



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

BRUNA PALODETTO

**INFLUÊNCIA DE VEGFA E SEMA3A NA PATOGÊNESE DE SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS E LEUCEMIAS AGUDAS**

CAMPINAS

2016

BRUNA PALODETTO

**INFLUÊNCIA DE VEGFA E SEMA3A NA PATOGÊNESE DE SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS E LEUCEMIAS AGUDAS**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

ORIENTADORA: SARA TERESINHA OLALLA SAAD

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
BRUNA PALODETTO, E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. SARA TERESINHA OLALLA SAAD.

CAMPINAS

2016

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): FAPESP, 2012/00529-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

P186i Palodetto, Bruna, 1987-
Influência de VEGFA e SEMA3A na patogênese de síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas / Bruna Palodetto. – Campinas, SP : [s.n.], 2016.

Orientador: Sara Teresinha Olalla Saad.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia. 2. Proteína VEGFA humana. 3. Proteína SEMA3A humana. I. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Influence of VEGFA and SEMA3A in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes and acute leukemias

Palavras-chave em inglês:

Leukemia

SEMA3A protein, Human

VEGFA protein, Human

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador]

Claudia Bincoletto Trindade

Lorena Lobo De Figueiredo Pontes

Cristiane Okuda Torello

Mariana Lazarini

Data de defesa: 03-06-2016

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

BRUNA PALODETTO

ORIENTADOR: PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

MEMBROS:

- 1. PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD**
- 2. PROF(A). DR(A). CLAUDIA BINCOLETTO TRINDADE**
- 3. PROF(A). DR(A). LORENA LOBO DE FIGUEIREDO PONTES**
- 4. PROF(A). DR(A). CRISTIANE OKUDA TORELLO**
- 5. PROF(A). DR(A). MARIANA LAZARINI**

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: 03 de junho de 2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe,
minha maior incentivadora e meu
melhor exemplo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à minha orientadora Profa. Dra. Sara Saad, pela oportunidade, pela confiança, por ser um exemplo de pesquisadora, por sempre me ajudar e me incentivar a ser melhor.

À minha família, especialmente minha mãe Vânia, meus tios Elaine e Luciano, minhas primas Patricia e Aline e a minha avó Nair, por sempre me incentivarem e apoiarem, comemorarem comigo todas as minhas conquistas e estarem sempre a postos para me consolar diante das minhas decepções. Por me acompanharem ao laboratório aos sábados, domingos e madrugadas; e por se tornarem um pouquinho cientistas também tentando entender meus experimentos nos almoços de domingo. Ao meu pai por sempre estar olhando lá de cima.

Ao meu namorado Sandro, por entrar de cabeça nessa jornada comigo, me apoiar sempre, amparar, incentivar, ajudar nos gráficos e figuras, por me acompanhar ao laboratório nos fins de semana e por entender as minhas ausências.

Aos meus amigos, que se esforçaram para entender meus experimentos malucos e minhas ausências.

À minha querida bancada rosa e seus agregados, por tornarem os dias mais alegres e estarem sempre dispostos ajudar nos experimentos, discutir hipóteses malucas e comemorar os resultados e principalmente a falta deles. À Vanessa, por sempre oferecer um ombro amigo, companhia nos fins de semana e feriados no laboratório e enriquecer nosso vocabulário. À Fernanda Niemann, por toda sua paciência, dedicação, carinho, e por ser uma amiga sempre disposta a ajudar. À Isabella, que me ensinou muito sobre experimentos, que se tornou minha companheira de seriados e meninices e uma amiga muito querida. Ao Matheus, por não enlouquecer no meio de tantas mulheres, por sempre ter paciência, por ajudar nos experimentos, por ser nosso guarda costas nas viagens e por ser um verdadeiro amigo. À Rita, por estar ao meu lado desde o começo, por ser minha companheira do laboratório, por dividir as alegrias e frustrações, por ser um porto seguro e uma amiga tão querida. À Flávia, por ter aceitado vir para cá, por tudo desde a faculdade, por ser minha amiga de verdade sempre que eu precisei, por ser tão especial na minha vida, por me ajudar e estar sempre ao meu lado.

Às funcionárias que sempre nos salvam. À Adriana, pois sem ela este trabalho não seria possível, obrigada por dedicar seu tempo para me ajudar, por ser amiga, pelas infinitas bolsas de sangue de cordão e as colônias. Às queridas Ana Leda e Irene, por acreditarem nos meus sortings de 0,5%, minhas CD34⁺ malucas e por sempre estarem dispostas a ajudar. À Karla por todos os *westerns* e IPs que eu só fazia se ela estivesse por perto, mesmo que fosse para dar apoio moral. À Simone, Lena e Audrey por sempre estarem dispostas a nos ajudar. Em especial à Tereza, por administrar o nosso caos, pelas palavras de incentivo e pela confiança.

Aos médicos, que nos dão todo o suporte necessário. Obrigada Fernando por todas as amostras e infinitas tabelas. Obrigada Paula por sempre estar disposta a

ajudar, sanar todas as minhas dúvidas malucas, ser minha consultora de indicações médicas e ser um exemplo de profissionalismo.

Aos alunos do laboratório de biologia molecular: Anamika, Andrana, Cris, Renata Giardini, Renata Scopin, João Agostinho, João Kleber, Marisa, Ada, Luciana, Laure, Aline, Juliana, Moisés, Rafaela, obrigada por tornarem o ambiente tão agradável de se trabalhar. Em especial a Fernanda Roversi, por todo apoio e ajuda durante o desenvolvimento desse projeto.

Às pesquisadoras Fabiola, Letícia, Patrícia e Mariana, obrigada por me auxiliar nos experimentos, pelas discussões esclarecedores, por toda a disponibilidade e por serem um grande exemplo.

À Dra. Maria Heloisa de Souza Lima Blotta, por disponibilizar seu laboratório e a aluna Lívia Furquim de Castro por toda ajuda, simpatia e disponibilidade.

Às secretárias, Patricia e Raquel, por estarem sempre dispostas a resolver nossos problemas.

Às agências de fomento CAPES e FAPESP.

Finalmente a Deus, pela minha vida, saúde e oportunidade de alcançar tantas conquistas maravilhosas na minha vida.

EPÍLOGO

*“Sonhos determinam o que você quer.
Ação determina o que você conquista.”*

Aldo Novak

RESUMO

A interação entre as células-tronco hematopoéticas (HSCs) e o microambiente da medula óssea (MO) é essencial para a regulação da hematopoese; e a interação entre as células leucêmicas e o microambiente é essencial para a leucemogênese. O microambiente é composto por diversos tipos celulares como: células endoteliais, osteoblastos e células mesenquimais estromais (MSCs). As células leucêmicas são capazes de modificar a interação com as MSCs e promover a leucemogênese. Nosso grupo de pesquisa identificou, por ensaio de microarranjo, a hiperexpressão do fator de crescimento vascular endotelial A (VEGFA) em células CD34⁺ e a hiperexpressão de Semaforina 3A (SEMA3A) em MSCs da MO de pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) do tipo ARSA. VEGFA é o fator pró-angiogênico mais estudado, está aumentado em pacientes com leucemia mieloide aguda (LMA) e correlaciona-se com pior prognóstico. SEMA3A é uma proteína secretada que parece ter efeitos antiangiogênicos em tumores sólidos. A competição entre VEGFA e SEMA3A pelo receptor neuropilina 1 (NRP1) tem sido discutida. O objetivo desse estudo foi entender a interação entre VEGFA e SEMA3A na MO de pacientes com SMD e LMA e sua função na patogênese. Para investigar a expressão gênica de VEGFA em células CD34⁺, recrutamos 18 pacientes com SMD e 16 com LMA e descrevemos, por RT-PCR, aumento da expressão de VEGFA em pacientes com LMA *de novo* comparado ao grupo controle (5,06 [0,42–57,52] vs 1,00 [0,8–2,19], P=0,0073). Para investigar a expressão gênica de SEMA3A em MSCs, recrutamos 25 pacientes com SMD e 17 com LMA e encontramos aumento da expressão de SEMA3A em todas as amostras comparando ao grupo controle: SMD de baixo risco (2,97 [0,64–24,39] vs 0,83 [0,43–2,86], P=0,028); SMD de alto risco (9,50 [2,34–22,60] vs 0,83 [0,43–2,86], P=0,005); LMA secundária (3,07 [0,97–6,97] vs 0,83 [0,43–2,86], P=0,05) e LMA *de novo* (5,73 [1,10–28,21] vs 0,83 [0,43–2,86], P=0,007). Para investigar os efeitos de VEGFA em células CD34⁺ normais e em células leucêmicas, nós hiperexpressamos VEGFA em células leucêmicas KG1 e células CD34⁺ de sangue de cordão umbilical. A hiperexpressão de VEGFA aumentou a viabilidade de células KG1 (124,4± 23,03% vs 100± 0,62%; P=0,03) e de células CD34⁺ (159,6± 41,2% vs 102,5 ± 16,93%; P=0,045); e a proliferação de células KG1 (107,7± 2,82%; P=0,042) e de células CD34⁺ (134,0± 7,68%; P=0,047); comparado ao controle. Para estudar a interação entre VEGFA e SEMA3A, hiperexpressamos SEMA3A em células HS5 e realizamos ensaios de cocultura. A cocultura de células KG1 ou CD34⁺ hiperexpressando VEGFA com células HS5 aumentou a proliferação (176,9± 46,34%; P=0,045) de células KG1 de células CD34⁺ (131,8± 7,9%; P=0,02). A cocultura de células KG1 ou CD34⁺ com células HS5 hiperexpressando SEMA3A diminuiu a proliferação (93,15± 0,79%; P=0,004) de células KG1; e de células CD34⁺ (72,73± 4,72%; P=0,009). Quando combinamos a hiperexpressão de VEGFA e de SEMA3A, os efeitos de SEMA3A são dominantes. Para investigar se o efeito dominante de SEMA3A está relacionado a competição por NRP1, realizamos ensaio de imunoprecipitação utilizando células HS5 e KG1 tratadas com as proteínas recombinantes VEGFA e SEMA3A. No tratamento combinado das duas proteínas recombinantes, há maior formação de complexos entre os receptores Plexina A4 e NRP1, favorecendo a sinalização de SEMA3A. Nossos resultados sugerem que a hiperexpressão de VEGFA confere vantagens às

células leucêmicas, aumentando a proliferação, e que SEMA3A parece anular os efeitos causados por VEGFA. Portanto, acreditamos que o uso de inibidores de VEGFA combinado com a proteína SEMA3A pode ser benéfico no tratamento dos pacientes.

Palavras-chave: Leucemia mielóide aguda, VEGFA, SEMA3A.

ABSTRACT

The cross-talk between hematopoietic stem cells (HSCs) and the bone marrow (BM) microenvironment is essential for hematopoiesis regulation; and the cross-talk between leukemic stem cells (LSCs) and the bone marrow (BM) microenvironment is essential for leukemogenesis. The BM microenvironment compromises several cellular types such as endothelial cells, osteoblasts and mesenchymal stromal cells (MSCs). LSCs are capable of modifying the interaction with MSCs and promoting leukemogenesis. Our group performed a microarray assay and identified VEGFA overexpression in CD34⁺ cells and SEMA3A overexpression in MSCs from bone marrow of myelodysplastic syndrome RARS patients. VEGFA is the most studied angiogenic factor; is increased in acute myeloid leukemia (AML) patients, and correlates with a worse prognosis. SEMA3A is a secreted protein that appears to have antiangiogenic effects in solid tumors. A competition between VEGFA and SEMA3A for the neuropilin 1 (NRP1) receptor binding has been reported. The aim of this study was to reach a better understanding of VEGFA and SEMA3A interaction in the bone marrow of MDS and AML patients and the role of this interaction in pathogenesis. To investigate VEGFA expression in CD34⁺ cells, we recruited 18 MDS and 15 AML patients and described, by RT-PCR, increased VEGFA expression in *de novo* AML patients compared to the control group (5.06 [0.42–57.52] vs 1.00 [0.8–2.19], P=0.0073). To investigate SEMA3A expression in MSCs, we collected 25 MDS and 17 AML bone marrow samples and we found increased SEMA3A expression in all samples compared to the control group: low-risk MDS (2.97 [0.64–24.39] vs 0.83 [0.43–2.86], P=0,028); High-risk MDS (9.50 [2.34–22.60] vs 0.83 [0.43–2.86], P=0.005); secondary AML (3.07 [0.97–6.97] vs 0.83 [0.43–2.86], P=0.05) and *de novo* AML (5.73 [1.10–28.21] vs 0.83 [0.43–2.86], P=0.007). In order to investigate VEGFA effects in AML cells and CD34⁺ normal cells, we overexpressed VEGFA in KG1 leukemic cells and in CD34⁺ from umbilical cord blood. The VEGFA overexpression increased KG1 (124.4± 23.03% vs 100± 0.62%; P=0.045) and CD34⁺ cells (159.6± 41.2% vs 102.5 ± 16.93%; P=0.042) viability; and KG1 (107.7± 2.82%; P=0.042) and CD34⁺ cells (134.0± 7.68%; P=0.047) proliferation compared to control cells. In order to investigate the interaction between SEMA3A and VEGFA, we overexpressed SEMA3A in HS5 stromal cell line and performed co-culture assays. The co-culture of KG1 or CD34⁺ cells overexpressing VEGFA with HS5 cells showed increased KG1 proliferation (176.9± 46.34%; P=0.045) and CD34⁺ proliferation (131.8± 7.9%; P=0.02). The co-culture of KG1 or CD34⁺ cells with HS5 cells overexpressing SEMA3A showed decreased KG1 proliferation (93.15± 0.79%; P=0.004) and CD34⁺ proliferation (72.73± 4.72%; P=0.009). When we combined VEGFA and SEMA3A overexpression, the effects of SEMA3A were dominant over VEGFA. To investigate whether the dominant effect of SEMA3A could be due to NRP1 competition, we performed immunoprecipitation assay using KG1 and HS5 treated with VEGFA and SEMA3A recombinant proteins. The combined treatment of VEGFA and SEMA3A proteins induced increased complex formation between NRP1 and Plexin A4 receptors, favoring SEMA3A signaling. Ours results suggest that VEGFA overexpression confer AML cells advantages by increasing proliferation.

