. **Blood** v. 106, n. 4, p. 1232-1239, Aug 15 2005. Disponível em: [PM:15845900](#).

PITTINGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S. e MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science** v. 284, n. 5411, p. 143-147, Apr 2 1999. Disponível em: [PM:10102814](#).

PURTON, L. E. e SCADDEN, D. T. The hematopoietic stem cell niche. 2008. Disponível em: [PM:20614611](#).

QIAN, X.; LI, C.; PANG, B.; XUE, M.; WANG, J. e ZHOU, J. Spondin-2 (SPON2), a more prostate-cancer-specific diagnostic biomarker. **PLoS.One.** v. 7, n. 5, p. e37225, 2012. Disponível em: [PM:22615945](#).

ROSEN, J. M. e JORDAN, C. T. The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. **Science** v. 324, n. 5935, p. 1670-1673, Jun 26 2009. Disponível em: [PM:19556499](#).

ROSS, J. e LI, L. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. **Curr.Opin.Hematol.** v. 13, n. 4, p. 237-242, Jul 2006. Disponível em: PM:16755219.

RULINA, A. V.; SPIRIN, P. V. e PRASSOLOV, V. S. Activated leukemic oncogenes AML1-ETO and c-kit: role in development of acute myeloid leukemia and current approaches for their inhibition. **Biochemistry (Mosc.)** v. 75, n. 13, p. 1650-1666, Dec 2010. Disponível em: PM:21417999.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. **Blood Cells** v. 4, n. 1-2, p. 7-25, 1978. Disponível em: PM:747780.

SHIOZAWA, Y.; HAVENS, A. M.; PIENTA, K. J. e TAICHMAN, R. S. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. **Leukemia** v. 22, n. 5, p. 941-950, May 2008. Disponível em: PM:18305549.

SHORE, E. M. e KAPLAN, F. S. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. **Nat.Rev.Rheumatol.** v. 6, n. 9, p. 518-527, Sep 2010. Disponível em: PM:20703219.

SHOWEL, M. M. e LEVIS, M. Advances in treating acute myeloid leukemia. **F1000Prime.Rep.** v. 6, p. 96, 2014. Disponível em: PM:25374674.

STAAL, F. J. e CLEVERS, H. C. WNT signalling and haematopoiesis: a WNT-WNT situation. **Nat.Rev.Immunol.** v. 5, n. 1, p. 21-30, Jan 2005. Disponível em: PM:15630426.

STIER, S.; KO, Y.; FORKERT, R.; LUTZ, C.; NEUHAUS, T.; GRUNEWALD, E.; CHENG, T.; DOMBKOWSKI, D.; CALVI, L. M.; RITTLING, S. R. e SCADDEN, D. T. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. **J.Exp.Med.** v. 201, n. 11, p. 1781-1791, Jun 6 2005. Disponível em: PM:15928197.

TAICHMAN, R. S. e EMERSON, S. G. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. **J.Exp.Med.** v. 179, n. 5, p. 1677-1682, May 1 1994. Disponível em: PM:7513014.

TRAVAGLINO, E.; BENATTI, C.; MALCOVATI, L.; DELLA PORTA, M. G.; GALLI, A.; BONETTI, E.; ROSTI, V.; CAZZOLA, M. e INVERNIZZI, R. Biological and clinical relevance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in acute myeloid leukaemias and myelodysplastic syndromes. **Eur.J.Haematol.** v. 80, n. 3, p. 216-226, Mar 2008. Disponível em: PM:18081721.

VARDIMAN, J. W.; THIELE, J.; ARBER, D. A.; BRUNNING, R. D.; BOROWITZ, M. J.; PORWIT, A.; HARRIS, N. L.; LE BEAU, M. M.; HELLSTROM-LINDBERG, E.; TEFFERI, A. e BLOOMFIELD, C. D. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood** v. 114, n. 5, p. 937-951, Jul 30 2009. Disponível em: PM:19357394.

WANG, J. C. e DICK, J. E. Cancer stem cells: lessons from leukemia. **Trends Cell Biol.** v. 15, n. 9, p. 494-501, Sep 2005. Disponível em: PM:16084092.

WARNER, J. K.; WANG, J. C.; HOPE, K. J.; JIN, L. e DICK, J. E. Concepts of human leukemic development. **Oncogene** v. 23, n. 43, p. 7164-7177, Sep 20 2004. Disponível em: PM:15378077.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell** v. 100, n. 1, p. 157-168, Jan 7 2000. Disponível em: PM:10647940.

WILSON, A. e TRUMPP, A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. **Nat.Rev.Immunol.** v. 6, n. 2, p. 93-106, Feb 2006. Disponível em: PM:16491134.

YILMAZ, O. H.; VALDEZ, R.; THEISEN, B. K.; GUO, W.; FERGUSON, D. O.; WU, H. e MORRISON, S. J. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. **Nature** v. 441, n. 7092, p. 475-482, May 25 2006. Disponível em: PM:16598206.

ZHANG, J. e LI, L. BMP signaling and stem cell regulation. **Dev.Biol.** v. 284, n. 1, p. 1-11, Aug 1 2005. Disponível em: PM:15963490.

ZHANG, J.; NIU, C.; YE, L.; HUANG, H.; HE, X.; TONG, W. G.; ROSS, J.; HAUG, J.; JOHNSON, T.; FENG, J. Q.; HARRIS, S.; WIEDEMANN, L. M.; MISHINA, Y. e LI, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche

size. **Nature** v. 425, n. 6960, p. 836-841, Oct 23 2003. Disponível em:
PM:14574412.

ZHANG, Y.; KHAN, D.; DELLING, J. e TOBIASCH, E. Mechanisms underlying the
osteo- and adipo-differentiation of human mesenchymal stem cells.
ScientificWorldJournal. v. 2012, p. 793823, 2012. Disponível em: PM:22500143.