SEMA3A seems to reverse the effects of VEGFA. We suggested that the use of SEMA3A protein combined with VEGFA inhibitors could be beneficial to AML patient's treatment.

Key-words: Acute myeloid leukemia mielóide aguda, VEGFA, SEMA3A.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. O MICROAMBIENTE DA MEDULA ÓSSEA.	19
FIGURA 2. ESTRUTURA DE SEMA3A E O COMPLEXO FORMADO COM SEUS RECEPTORES, NRP1 E PLEXINA A.	22
FIGURA 3. CLIVAGEM ALTERNATIVA DE VEGFA.....	24
FIGURA 4. OS RECEPTORES DE VEGFA.....	25
FIGURA 5. VEGFA ₁₆₅ E SUAS VIAS DE SINALIZAÇÃO.....	26
FIGURA 6. COMPETIÇÃO ENTRE VEGFA ₁₆₅ E SEMA3A PELO RECEPTOR NRP1.....	28
FIGURA 7. VERIFICAÇÃO DA PUREZA DE CÉLULAS CD34 ⁺	32
FIGURA 8. VERIFICAÇÃO DA PUREZA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS ESTROMAIS.	33
FIGURA 9. MAPA DO VETOR PLENTI.	36
FIGURA 10. MAPA DO VETOR PMIG.....	38
FIGURA 11. AUMENTO SIGNIFICATIVO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE VEGFA EM CÉLULAS CD34 ⁺ DE PACIENTES COM LMA DE NOVO COMPARADA AO GRUPO CONTROLE.	44
FIGURA 12. AUMENTO SIGNIFICATIVO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE SEMA3A EM MSCs DE PACIENTES COMPARADA AO GRUPO CONTROLE	45
FIGURA 13. HIPEREXPRESSÃO DE VEGFA.	46
FIGURA 14. A HIPEREXPRESSÃO DE VEGFA AUMENTOU A PROLIFERAÇÃO CELULAR.	48
FIGURA 15. HIPEREXPRESSÃO DE SEMA3A.....	49
FIGURA 16. OS EFEITOS DA HIPEREXPRESSÃO DE SEMA3A PARECEM SER DOMINANTES EM ENSAIOS DE COCULTURA COM AS LINHAGENS CELULARES KG1 E HS5.	52
FIGURA 17. O EFEITO DA HIPEREXPRESSÃO DE SEMA3A PARECE SER DOMINANTE EM ENSAIOS DE COCULTURA COM AS CÉLULAS CD34 ⁺ E HS5.....	55
FIGURA 18. ASSOCIAÇÃO PREFERENCIAL DO RECEPTOR NRP1 COM PLEXINA A4 AO INVÉS DE VEGFR2.....	57
FIGURA 19. LOOP PARÁCRINO-AUTÓCRINO.....	61
FIGURA 20. INTERAÇÃO ENTRE VEGFA E SEMA3A.....	64

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES.....	31
TABELA 2. CONCENTRAÇÃO E SEQUÊNCIA DOS INICIADORES.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AREB**- Anemia refratária com excesso de blastos
- ARSA**- Anemia refratária com sideroblastos em anel
- cDNA**- DNA complementar
- CRDM**- Citopenia refratária com displasia multilinear
- CRDU**- Citopenia refratária com displasia unilinhagem
- DMEM**- *Dulbecco's modified Eagle's medium*
- HPRT**- *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*
- HSC**- *Hematopoietic stem cell*
- LMA**- Leucemia mielóide aguda
- LMC**- Leucemia mielóide crônica
- LSC**- *Leukemic stem cell*
- MOI**- *Multiplicity of infection*
- MSC**- *Mesenchymal stromal cell*
- MTT**- Metil tiazol tretazólio
- NRP1**- *Neuropilin 1*
- PI**- Iodeto de propídeo
- RPMI**- *Roswell Park Memorial Institute medium*
- RT-PCR**- *Real time polymerase chain reaction*
- SFB**- Soro fetal bovino
- SEMA3A**- *Semaphorin 3A*
- SMD**- Síndrome mielodisplásica
- VEGF**- *Vascular endothelial growth factor*
- VEGFR**- *Vascular endothelial growth factor receptor*
- WHO**- *World health organization*

Sumário

INTRODUÇÃO	18
OBJETIVOS	29
Objetivo Geral	29
Objetivos Específicos	29
METODOLOGIA.....	30
Obtenção de amostras de pacientes.....	30
Processamento das amostras.....	31
Linhagens Celulares	33
Extração do RNA total.....	33
Transcrição em cDNA.....	34
PCR quantitativo (PCRq)	34
Construção de vetores e transdução de Lentivírus	35
Construção de vetores e nucleofecção	37
Imunoprecipitação de complexos proteicos e Western Blot.....	38
Ensaio de cocultura.....	39
Ensaio de viabilidade	40
Ensaio de proliferação	40
Avaliação de apoptose.....	41
Ensaio de formação de colônia.....	41
Análise Estatística.....	42
RESULTADOS	43
VEGFA está hiperexpresso em células CD34+ da medula óssea de pacientes com LMA <i>de novo</i>	43
SEMA3A está hiperexpresso em células mesenquimais estromais (MSCs) da medula óssea de pacientes com SMD e LMA.	44

A hiperexpressão de VEGFA resulta em aumento na proliferação de células KG1 e CD34 ⁺	45
Os efeitos de SEMA3A são dominantes em relação aos efeitos de VEGFA	49
Associação preferencial do receptor NRP1 com SEMA3A ao invés de VEGFA	56
DISCUSSÃO	58
CONCLUSÕES	65
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS	74
ANEXO I - Parecer do comitê de ética.....	74

INTRODUÇÃO

A hematopoese é o processo de geração de células sanguíneas maduras, de modo hierárquico, a partir de células-tronco hematopoéticas (do inglês *hematopoietic stem cells*, HSCs). As células-tronco hematopoéticas são capazes de se autorrenovar, garantindo a manutenção do grupo de células-tronco hematopoéticas, e de se diferenciar em progenitores multipotentes que geram progenitores cada vez mais comprometidos que originarão os diferentes tipos celulares do sangue [1]. A regulação das células-tronco hematopoéticas através do microambiente ocorre em uma arquitetura especializada da medula óssea denominada nicho. Existem dois tipos de nicho na medula óssea: o nicho endosteal, que se encontra mais próximo ao osso, e o nicho vascular que se encontra mais próximo aos vasos sanguíneos. Em ambos os nichos encontramos diversos tipos de células como as mesenquimais estromais (do inglês *mesenchymal stromal cells*, MSCs), células endoteliais, osteoblastos e macrófagos; e há também diversos tipos de moléculas solúveis como fatores de crescimento e citocinas (Figura 1). A interação entre essas células e moléculas é fundamental para a regulação das HSCs e da hematopoese [2, 3].

Leucemia mielóide aguda (LMA) é uma desordem clonal de progenitores hematopoéticos que causa a proliferação descontrolada de células malignas. As células leucêmicas surgem a partir de mutações em HSCs ou células progenitoras, e assim como as HSCs, as células leucêmicas possuem uma hierarquia. Uma subpopulação das células leucêmicas é denominada célula-tronco leucêmica (do inglês *leukemic stem cell*, LSC); essas células são capazes de se autorrenovar e acredita-se que são responsáveis pela resistência e recaída no tratamento das leucemias. Estudos recentes demonstraram que as LSCs são capazes de influenciar o microambiente, de modo a favorecer a leucemogênese, a proliferação e a sobrevivência das células leucêmicas [2]. Assim como em LMA, as síndromes mielodisplásicas (SMDs) também possuem um tipo de célula-tronco cancerígena, responsável pela propagação da doença [4]. As SMDs são desordens hematológicas

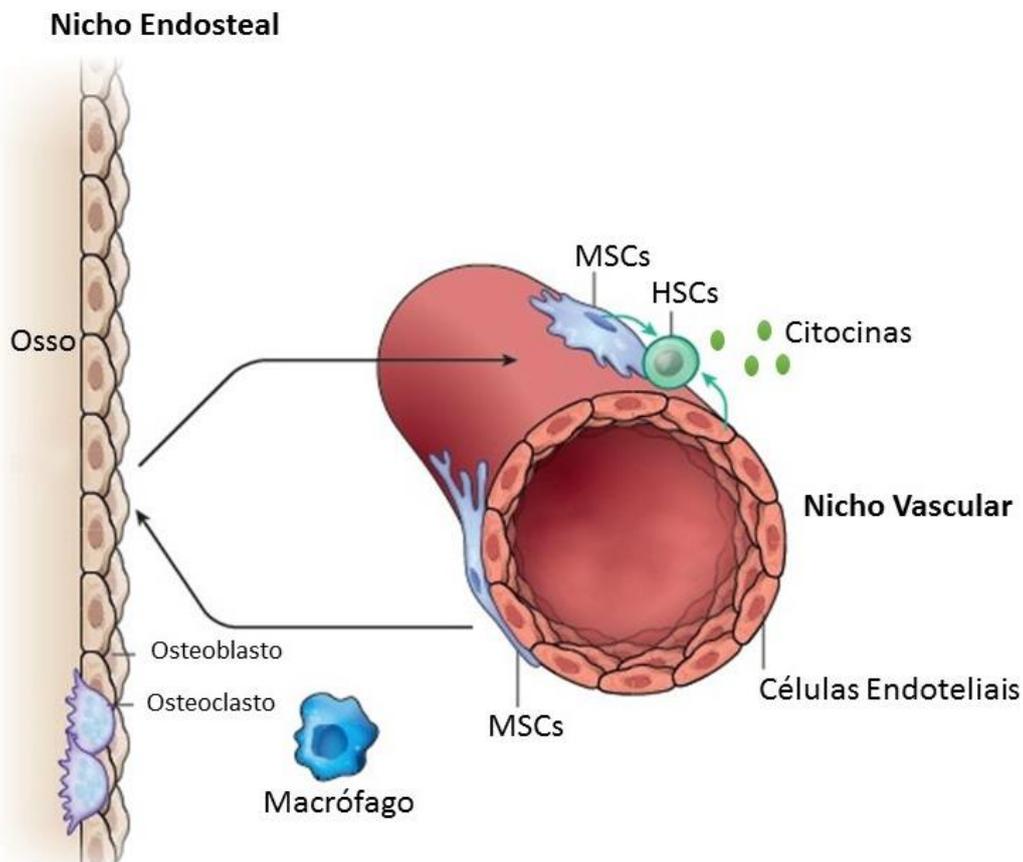


Figura 1. O microambiente da medula óssea. A figura representa o microambiente da medula óssea e seus dois nichos: O nicho vascular e o nicho endosteal. Encontramos na medula óssea diversas células como osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, células mesenquimais estromais (MSCs), células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e também moléculas solúveis como citocinas. A interação entre os componentes do microambiente regula a hematopoese (Adaptado de Morrison *et al.* 2014).

caracterizadas pela hematopoese ineficaz e pelo risco da progressão para LMA em aproximadamente um terço dos pacientes [5]. Em 1999, a Organização Mundial da Saúde (WHO) propôs uma classificação para SMD que associa imunofenotipagem e genética aos parâmetros clínicos, morfológicos e citoquímicos [6]. Essa classificação foi revisada em 2008 e os subgrupos foram denominados: Anemia refratária com excesso de blastos ou AREB-1 (5 a 9%

de blastos na MO); anemia refratária com excesso de blastos ou AREB-2 (10 a 19% de blastos na MO); anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA); citopenia refratária com displasia unilinear (CRDU); citopenia refratária com displasias multilinear (CRDM); síndrome mielodisplásica não classificada (SMD-N) e SMD associada com deleção isolada no braço longo do cromossomo 5 (SMD 5q-) [7].

Um estudo do nosso grupo de pesquisa descreveu, através de ensaios de microarranjo, aumento da expressão do gene VEGFA em células progenitoras CD34⁺ da medula óssea de pacientes com SMD do tipo ARSA, e aumento da expressão do gene SEMA3A nas MSCs desses pacientes [8]. Considerando que a interação entre as LSCs e o microambiente é fundamental para a leucemogênese, o estudo desses genes pode ajudar a compreender melhor a patogênese de SMDs e LMAs e possivelmente identificar novos alvos terapêuticos.

Em 1993 foi descrita a primeira semaforina, inicialmente denominada colapsina, apontada como responsável pelo colapso de cones de crescimento no sistema nervoso [9]. As semaforinas foram caracterizadas pelo seu papel fundamental no sistema nervoso, porém na última década descobriu-se que elas são essenciais em diversos sistemas como o imune, o cardiovascular, o respiratório e em processos como organogênese, tumorigênese e no metabolismo de ossos [10].

A família das semaforinas é composta por mais de 20 proteínas diferentes cuja característica principal é a presença do domínio sema que é composto por aproximadamente 500 aminoácidos altamente conservados e estão localizado na porção N-terminal [11]. As semaforinas são divididas em oito classes: As classes 1 e 2 são encontradas em invertebrados; as classes de 3 a 7 são encontradas em vertebrados; e a classe V é encontrada somente em vírus. As semaforinas classe 3 são as únicas proteínas secretadas da família, as demais se apresentam na forma de proteínas membranares [12]. A primeira semaforina identificada e também a mais estudada é a SEMA3A.

O gene humano SEMA3A está localizado no cromossomo 7p12.1 e codifica uma proteína que possui aproximadamente 770 aminoácidos, forma

homodímeros e é composta pelos domínios sema, PSI (Plexina-Semaforina-Integrina), Imunoglobulina e C-terminal básico [12, 13] (Figura 2A). A interação entre as semaforinas e o receptor plexina é necessária para a tradução do sinal extracelular para as vias de sinalização intracelulares [10].

A família de receptores plexina possui 9 membros que estão divididos em 4 subfamílias (A, B, C e D). Os 4 tipos de plexinas A possuem na porção extracelular um domínio Sema, de dois a três domínios PSI e três domínios IPT (domínio compartilhado por imunoglobulinas, plexinas e fatores de transcrição). Na porção intracelular elas possuem um domínio R-Ras/M-Ras GAP dividido ao meio por um domínio de ligação de Rho GTPases (RBD) [14] (Figura 2A). As semaforinas classe 3 precisam de uma plexina A para traduzir seu sinal, porém elas são incapazes de ligar-se diretamente a plexinas, sendo imprescindível a ligação a um receptor mediador, a neuropilina (NRP) [10]. A semaforina SEMA3A tem afinidade exclusiva à neuropilinas de classe 1, que são compostas por dois domínios CUB [Proteínas do sistema complemento C1r/C1s-uEGF (Família do fator de crescimento epidermal) -Bmp1 (Proteína morfogênica do osso)] (A1 e A2), dois domínios homólogos aos fatores de coagulação V/VIII (B1 e B2) e um domínio MAM (Meprina-antígeno A5-Receptor tirosina fosfatase μ) [15] (Figura 2A). Portanto, para ocorrer a sinalização estimulada por SEMA3A há a formação de um complexo entre os domínios sema dos homodímeros de SEMA3A e os domínios A1 e A2 do receptor NRP1. As plexinas A (1-4) interagem com o domínio A1 do receptor NRP1 que conseqüentemente estabiliza a ligação entre os domínios sema das plexinas e das semaforinas [16] (Figura 2B).

Os mecanismos moleculares que mediam as funções de SEMA3A ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que a principal sinalização de plexinas é através da regulação de pequenas proteínas G como Rnd1, R-Ras, Rac1 e RhoD, influenciando a adesão celular e a organização do citoesqueleto [10]. SEMA3A está envolvido em processos fisiológicos como a formação de ossos, suprimindo a reabsorção óssea pelos osteoclastos e aumentando a formação de ossos pelos osteoblastos [17], e na resposta imune, inibindo a proliferação de células T e a secreção de citocinas [18]. Além disso, SEMA3A parece ter

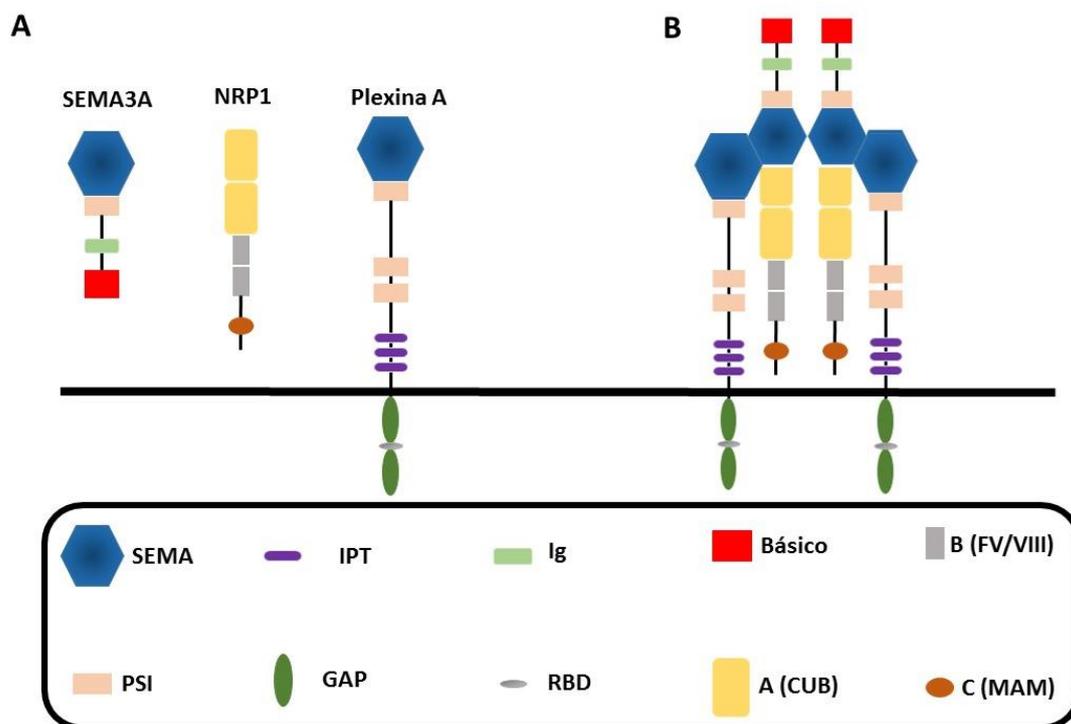


Figura 2. Estrutura de SEMA3A e o complexo formado com seus receptores, NRP1 e Plexina A. **A.** Estrutura da proteína SEMA3A: um domínio sema, um domínio PSI (Plexina-Semaforina-Integrina), um domínio imunoglobulina e um domínio C-terminal básico. Estrutura do receptor NRP1: dois domínios CUB (C1c/C1s-uEGF-BMP1) (A1 e A2), dois domínios homólogos aos fatores de coagulação V/VIII (B1 e B2) e um domínio MAM (Meprina-A5-Tirosina Fosfatase μ) (C). Estrutura dos receptores Plexina A (1-4): um domínio sema, de dois a três domínios PSI, três domínios IPT (Imunoglobulina-Plexina-Fatores de transcrição) e um domínio GAP dividido por um sitio de ligação de Rho GTPases (RBD). **B.** A formação do complexo entre SEMA3A, NRP1 e Plexina A ocorre a partir da interação do domínio sema dos homodímeros de SEMA3A e os domínios A1 e A2 do receptor NRP1. As plexinas A (1-4) interagem com o domínio A1 do receptor NRP1 que consequentemente estabiliza a ligação entre os domínios sema das plexinas e das semaforinas (Adaptado de Goshima *et al.* 2012).

efeitos antiangiogênicos, pois inibiu a migração e a sobrevivência de células endoteliais [11]. Em processos patológicos, a baixa expressão de SEMA3A está relacionada à piora dos sintomas de pacientes com dermatite atópica [19]

e à incidência de epilepsia do lobo frontal [20]. Em contraste, o aumento da expressão de SEMA3A está associada à patogênese de doença de Alzheimer [21], esclerose lateral amiotrófica (ELA) [22] e parece inibir a regeneração de tecido após isquemia cerebral [23].

Em câncer de mama e próstata, SEMA3A induziu menor migração e invasão [24], correlacionou-se positivamente com melhor prognóstico de pacientes com câncer de língua [25] e inibiu a atividade angiogênica de células de pacientes com mieloma múltiplo [26]. Em contraposição, SEMA3A está envolvido na patogênese de glioblastoma [27] e na progressão e metástase de câncer pancreático [28] e câncer de cólon [29]. Essa característica ambígua de SEMA3A sugere que seu efeito seja tecido-específico e sua sinalização dependa da influência de fatores de crescimento [13].

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, através de ensaios de microarranjo, relatamos aumento da expressão de SEMA3A em células de estroma de pacientes com SMD com sideroblastos em anel [8]. Moretti e colaboradores descreveram que SEMA3A pode induzir apoptose na célula leucêmica-T Jurkat mediada via Fas [30] e Wang e colaboradores encontraram menor expressão de SEMA3A em células não aderentes da medula óssea de pacientes com LMA e Leucemia mielóide crônica (LMC) comparada ao grupo controle [31]. Pouco se sabe sobre a influência de SEMA3A em LMA e SMD, porém, esses dados indicam que SEMA3A possa estar envolvida na patogênese dessas doenças.

Um segundo gene foi objeto de estudo desta tese, o gene VEGFA que estava hiperexpresso em células CD34⁺ da medula óssea de pacientes com SMD com sideroblastos em anel [8]. Na década de 80 foi descrito um fator capaz de estimular a proliferação e a migração de células endoteliais denominado fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). VEGF faz parte de uma grande família de glicoproteínas diméricas secretadas que possuem em comum o domínio “*cysteine knot*”, composto por um nó de cistina formado por oito resíduos de cisteína ligados por pontes de dissulfeto. A família VEGF possui seis membros: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE e o fator de crescimento placentário PIGF [32]. O membro mais estudado da família é o VEGFA, referido também como VEGF.

O gene humano VEGFA está localizado no cromossomo 6p21.3 e codifica um pré-mRNA de aproximadamente 14kb que possui 8 éxons separados por 7 íntrons. Devido à clivagem alternativa, o gene VEGFA apresenta diversas isoformas, sendo VEGFA₁₆₅ [33] a mais frequente. Todas as isoformas mantêm os éxons de 1 a 5 que codificam respectivamente, a região sinalizadora, a porção N-terminal, o sítio de ligação do receptor VEGFR1, o sítio de ligação do receptor VEGFR2 e um sítio de clivagem de Plasmina. A isoforma VEGFA₁₆₅, tem a perda do éxon 6, responsável por codificar parte do sítio de ligação de heparina. Há também a criação de um stop códon na parte final do domínio C-terminal que é codificado pelo éxon 8 [34, 35] (Figura 3).

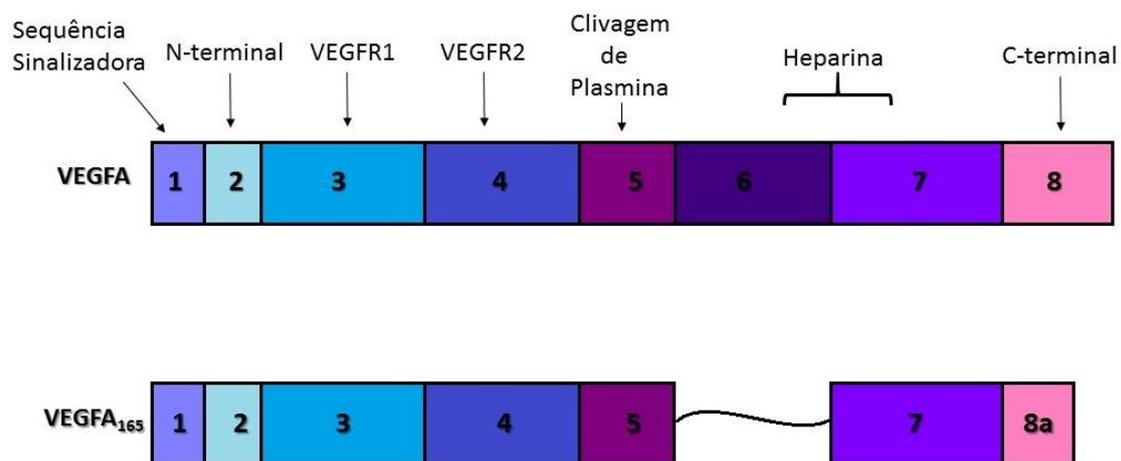


Figura 3. Clivagem alternativa de VEGFA. Está representado na figura VEGFA com seus éxons e domínios proteicos devidamente identificados. VEGFA sofre clivagem alternativa e uma das isoformas resultantes é a VEGFA₁₆₅, que perde o éxon 6 e a parte final do éxon 8 (Adaptado de Fearnley *et al.* 2013).

Os receptores mais descritos para VEGFA₁₆₅ são duas proteínas tirosina-quinase: o VEGFR1 e o VEGFR2. Ambos possuem na porção extracelular sete domínios de imunoglobulinas, uma região transmembranar e um domínio citoplasmático tirosina-quinase (TK) segmentado (Figura 4).

VEGFR1 e VEGFR2 possuem 44% de homologia e podem formar homodímeros ou heterodímeros. VEGFA₁₆₅ tem maior afinidade a VEGFR1, porém a atividade quinase é menor comparada à interação entre VEGFR2 e VEGFA₁₆₅ [36].

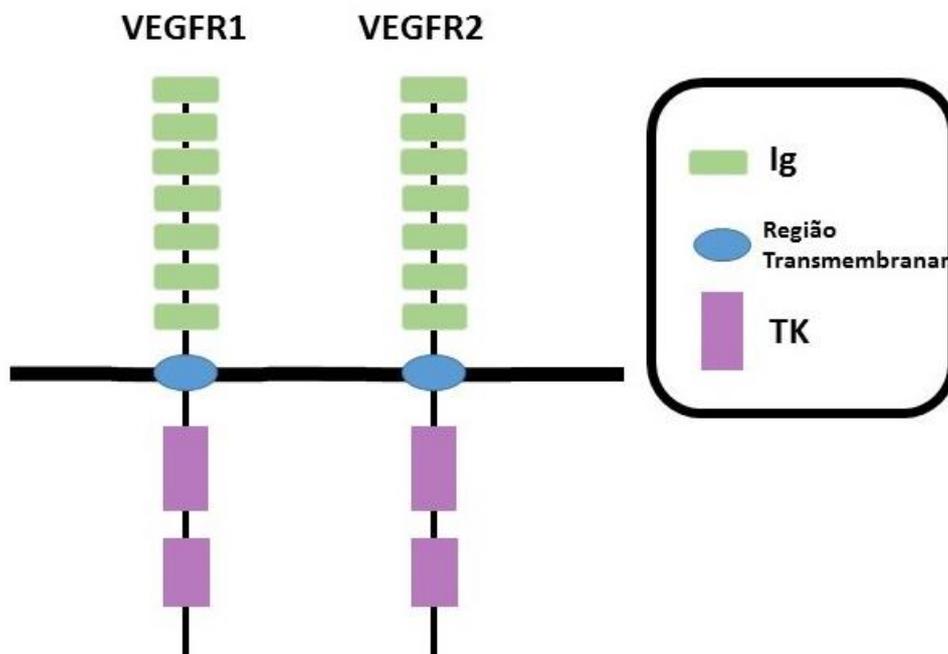


Figura 4. Os receptores de VEGFA. Os dois receptores tirosina-quinase para VEGFA são VEGFR1 e VEGFR2. Eles têm 44% de homologia e são compostos por sete domínios de imunoglobulina na porção extracelular, uma região transmembranar e um domínio citoplasmático tirosina-quinase (TK) segmentado (Adaptado de Neufeld *et al.* 1999).

A interação entre VEGFA e VEGFR2 inibe a apoptose de células endoteliais via PI3K [37], estimula a sobrevivência via AKT [38], induz a expressão de moléculas antiapoptóticas como BCL-2 [39] e XIAP [40], estimula a proliferação via ERK1 e ERK2 [41], induz a migração de células endoteliais via p38 MAPK [42] e aumenta a permeabilidade vascular estimulando a formação de óxido nítrico (NO) [38] (Figura 5). A via de sinalização desencadeada pela interação entre VEGFA₁₆₅ e VEGFR1 ainda não está completamente elucidada, mas acredita-se que seu papel fisiológico primário é regular negativamente VEGFA, principalmente durante a embriogênese [43],

limitando sua ligação à VEGFR2 [44] (Figura 5). Posteriormente, foi descrito um outro receptor com afinidade a VEGFA₁₆₅, a neuropilina 1 (NRP1). Acredita-se que NRP1 aja como coreceptor, aumentando a afinidade entre VEGFA₁₆₅ e os receptores VEGFR1 e VEGFR2, podendo potencializar seus efeitos [45].

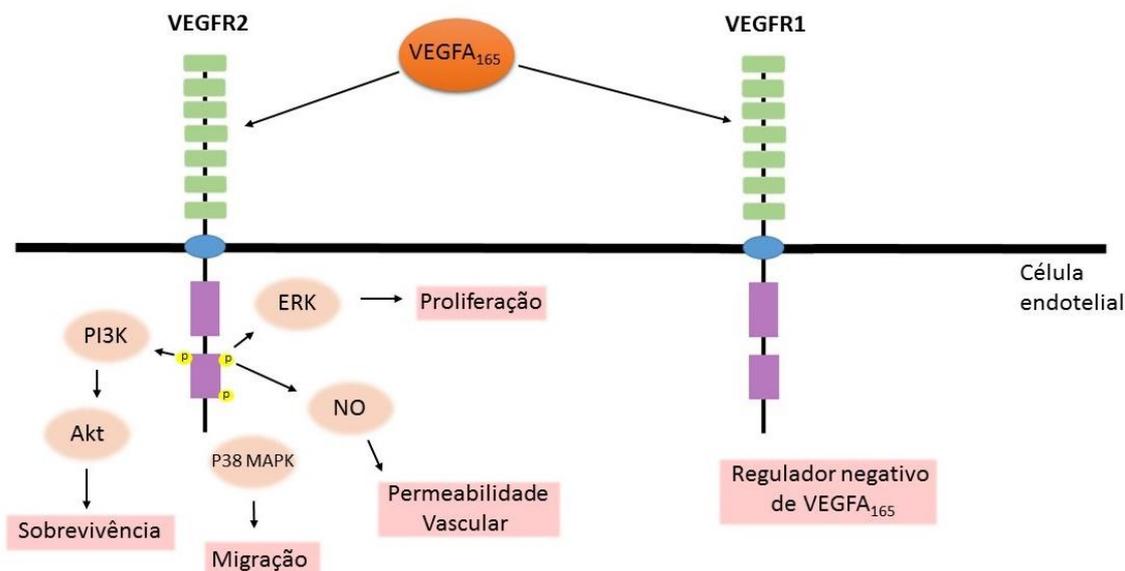


Figura 5. VEGFA₁₆₅ e suas vias de sinalização. A interação entre VEGFA₁₆₅ e o receptor VEGFR2 promove a sobrevivência, migração, proliferação e aumenta a permeabilidade vascular em células endoteliais. A via de sinalização desencadeada pela interação entre VEGFA₁₆₅ e o receptor VEGFR1 ainda não está elucidada, mas foi sugerido seu papel como regulador negativo de VEGFA₁₆₅ (Adaptado de Fearnley *et al.* 2013).

VEGFA₁₆₅ é o fator pró-angiogênico mais conhecido, e tem papel essencial em processos fisiológicos como angiogênese, vasculogênese [32] e hematopoese [46]. Em praticamente todos os tumores sólidos estudados há aumento de VEGFA₁₆₅ [43] e esse aumento foi associado ao risco de invasão, metástase e a pior prognóstico [47]. Em relação a doenças hematológicas, diversos estudos mostraram aumento dos níveis séricos de VEGFA₁₆₅, na biopsia de medula e na expressão gênica em pacientes e linhagens celulares de LMA [46]. Os dados da expressão de VEGFA₁₆₅ em SMD são controversos

[48-52]. Estudos relatam que, além do papel clássico de VEGFA₁₆₅ na indução de angiogênese a partir do estímulo de células endoteliais, causando aumento da microdensidade vascular em pacientes com leucemia, as células leucêmicas sejam capazes de produzir VEGFA₁₆₅ e, de forma autócrina, utilizá-lo para aumentar sua proliferação e sobrevivência. Pode haver ainda uma interação de forma parácrina, onde o VEGFA₁₆₅ produzido pelas células leucêmicas estimula as células do microambiente da medula óssea a produzir e liberar citocinas e fatores de crescimento a seu favor [46].

A neuropilina 1 tem alta afinidade com as proteínas solúveis VEGFA₁₆₅ e SEMA3A agindo como coreceptor e formando complexos com VEGFR e Plexinas A respectivamente, mediando sua sinalização intracelular [15]. A formação do complexo NRP1-VEGFR2-VEGFA₁₆₅ potencializa os efeitos desencadeados pela interação entre VEGFA₁₆₅ e VEGFR2, que foram implicados na tumorigênese, crescimento tumoral e metástase [47]. Em contraste, a formação do complexo NRP1-PlexinaA-SEMA3A é necessário para a sinalização desencadeada por SEMA3A que não é capaz de ligar-se diretamente a Plexina A [10]. Os efeitos desencadeados pela interação entre SEMA3A e Plexinas A estão relacionados à menor migração e invasão de diversos tipos de câncer [13] e melhor prognóstico [14]. Alguns autores sugerem que esses efeitos antagônicos estejam relacionados à competição pelo receptor NRP1 [15, 53, 54]. VEGFA₁₆₅ interage com os domínios b1 e b2 de NRP1, enquanto SEMA3A interage com os domínios a1 e a2 e potencialmente com o domínio b1 [55] (Figura 6). Essa sobreposição no domínio b1 pode inviabilizar a ligação de VEGFA₁₆₅ e SEMA3A simultaneamente, porém essa afirmação é bastante controversa [15].

Diversos estudos demonstram que VEGFA₁₆₅ e SEMA3A possuem papéis antagônicos em tumores sólidos e que SEMA3A parece reverter os efeitos causados por VEGFA₁₆₅ [47, 56]. Nosso grupo de estudo relatou aumento de VEGFA₁₆₅ nas células CD34⁺ de pacientes com SMD e aumento de SEMA3A em células do estroma desses pacientes [8]. Considerando a participação de VEGFA₁₆₅ na patogênese de LMA e SMD e o pouco conhecimento sobre a função de SEMA3A no microambiente da medula óssea, surgem as seguintes questões: O antagonismo nas ações VEGFA₁₆₅ e

SEMA3A também ocorre nas células da medula óssea? SEMA3A poderia reverter os efeitos causados pelo VEGFA₁₆₅ produzido pelas células leucêmicas? Se sim, esse efeito seria dependente do receptor NRP1?

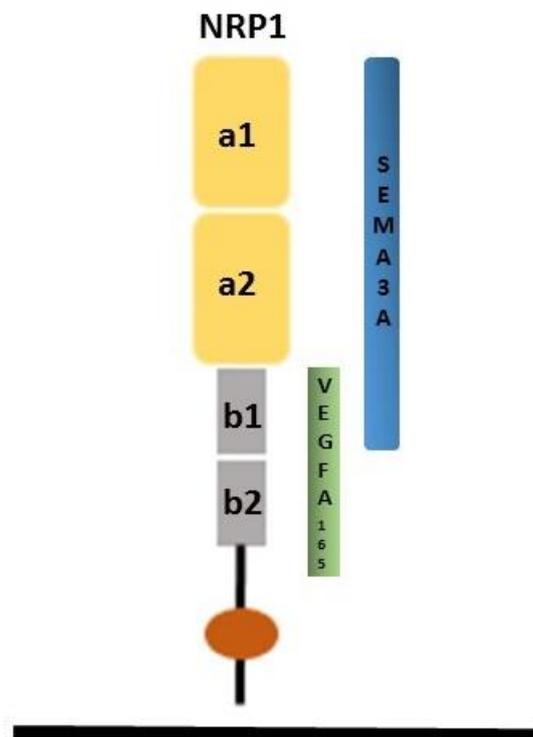


Figura 6. Competição entre VEGFA₁₆₅ e SEMA3A pelo receptor NRP1. A figura ilustra o receptor NRP1 e sua interação com SEMA3A através dos domínios a1, a2 e b1; e a interação com VEGFA₁₆₅ através dos domínios b1 e b2. Há sobreposição de VEGFA₁₆₅ e SEMA3A no domínio b1 (Adaptado de Almodovar *et al.* 2009).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a interação de VEGFA e SEMA3A em progenitores hematopoéticos normais e em células leucêmicas KG1.

Objetivos Específicos

- a. Caracterizar a expressão gênica de VEGFA em células CD34⁺ e a expressão de SEMA3A em MSCs provenientes de amostras de medula óssea de pacientes com SMD, LMA e doadores saudáveis.
- b. Hiperexpressar o gene VEGFA em linhagem celular leucêmica KG1 e em células CD34⁺ isoladas de sangue de cordão umbilical. Estudar os efeitos da hiperexpressão de VEGFA na proliferação e viabilidade celular, na apoptose e na clonogenicidade.
- c. Hiperexpressar o gene SEMA3A em linhagem de célula estromal HS5 e realizar ensaios de cocultura com células KG1 ou CD34⁺, submetidas ou não à hiperexpressão de VEGFA. Avaliar os efeitos na proliferação, apoptose e na clonogenicidade das células KG1 ou CD34⁺ cocultivadas com células HS5.
- d. Analisar a formação de complexos entre VEGFA, SEMA3A, seus respectivos receptores e o coreceptor NRP1 em ensaio de imunoprecipitação, utilizando proteínas recombinantes.

METODOLOGIA

Obtenção de amostras de pacientes

Pacientes e doadores saudáveis, que assinaram o termo de consentimento, tiveram a amostra de medula óssea encaminhada para pesquisa com coleta concomitante à realização de coleta para diagnóstico ou doação de medula. Os pacientes com diagnóstico confirmado foram atendidos pelo serviço médico do Hemocentro da Unicamp entre os anos de 2006 e 2016. O projeto foi submetido para apreciação do Comitê de Ética da UNICAMP e recebeu parecer favorável (CEP: 1209/2011). Para a análise da expressão gênica foram selecionados 13 doadores saudáveis, 32 pacientes com SMD (23 baixo risco; 09 alto risco) e 28 pacientes com LMA [06 LMA com alterações relacionadas à mielodisplasia (Referida nesse trabalho como LMA secundária); 22 LMA *de novo*], foram excluídos pacientes com LMA subtipo M3. Dentre os pacientes selecionados, 06 com SMD de baixo risco, 05 com SMD de alto risco, 03 com LMA secundária e 01 com LMA *de novo* foram utilizados para obtenção de células CD34⁺ e também MSCs. A classificação empregada foi a *World Health Organization* (WHO) do ano de 2008 modificada [7] e os pacientes não tinham iniciado o tratamento no momento da coleta. As características dos pacientes das amostras de CD34⁺ e MSCs estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Características dos pacientes.

	CD34 ⁺	MSCs
Controle	8	5
Sexo (Masculino/Feminino)	3/5	4/1
Idade (anos), mediana (faixa)	40 (29-49)	40 (28-54)
SMD	18	25
Sexo (Masculino/Feminino)	12/6	18/7
Idade (anos), mediana (faixa)	69 (27-77)	70 (16-90)
Baixo-risco (CRDU/ CRDM/ARSA)	11 (0/9/2)	18 (0/16/2)
Alto-risco (AREB-1/ AREB-2)	7 (1/6)	7 (2/5)
LMA	15	17
Sexo (Masculino/Feminino)	4/11	7/10
Idade (anos), mediana (faixa)	63 (34-87)	63 (30-86)
Secundária/ <i>de novo</i>	4/11	5/12

Abreviações: MSCs, células mesenquimais estromais; SMD, síndrome mielodisplásica; CRDU, citopenia refratária com displasia unilinhagem; CRDM, citopenia refratária com displasia multilinhagem; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; LMA, leucemia mielóide aguda; AREB, anemia refratária com excesso de blastos.

Para ensaios de hiperexpressão, células CD34⁺ foram isoladas de sangue de cordão umbilical pós-parto. As amostras foram processadas até 48 horas após a coleta e as doadoras assinaram um termo de consentimento.

Processamento das amostras

Para a obtenção de progenitores CD34⁺, células mononucleares de medula óssea ou de sangue de cordão umbilical foram isoladas por centrifugação de gradiente de densidade com Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare), incubadas com CD34 MicroBeads (Miltenyi Biotec) e separadas

utilizando colunas magnéticas MACS de separação celular, seguindo as instruções do fabricante. A eficiência da separação foi averiguada por citometria de fluxo e foram utilizadas no estudo apenas as amostras com pureza superior a 85% (Figura 7).

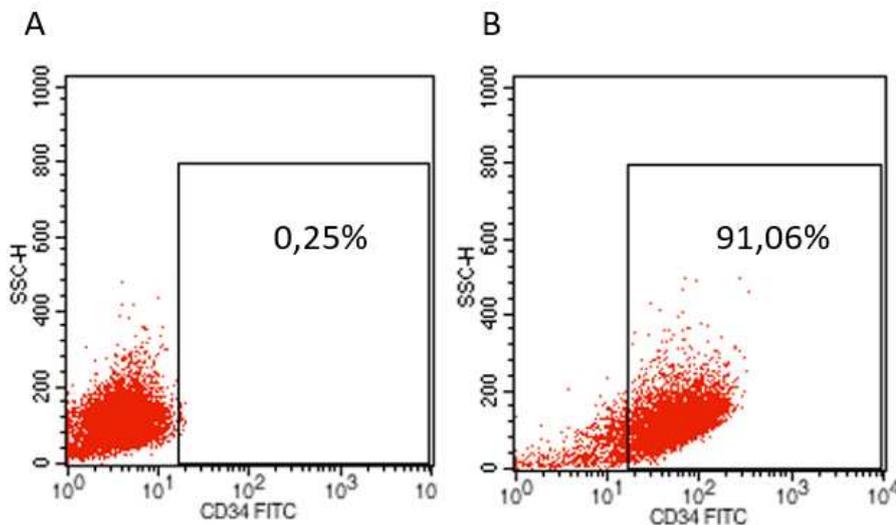


Figura 7. Verificação da pureza de células CD34⁺. Após a seleção magnética, as células foram analisadas por citometria de fluxo. A. Foi utilizado um controle negativo contendo apenas as células selecionadas sem marcação. B. Células selecionadas incubadas com o anticorpo anti-CD34 FITC por 20 minutos a temperatura ambiente, mostrando que 91% das células isoladas eram CD34⁺.

As células CD34⁺ negativas foram mantidas em cultura em meio DMEM com 10% SFB. Após 3 dias as células não aderentes foram removidas. As células aderentes foram cultivadas até a 4^a passagem obtendo as MSCs. A imunofenotipagem foi analisada por citometria de fluxo para a ausência dos antígenos CD31, CD34, CD45, CD68 e HLA-DR; e para a presença dos antígenos CD73, CD90 e 105 (Figura 8). As células foram submetidas a ensaios funcionais ou extração de RNA.

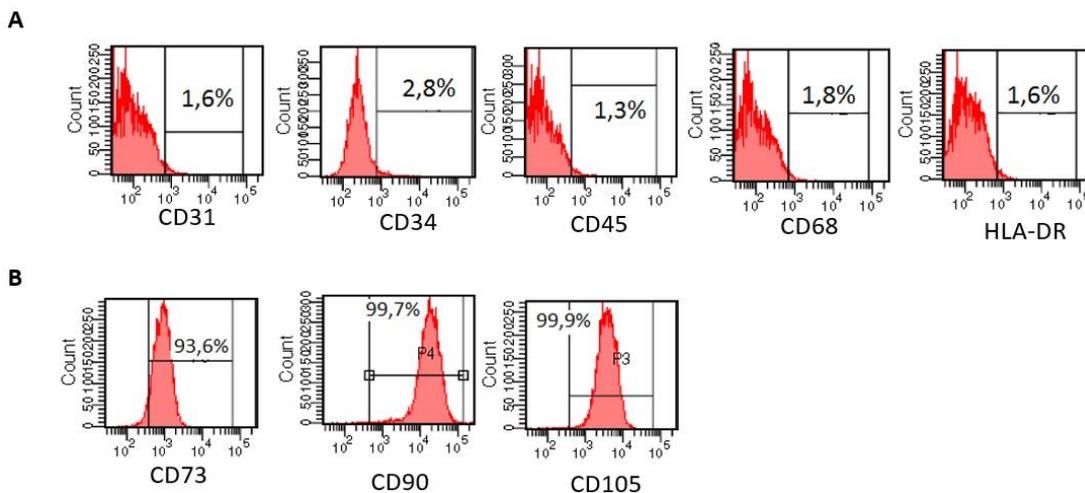


Figura 8. Verificação da pureza de células mesenquimais estromais. Após a remoção de células não aderentes e o cultivo das células aderidas até a quarta passagem, foi feita a análise por citometria de fluxo. A. As células aderentes foram incubadas com os anticorpos anti-CD31, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD68 e anti-HLA-DR por 20 minutos a temperatura ambiente, mostrando que as células aderentes não possuíam esses marcadores de superfície. B. As células aderentes foram incubadas com os anticorpos anti-CD73, anti-CD90 e anti-CD105 por 20 minutos a temperatura ambiente, mostrando que mais de 90% das células aderentes possuíam esses marcadores de superfície.

Linhagens Celulares

A linhagem celular leucêmica KG1, que expressa o antígeno CD34 [57], e a linhagem celular HS5, obtida a partir de células mesenquimais estromais humanas [58], foram obtidas da ATCC, Philadelphia, PA. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 contendo 10% de soro fetal bovino, 2mM glutamina, 100 mg/mL penicilina, 100 mg/mL estreptomicina, 0,25 mg/mL anfotericina B e mantidas em atmosfera umidificada à 37°C, 5% CO₂.

Extração do RNA total

O RNA das células foi isolado utilizando o kit Illustra RNAspin Mini (GeHealthcare Life Sciences) seguindo as instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000

Spectrophotometer) com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO à 260 nm equivale a 40 mg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas.

Transcrição em cDNA

1 µg de RNA total de cada amostra foi transcrito reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) numa reação de volume final de 20 µL (ThermoScientific). A reação foi iniciada adicionando-se 1 µL de oligonucleotídeo 500 µg/mL ao RNA, aquecida por 5 minutos a 65°C e, em seguida, incubada no gelo. Adicionou-se então, 2µL da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), 4 µL do tampão de reação 5x (Contendo: 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ e 0,1 M DTT), 20 U da enzima RiboLock Rnase Inhibitor, que protege o RNA da degradação, e 200 U da enzima RevertAid M-MuL V RT, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 60 minutos à 42°C e a seguir, 05 minutos à 70°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer).

PCR quantitativo (PCRq)

Amplificação em tempo real foi realizada no MasterCycler ep Realplex (Eppendorf) utilizando o reagente Power SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems). Quarenta nanogramas de cada amostra de cDNA foram utilizadas nas reações. As concentrações e as sequências dos iniciadores estão descritas na Tabela 2. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. As reações de PCR foram realizadas em triplicatas. A expressão gênica de HPRT foi utilizada como controle endógeno da reação. A quantificação relativa das expressões de cada gene normalizado pelo controle endógeno foi calculada utilizando a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ [59].

Tabela 2. Concentração e Sequência dos Iniciadores.

Gene	Concentração	Sequência dos iniciadores
<i>VEGFA</i>	300 nM	FW: 5'-ATCGAGACCCTGGTGG ACAT-3'
		RW: 5'-GTGCTGGCCTTGGTGAGG-3'
<i>SEMA3A</i>	600 nM	FW: 5'-TGTATGTTGGAGCAAAGGAT-3'
		RW: 5'-TCTGGTGTAAGATACTGGCC -3'
<i>HPRT</i>	150 nM	FW: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA -3'
		RW: 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3'

Construção de vetores e transdução de Lentivírus

Para a hiperexpressão em linhagens celulares, foi utilizado o sistema de recombinação sítio específica lentiviral Gateway Destination (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante (Figura 9 A). De forma resumida, o gene *VEGFA* 165 humano, de 570 pares de bases (Origene), ou o gene *SEMA3A* humano, de 2300 pares de base (Origene), foram inseridos no vetor pENTR1A Dual Selection Vector (Invitrogen) e recombinados para o vetor pLenti6.2/V5-Dest (Invitrogen). O controle utilizado foi o vetor pLenti6/V5-GW/lacZ (Invitrogen) (Figura 9 B).

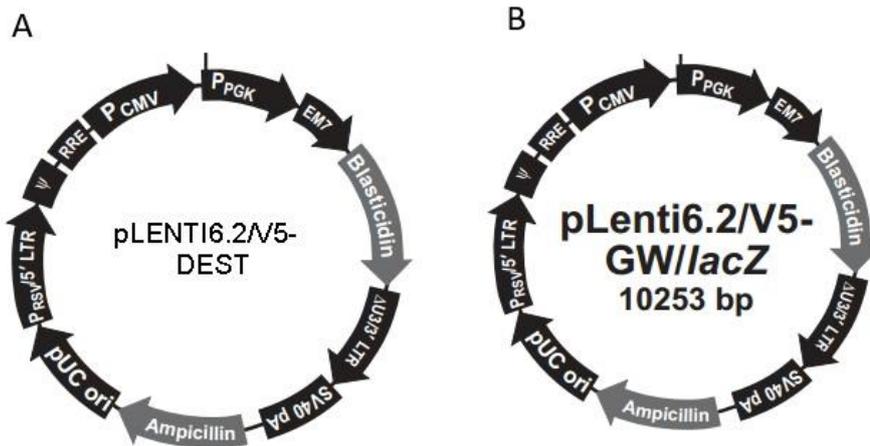


Figura 9. Mapa do vetor pLenti. O vetor pLenti foi utilizado para hiperexpressão em linhagens celulares. A. Mapa do vetor utilizado para clonar e hiperexpressar os genes VEGFA₁₆₅ e SEMA3A em linhagens leucêmica e estromal respectivamente. B. Mapa do vetor contendo o gene Lacz, utilizado como controle.

Para a hiperexpressão de VEGFA, células KG1 foram transduzidas com lentivírus contendo o gene VEGFA 165 ou o controle Lacz e nomeadas como KG1 VEGFA e KG1 Lacz respectivamente. Resumidamente, 2×10^5 células foram transduzidas através da técnica de inoculação por centrifugação, que consiste em centrifugar as células por 60 minutos à 800g na presença de $3 \mu\text{g/mL}$ de polibrene (Sigma). Foram utilizadas 5 partículas virais por célula (multiplicity of infection; MOI). Após a transdução as células foram selecionadas com $1 \mu\text{g/mL}$ de blasticidina (Sigma) por 15 dias.

Para a hiperexpressão de SEMA3A, células HS5 foram transduzidas com lentivírus contendo o gene SEMA3A ou o controle Lacz e nomeadas como HS5 SEMA3A e HS5 Lacz respectivamente. Resumidamente, 2×10^5 células foram semeadas em placa de 6 poços e incubadas por 12 horas para aderir. Em seguida, a quantidade de vírus equivalente ao MOI 5 e $3 \mu\text{g/mL}$ de polibrene (Sigma) foram adicionados ao meio e as células foram novamente incubadas por 12 horas. Após a troca do meio de cultura, as células foram selecionadas com $1 \mu\text{g/mL}$ de blasticidina (Sigma) por 15 dias.

Ao final da seleção por blasticidina, a expressão gênica e proteica de VEGFA e SEMA3A foram determinadas por PCRq e Western blot respectivamente. As células foram cultivadas em meio RPMI 10% SFB e utilizadas em ensaios funcionais.

Construção de vetores e nucleofecção

Para a hiperexpressão em células CD34⁺ de sangue de cordão umbilical a técnica utilizada foi a nucleofecção, que é um método de transfecção desenvolvido para células primárias baseado na combinação de tampão e pulso elétrico específicos para cada tipo celular, tornando possível a inserção do DNA diretamente no núcleo das células de interesse [60]. De forma resumida, o gene VEGFA 165 humano (Origene) foi clonado no vetor pMig [61] e o controle utilizado foi o vetor vazio (Figura 10). As células CD34⁺ foram nucleofectadas com os vetores pMig-VEGFA ou pMig vazio utilizando o kit P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit (Lonza) com o programa EO-100 para o aparelho Amaxa 4D-Nucleofector de acordo com as instruções do fabricante. As células foram nomeadas CD34⁺ MIG VEGFA ou CD34⁺ MIG respectivamente. Após 24 horas, a expressão gênica de VEGFA foi determinada por PCRq. As células foram cultivadas em meio DMEM 20% SFB, 50ng/mL Stem Cell Factor e 10ng/mL Interleucina-3 e utilizadas em ensaios funcionais.

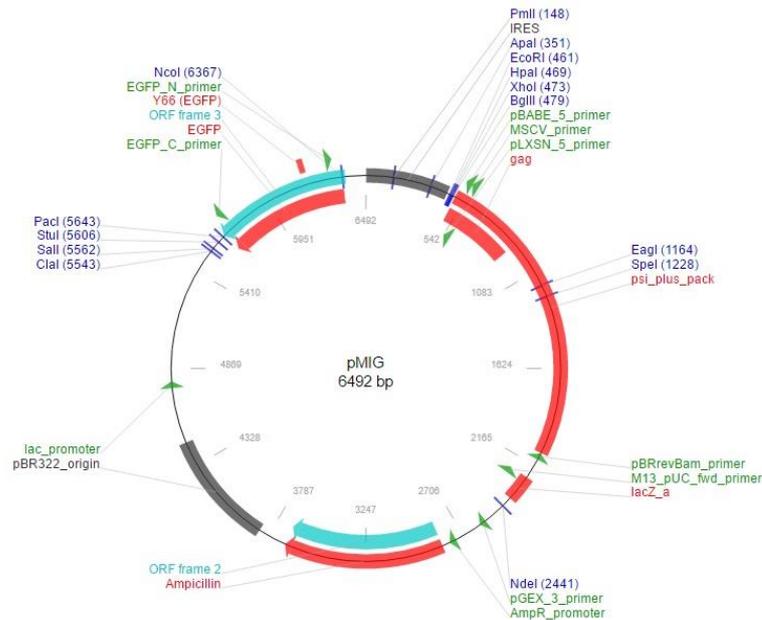


Figura 10. Mapa do vetor pMIG. O vetor pMIG foi utilizado para clonar o gene VEGFA₁₆₅ e realizar a nucleofecção em células CD34⁺. Como controle foi utilizado o vetor pMIG Vazio.

Imunoprecipitação de complexos proteicos e Western Blot

Foi acrescentado as amostras o tampão de extração de proteínas RIPA (NaCl 150 mM; Tris-Cl 50 mM pH 7,4; Deoxicolato 0,5 %; SDS 0,1 %, NP-40 1%) contendo inibidores de proteases (PMSF 1mM, Leupeptina 1µg/mL, 1mM Na₃VO₄ e Aprotinina 1µg/mL) e incubado no gelo por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas à 12000 g por 30 minutos. O conteúdo proteico foi dosado utilizando o reagente Bradford (Bio-Rad) e utilizando como referência uma curva padrão de BSA como referência. Para o ensaio de imunoprecipitação, o extrato proteico foi incubado com o anticorpo anti-NRP1 (Santa Cruz Biotech) e com a proteína A-Sepharose por 12 horas a 4°C sob agitação. Aos extratos proteicos foi adicionado tampão Laemmli (NaH₂PO₄ 1M pH 7,0; Glicerol 50%; SDS 10%; azul de bromofenol 0,1%; 200mM de DTT). As proteínas foram fracionadas em gel de poliacrilamida-SDS 8% e transferidas para membrana de nitrocelulose (Millipore) por 90 minutos a 120 volts.

A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação das membranas por 1 hora em solução de TBS-T (50mM Tris

pH 7,5, 150 mM NaCl e 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado à temperatura ambiente. Em seguida, incubou-se as membranas com o anticorpo primário em solução de TBS-T contendo 3% de leite desnatado, por 12 horas à 4°C, lavadas 3 vezes com TBS-T por 10 minutos e então, incubou-se o anticorpo secundário por 1 hora em temperatura ambiente. Para a etapa de revelação, as membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T para a retirada do excesso de anticorpo e revelou-se utilizando o método de quimioluminescência ECL (Pierce, ThermoScientific) de acordo com as instruções do fabricante. Para a captura do sinal foi utilizada a máquina Uvitec Cambridge. Os anticorpos primários utilizados para verificar a hiperexpressão foram: anti-VEGF 165 (Abcam), anti-SEMA3A (Santa Cruz Biotech) e anti-Actina (Santa Cruz Biotech). Para o ensaio de imunoprecipitação os anticorpos primários utilizados foram: anti-NRP1 (Santa Cruz Biotech), anti-Plexina-A4 (Santa Cruz Biotech) e anti-VEGF Receptor 2 (Cell Signalling Technology).

Ensaio de cocultura

Para avaliar os efeitos da hiperexpressão de VEGFA e SEMA3A foram realizados ensaios de cocultura utilizando células HS5 na camada inferior e células KG1 ou CD34⁺ na camada superior.

Na cocultura com células KG1, 2×10^5 células HS5 não transduzidas, ou transduzidas com SEMA3A ou Lacz foram semeadas em placa de 6 poços contendo 1mL de meio RPMI 10% SFB. As células foram incubadas por 12 horas à 37°C para aderir (Confluência de 50%). Em seguida, 1×10^6 células KG1 (não aderentes) não transduzidas, ou transduzidas com VEGFA ou Lacz foram semeadas sobre a camada de células HS5 aderentes em 1mL de meio RPMI 10% SFB. A cocultura foi incubada por 72 horas a 37°C. Após esse período, as células KG1 foram coletadas e submetidas à ensaios funcionais.

Na cocultura com células CD34⁺, 2×10^4 células HS5 transduzidas com SEMA3A ou Lacz ou não, foram semeadas em placa de 24 poços contendo 500µL de meio DMEM 10% SFB. As células foram incubadas por 12 horas à 37°C para aderirem (Confluência de 50%). Em seguida, 1×10^5 células CD34⁺ (não aderentes) nucleofectadas com Mig VEGFA ou Mig, ou não, foram semeadas sobre a camada de células HS5 aderentes em 500µL de meio

DMEM 20% SFB, 50ng/mL Stem Cell Factor e 10ng/mL Interleucina-3. A cocultura foi incubada por 72 horas à 37°C. Após esse período, as células CD34⁺ foram coletadas e submetidas à ensaios funcionais.

Para o ensaio de imunoprecipitação, foi realizada cocultura com células HS5 não transduzidas, tratadas com 250ng/mL da proteína recombinante humana SEMA3A (R&D Systems), e células KG1 não transduzidas, tratadas com 100ng/mL da proteína recombinante humana VEGF 165 (Peprotech) [62]. A cocultura foi incubada por 72 horas à 37°C. Após esse período, as células foram coletadas e submetidas à extração de proteínas.

Ensaio de viabilidade

A viabilidade de células KG1 foi mensurada utilizando-se o reagente Metil tiazol tetrazólio (MTT; Sigma). Resumidamente, $2,5 \times 10^4$ células por poço foram semeadas em placa de 96 poços contendo 100µL de meio RPMI 10% SFB e incubadas por 48 horas. Em seguida, 10 µL de MTT 5mg/mL foram adicionados e a reação foi incubada à 37°C por 4 horas. A reação foi interrompida por adição de 100µL de 0,1N HCl em isopropanol. O crescimento celular foi avaliado pela mensuração da absorbância a 570 nm utilizando um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em cinco replicatas e foram realizados no mínimo 04 experimentos independentes.

A viabilidade de células CD34⁺ foi mensurada utilizando-se o kit Cell-titer 96 aqueous solution cell proliferation assay (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, 1×10^4 células por poço foram semeadas em placa de 96 poços contendo 100µL de meio DMEM 20% SFB, 50ng/mL Stem Cell Factor e 10ng/mL Interleucina-3 e incubadas por 96 horas. Em seguida 20µL de Cell-titer 96 aqueous solution foram adicionados e a reação foi incubada à 37°C por 2 horas. O crescimento celular foi avaliado pela mensuração da absorbância a 490 nm utilizando um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em duplicatas e foram realizados no mínimo 03 experimentos independentes.

Ensaio de proliferação

A proliferação foi mensurada utilizando-se o reagente KI-67 (BD Bioscience). Resumidamente, 5×10^5 células foram fixadas com 70% de etanol

e armazenadas à -20°C . A marcação com o anticorpo Ki-67 foi feita seguindo as instruções do fabricante. A intensidade média de fluorescência (IMF) foi avaliada por citometria de fluxo utilizando FACS Calibur (Becton Dickinson). Células sem marcação foram utilizadas como controle negativo. Os dados adquiridos foram analisados pelo programa FlowJo e no mínimo 03 experimentos independentes foram realizados.

Avaliação de apoptose

A apoptose foi mensurada utilizando-se Anexina V e iodeto de propídeo (PI). Resumidamente, $1,25 \times 10^5$ células foram suspensas em tampão de ligação contendo $1\mu\text{g/mL}$ de PI e $1\mu\text{g/mL}$ de Anexina-V (BD Bioscience). Após incubação no escuro por 15 minutos em temperatura ambiente, todas as amostras foram analisadas em FACSCalibur. Os dados adquiridos foram analisados pelo programa FlowJo e no mínimo 03 experimentos independentes foram realizados.

Ensaio de formação de colônia

O ensaio de formação de colônias de células KG1 foi realizada em meio semi-sólido de metilcelulose (MethoCult 4230; StemCell Technologies). Para tal, 2×10^3 células foram semeadas em 1mL de metilcelulose em placa de 12 poços. Após 07 dias as colônias foram detectadas pela adição de 1mg/mL de reagente MTT e a contagem foi realizada com o auxílio do programa ImageJ quantification (U.S. National Institutes of Health). Todas as condições foram testadas em duplicata e foram realizados no mínimo 04 experimentos independentes.

A formação de colônias de células $\text{CD}34^+$ foi realizada em meio semi-sólido de metilcelulose suplementada com citocinas (MethoCult 4435; StemCell Technologies). Para tal, 2×10^3 células foram semeadas em 1mL de metilcelulose em placa de 12 poços. Após 10 dias as colônias foram contadas em microscópio invertido e classificadas de acordo com sua morfologia em CFU-GM (Unidade formadora de colônias granulócitos/monócitos), CFU-G (Unidade formadora de colônias granulócitos), CFU-M (Unidade formadora de colônias monócitos) e BFU-E (Unidade formadora de colônias eritróide). Todas

as condições foram testadas em duplicata e foram realizados no mínimo 04 experimentos independentes.

Análise Estatística

Para a comparação entre pacientes e grupo controle foi utilizado o teste estatístico *Mann-Whitney*. Nos demais ensaios os dados foram analisados pela média \pm desvio padrão utilizando-se o teste *t* de *Student* ou *Anova*. Para a análise das condições da cocultura foi utilizado o teste de *Friedman*. Valor de $P \leq 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

VEGFA está hiperexpresso em células CD34⁺ da medula óssea de pacientes com LMA *de novo*.

O aumento de níveis séricos, proteicos e gênicos de VEGFA em pacientes com LMA foram descritos por diversos autores [46], mas não encontramos nenhum relato sobre a expressão gênica de VEGFA em células progenitoras CD34⁺ da medula óssea de pacientes. A expressão gênica de VEGFA foi avaliada através da técnica de PCRq, utilizando o gene HPRT como normalizador. Observou-se aumento significativo na expressão de VEGFA em células CD34⁺ de pacientes com LMA *de novo* comparada ao grupo controle (5,06 [0,42–57,52] vs 1,00 [0,8–2,19], P=0,0073). Não encontramos diferença estatística na expressão gênica de VEGFA entre os grupos de SMD e LMA secundária comparadas ao grupo controle (Figura 11).

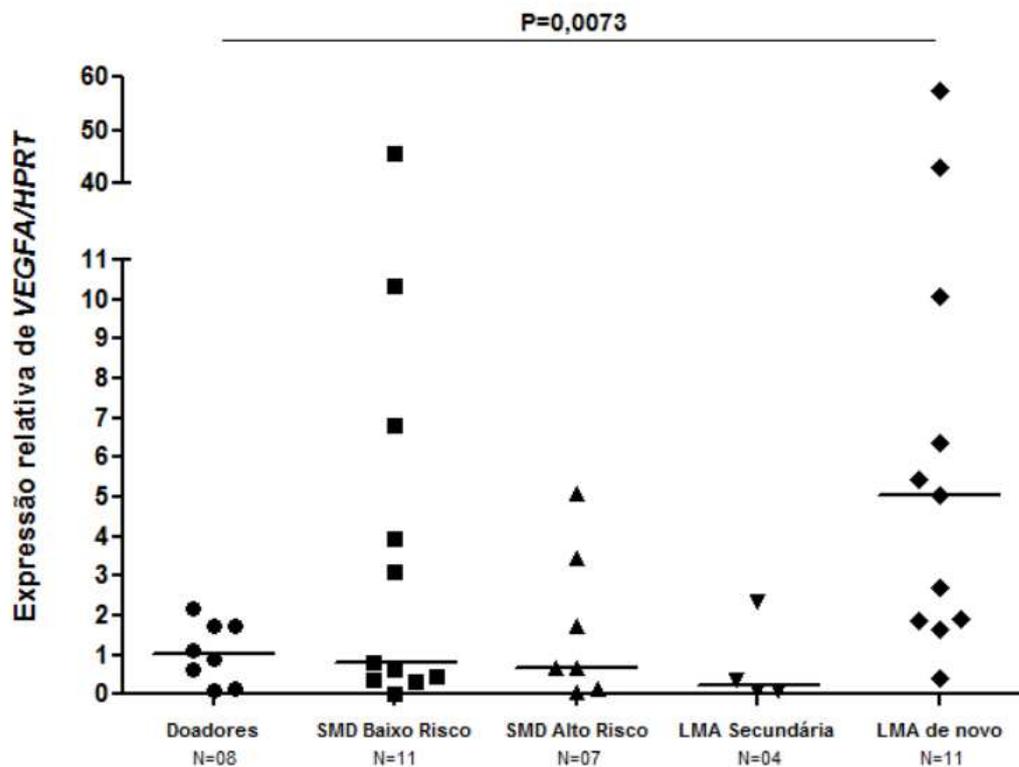


Figura 11. Aumento significativo na expressão gênica de VEGFA em células CD34⁺ de pacientes com LMA de novo comparada ao grupo controle. A figura ilustra o perfil de expressão gênica de *VEGFA* em amostras de células CD34⁺ provenientes da medula óssea de pacientes com SMD de baixo e alto risco, LMA secundária e *de novo* e grupo controle, avaliado por PCRq, utilizando o gene *HPRT* como normalizador. As linhas horizontais representam a mediana. Há aumento significativo na expressão de *VEGFA* em pacientes com LMA *de novo* comparada ao grupo controle ($P=0,0073$).

SEMA3A está hiperexpresso em células mesenquimais estromais (MSCs) da medula óssea de pacientes com SMD e LMA.

A expressão gênica de *SEMA3A* foi avaliada através da técnica de PCRq, utilizando o gene *HPRT* como normalizador. Observou-se aumento na expressão de *SEMA3A* em MSCs de todos os grupos de pacientes comparada ao grupo controle. SMD de baixo risco (2,97 [0,64–24,39] vs 0,83 [0,43–2,86], $P=0,028$); SMD de alto risco (9,50 [2,34–22,60] vs 0,83 [0,43–2,86], $P=0,005$); LMA secundária (3,07 [0,97–6,97] vs 0,83 [0,43–2,86], $P=0,05$) e LMA *de novo* (5,73 [1,10–28,21] vs 0,83 [0,43–2,86], $P=0,007$) (Figura 12).

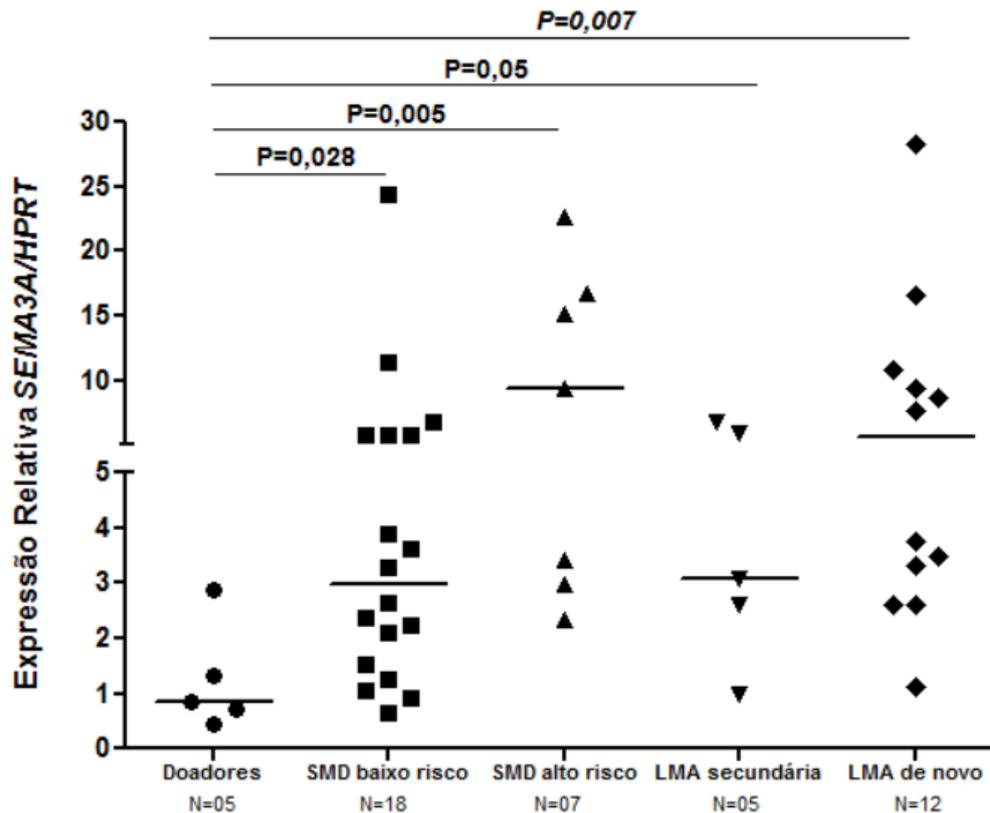


Figura 12. Aumento significativo na expressão gênica de SEMA3A em MSCs de pacientes comparada ao grupo controle. A figura ilustra o perfil de expressão gênica de *SEMA3A* em amostras de células mesenquimais estromais provenientes da medula óssea de pacientes com SMD de baixo e alto risco, LMA secundária e *de novo* e grupo controle, avaliado por PCRq, utilizando o gene *HPRT* como normalizador. As linhas horizontais representam a mediana. Há aumento na expressão de SEMA3A em todos os grupos de pacientes comparada ao grupo controle: SMD de baixo risco ($P=0,028$); SMD de alto risco ($P=0,005$); LMA secundária ($P=0,05$) e LMA *de novo* ($P=0,007$).

A hiperexpressão de VEGFA resulta em aumento na proliferação de células KG1 e CD34⁺.

Com o objetivo de avaliar os efeitos do aumento de VEGFA em células leucêmicas CD34⁺, a linhagem celular KG1 foi transduzida com lentivírus específico para VEGFA₁₆₅ ou controle Lacz. Após 15 dias de seleção com antibiótico, a expressão gênica de VEGFA foi avaliada por PCRq e observou-se um aumento médio de 11 vezes ($11 \pm 8\%$). O aumento da expressão proteica,

avaliada por western blot, também foi observado (Figura 13A). Para estudar os efeitos do aumento de VEGFA em células CD34⁺ normais, isolamos células de sangue de cordão umbilical e realizamos a nucleofecção dessas células com vetores específicos para VEGFA₁₆₅ ou o vetor vazio, utilizado como controle. Após 24 horas, a expressão gênica de VEGFA foi avaliada por PCRq e observou-se um aumento médio de 29 vezes ($28,94 \pm 32,45\%$) (Figura 13B).

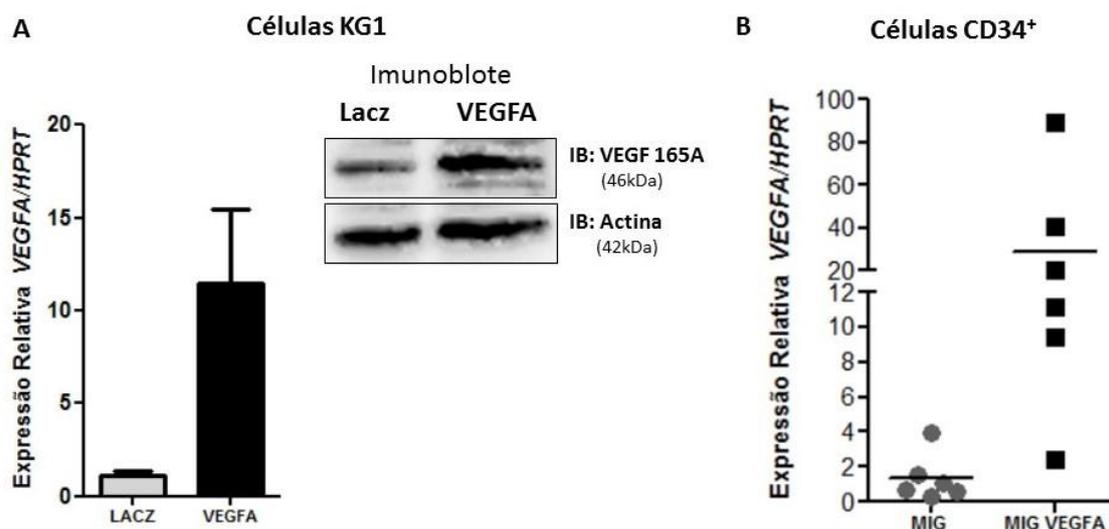


Figura 13. Hiperexpressão de VEGFA. **A.** A expressão gênica de *VEGFA* em células leucêmicas KG1 hiperexpressando *VEGFA* e células controle Lacz foi avaliada por PCRq utilizando o gene *HPRT* como normalizador. Os dados estão representados como média e desvio padrão. A expressão proteica foi avaliada por Western Blot utilizando extratos proteicos de células KG1 hiperexpressando *VEGFA* e o controle Lacz. Os anticorpos utilizados foram VEGF 165 (46 kDa) e o controle endógeno Actina (42 kDa). **B.** A expressão gênica de *VEGFA* em células CD34⁺ hiperexpressando *VEGFA* e células controle MIG, foi avaliada por PCRq utilizando o gene *HPRT* como normalizador. A linha horizontal representa a média e cada ponto representa um experimento independente.

Após hiperexpressão, as células KG1 e CD34⁺ foram submetidas a ensaios de proliferação, viabilidade, apoptose e clonogenicidade. A

hiperexpressão de VEGFA aumentou significativamente a viabilidade de células KG1 ($124,4 \pm 23,03\%$ vs $100 \pm 0,62\%$; $P=0,03$) (Figura 14 A1) e de células CD34⁺ ($159,6 \pm 41,2\%$ vs $102,5 \pm 16,93\%$; $P=0,045$) (Figura 14 A2) comparada ao grupo controle. A análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de Ki-67 revelou que hiperexpressão de VEGFA aumentou também a proliferação de células KG1 ($107,7 \pm 2,82\%$; $P=0,042$) (Figura 14 B1) e de células CD34⁺ ($134,0 \pm 7,68\%$; $P=0,047$) (Figura 14 B2). Em relação à formação de colônias, a hiperexpressão de VEGFA não teve efeito nas células KG1 ou CD34⁺ (Figura 14 C1 e C2). Para verificar se o aumento da viabilidade estava relacionado à apoptose celular, investigamos por citometria de fluxo as células Anexina positivas e não encontramos diferença entre as células KG1 ou células CD34⁺ (Figura 14 D1 e D2) comparadas aos seus respectivos controles.

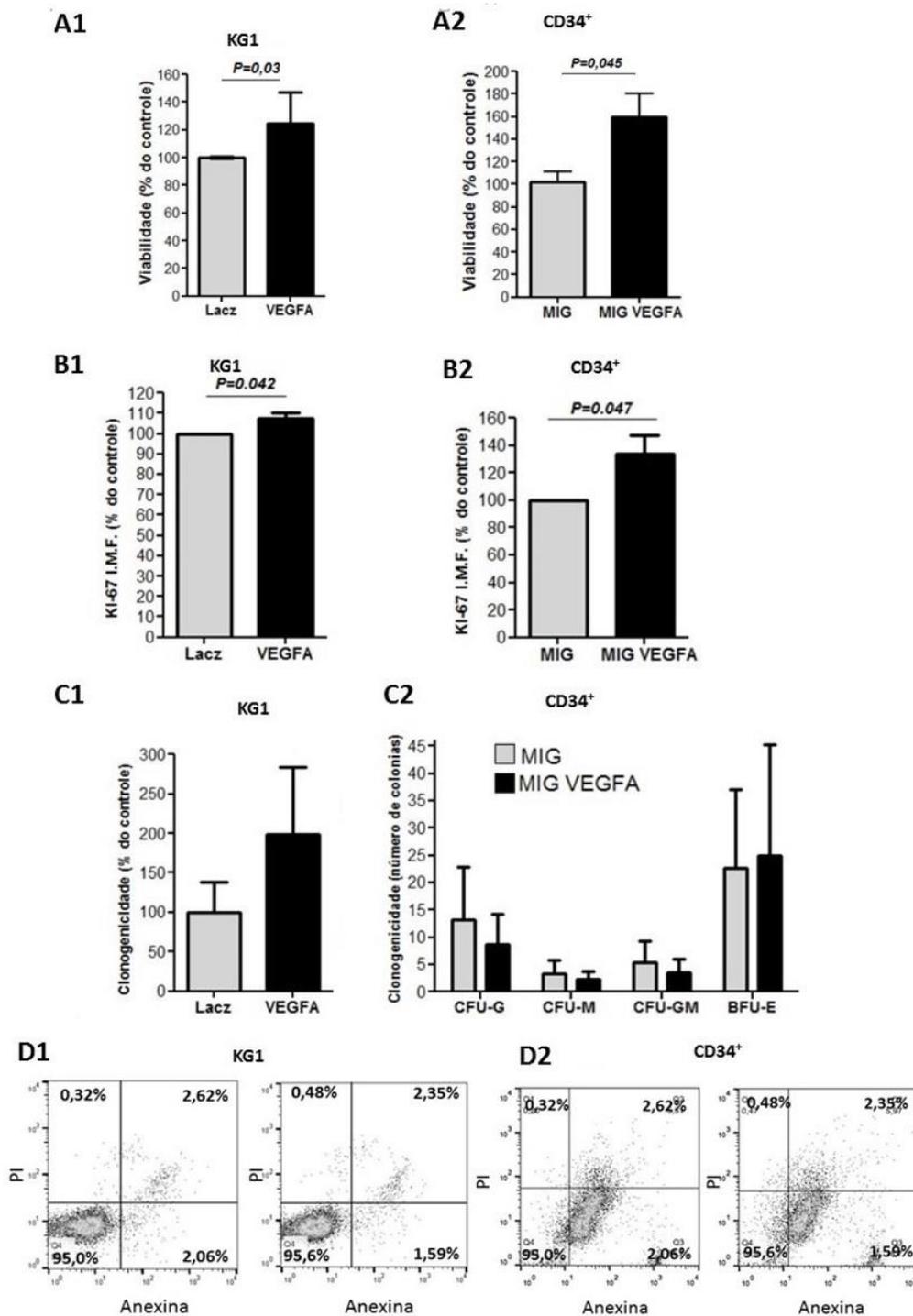


Figura 14. A hiperexpressão de VEGFA aumentou a proliferação celular. (A1). A viabilidade de células KG1 foi mensurada por ensaio de MTT após 48 horas de incubação. **(A2).** A viabilidade de células CD34⁺ foi mensurada utilizando o kit Cell-titer 96 aqueous solution cell proliferation assay após 96 horas de incubação. **(B1).** A proliferação de células KG1 foi determinada pela I.M.F de Ki-67 através de citometria de fluxo após incubação por 48 horas **(B2).** A proliferação de células CD34⁺ foi determinada pela I.M.F de Ki-67 através de

citometria de fluxo após incubação por 48 horas **(C1)**. As colônias de células KG1 foram detectadas por MTT após 07 dias de cultura em meio semi-sólido. **(C2)**. As colônias de células CD34⁺ foram contadas em microscópio invertido e classificadas de acordo com sua morfologia após 10 dias de cultura em meio semi-sólido. **(D1)**. A apoptose de células KG1 foi detectada por Anexina V e PI através de citometria de fluxo após 48 horas de incubação. **(D2)**. Apoptose de células CD34⁺ foi detectada por Anexina V e PI através de citometria de fluxo após 96 horas de incubação. Os gráficos representam um experimento. Os resultados ilustram a média e o desvio padrão de no mínimo 4 experimentos independentes.

Os efeitos de SEMA3A são dominantes em relação aos efeitos de VEGFA.

Para verificar se VEGFA and SEMA3A tem efeitos opostos em células leucêmicas, nós realizamos ensaios de cocultura utilizando a linhagem estromal HS5 e a linhagem leucêmica KG1. A linhagem celular HS5 foi transduzida com lentivírus contendo a sequência de SEMA3A ou o controle Lacz. Após a seleção por antibiótico, a eficiência da hiperexpressão foi avaliada por RT-PCR e Western blotting (Figura 15).

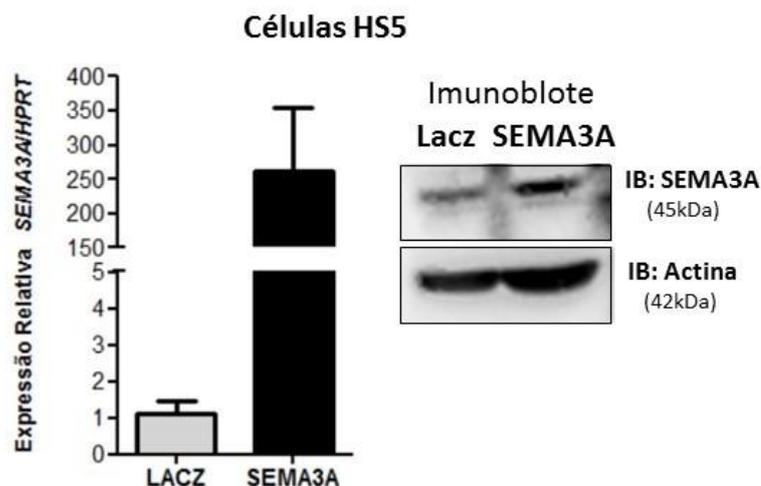


Figura 15. Hiperexpressão de SEMA3A. A expressão gênica de SEMA3A em células estromais HS5 hiperexpressando SEMA3A e células controle Lacz foi avaliada por PCRq utilizando o gene *HPRT* como normalizador. Os dados

estão representados como média e desvio padrão. A expressão proteica foi avaliada por Western Blot utilizando extratos proteicos de células HS5 hiperexpressando SEMA3A e o controle Lacz. Os anticorpos utilizados foram SEMA3A (45 kDa) e o controle endógeno Actina (42 kDa).

As células KG1 e HS5 foram cocultivadas por 72 horas, então as células KG1 não aderentes foram coletadas e foram realizados ensaios de proliferação, apoptose e formação de colônias sob três condições: células KG1 VEGFA ou KG1 Lacz e células HS5 não transduzidas; células HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz e células KG1 não transduzidas; e células KG1 VEGFA ou KG1 Lacz e células HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz.

A análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de Ki-67 mostrou que a hiperexpressão de VEGFA aumentou significativamente a proliferação de células KG1 em cocultura com células estromais HS5 ($176,9 \pm 46,34\%$; $P=0,045$) (Figura 16 A1). Porém, a cocultura com células HS5 SEMA3A diminuiu significativamente a proliferação em comparação as células KG1 cocultivadas com HS5 Lacz ($93,15 \pm 0,79\%$; $P=0,004$) (Figura 16 A2). Quando cocultivamos células KG1 VEGFA e HS5 Lacz, a proliferação de células KG1 aumentou significativamente em comparação à cocultura de células KG1 Lacz e HS5 Lacz ($118,8 \pm 13,67\%$; $P<0,001$). O cocultivo de células KG1 Lacz e HS5 SEMA3A diminuiu a proliferação das células KG1 em comparação à cocultura de células KG1 Lacz e HS5 Lacz ($91,97 \pm 5,26\%$; $P<0,001$). Observamos o mesmo efeito na cocultura de células KG1 VEGFA e HS5 SEMA3A comparadas a cocultura de células KG1 Lacz e HS5 Lacz ($67,15 \pm 22,09\%$; $P<0,001$). A proliferação de células KG1 também diminuiu significativamente quando comparamos a cocultura de células KG1 VEGFA e HS5 Lacz com a cocultura de células KG1 Lacz e HS5 SEMA3A ($118,8 \pm 13,67\%$ vs $91,97 \pm 5,26\%$; $P<0,001$); e quando comparamos a cocultura de células KG1 VEGFA e HS5 Lacz com a cocultura de células KG1 VEGFA e HS5 SEMA3A ($118,8 \pm 13,67\%$ vs $67,15 \pm 22,09\%$; $P<0,001$) (Figura 16 A3).

Em relação à formação de colônias, a hiperexpressão de VEGFA não alterou o número de colônias de células KG1 cocultivadas com células HS5 em

comparação ao controle (Figura 16 B1). A cocultura com células HS5 SEMA3A não alterou o número de colônias de células KG1 comparadas à cocultura com HS5 Lacz (Figura 16 B2). Porém, quando cocultivamos células KG1 VEGFA e HS5 Lacz, o número de colônias aumentou comparando com a cocultura de células KG1 Lacz e HS5 Lacz ($163,9 \pm 37,81\%$; $P=0,004$). O número de colônias diminuiu com o cocultivo de células KG1 VEGFA e HS5 Lacz comparadas à cocultura de células KG1 Lacz e HS5 SEMA3A ($163,9 \pm 37,81\%$ vs $101,0 \pm 31,27\%$; $P=0,008$); e com o cocultivo de células KG1 VEGFA e HS5 Lacz comparadas à cocultura de células KG1 VEGFA e HS5 SEMA3A ($163,9 \pm 37,81\%$ vs $106,9 \pm 35,42\%$; $P=0,011$). Não houve diferença no número de colônias após o cocultivo de KG1 Lacz e HS5 Lacz comparado à KG1 Lacz e HS5 SEMA3A ou KG1 VEGFA and HS5 SEMA3A (Figura 16 B3).

Em relação à apoptose, a hiperexpressão de SEMA3A ou VEGFA não induziu a apoptose de células KG1 em nenhuma condição de cocultivo (Figura 16 C1, C2 e C3).

Portanto, esses resultados mostraram que na ausência de SEMA3A, a hiperexpressão de VEGFA aumentou a proliferação mesmo com o cocultivo de células HS5. Na ausência de VEGFA, a hiperexpressão de SEMA3A reduziu a proliferação de células KG1. Na presença combinada de VEGFA e SEMA3A, os efeitos causados pela hiperexpressão de SEMA3A predominam sobre os efeitos causados por VEGFA.

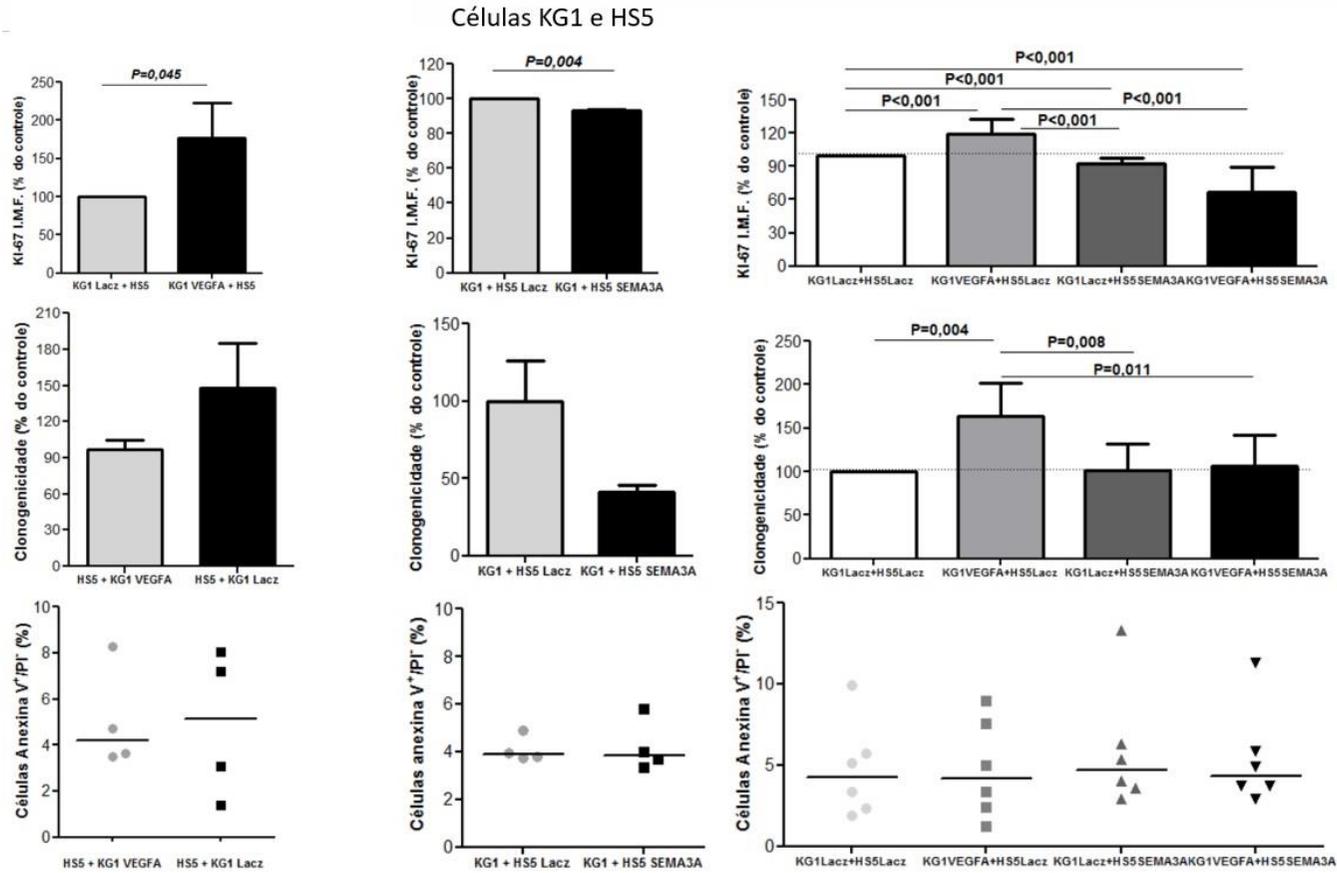


Figura 16. Os efeitos da hiperexpressão de SEMA3A parecem ser dominantes em ensaios de cocultura com as linhagens celulares KG1 e HS5. **(A).** A proliferação de células KG1 foi determinada pela I.M.F de Ki-67 através de citometria de fluxo após

cocultura de células KG1 e HS5 nas seguintes condições: KG1 VEGFA ou KG1 Lacz e HS5 não transduzida (A1), KG1 não transduzida e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (A2), KG1 VEGFA ou KG1 Lacz e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (A3). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes, Student *t* test. **(B)**. As colônias de células KG1 foram detectadas por MTT após 07 dias de cultura em meio semi-sólido. As células foram semeadas em meio semi-sólido após a cocultura de células KG1 e HS5 nas seguintes condições: KG1 VEGFA ou KG1 Lacz e HS5 não transduzida (B1), KG1 não transduzida e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (B2), KG1 VEGFA ou KG1 Lacz e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (B3). Os resultados estão apresentados como media e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. **(C)**. A apoptose de células KG1 foi detectada por Anexina V e PI através de citometria de fluxo após cocultura de células KG1 e HS5 nas seguintes condições: KG1 VEGFA ou KG1 Lacz e HS5 não transduzida (C1), KG1 não transduzida e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (C2), KG1 VEGFA ou KG1 Lacz e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (C3). Cada ponto representa um experimento independente e as linhas horizontais representam mediana.

Para verificar se VEGFA and SEMA3A tem efeitos opostos em células CD34⁺ normais, realizamos ensaios de cocultura utilizando a linhagem estromal HS5 e células CD34⁺ de sangue de cordão umbilical. As células CD34⁺ e HS5 foram cocultivadas por 72 horas, então as células CD34⁺ não aderentes foram coletadas e foram realizados ensaios de proliferação, apoptose e formação de colônias sob três condições: células CD34⁺ MIG VEGFA ou CD34⁺ MIG e células HS5 não transduzidas; células HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz e células CD34⁺ não transduzidas; e células CD34⁺ MIG VEGFA ou CD34⁺ MIG e células HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz.

A análise da intensidade média de fluorescência (IMF) de Ki-67 mostrou que a hiperexpressão de VEGFA aumentou significativamente a proliferação de células CD34⁺ em cocultura com células estromais HS5 ($131,8 \pm 7,9\%$; $P=0,02$) (Figura 17 A1). Porém, a cocultura com células HS5 SEMA3A diminuiu significativamente a proliferação em comparação a células CD34⁺ cocultivadas com HS5 Lacz ($55,05 \pm 23,29\%$; $P=0,03$) (Figura 17 A2). Quando cocultivamos

células CD34⁺ MIG VEGFA e HS5 Lacz, a proliferação de células CD34⁺ aumentou em comparação com a cocultura de células CD34⁺ MIG e HS5 Lacz ($107,7 \pm 2,76\%$; $P < 0,001$). O cocultivo de células CD34⁺ MIG e HS5 SEMA3A diminuiu a proliferação das células CD34⁺ comparando à cocultura de células CD34⁺ MIG e HS5 Lacz ($69,25 \pm 19,89\%$; $P < 0,001$). Observamos o mesmo efeito na cocultura de células CD34⁺ MIG VEGFA e HS5 SEMA3A comparadas a cocultura de células CD34⁺ MIG e HS5 Lacz ($52,24 \pm 23,77\%$; $P < 0,001$). A proliferação de células CD34⁺ também diminui significativamente quando comparamos a cocultura de células CD34⁺ MIG VEGFA e HS5 Lacz com a cocultura de células CD34⁺ MIG e HS5 SEMA3A ($107,7 \pm 2,76\%$ vs $69,25 \pm 19,89\%$; $P < 0,001$); e quando comparamos a cocultura de células CD34⁺ MIG VEGFA e HS5 Lacz com a cocultura de células CD34⁺ MIG VEGFA e HS5 SEMA3A ($107,7 \pm 2,76\%$ vs $52,54 \pm 23,77\%$; $P < 0,001$) (Figura 17 A3).

Em relação a formação de colônias e a apoptose, a hiperexpressão de SEMA3A ou VEGFA não alterou a formação de colônias de células CD34⁺ (Figura 17 B1, B2 e B3) nem induziu a apoptose de células CD34⁺ (Figura 17 C1, C2 e C3) em nenhuma condição de cocultivo.

Portanto, esses resultados mostraram que na ausência de SEMA3A, a hiperexpressão de VEGFA aumentou a proliferação de células CD34⁺ mesmo com o cocultivo de células HS5. Na ausência de VEGFA, a hiperexpressão de SEMA3A reduziu a proliferação de células CD34⁺. Na presença combinada de VEGFA e SEMA3A, os efeitos causados pela hiperexpressão de SEMA3A predominam sobre os efeitos causados por VEGFA.

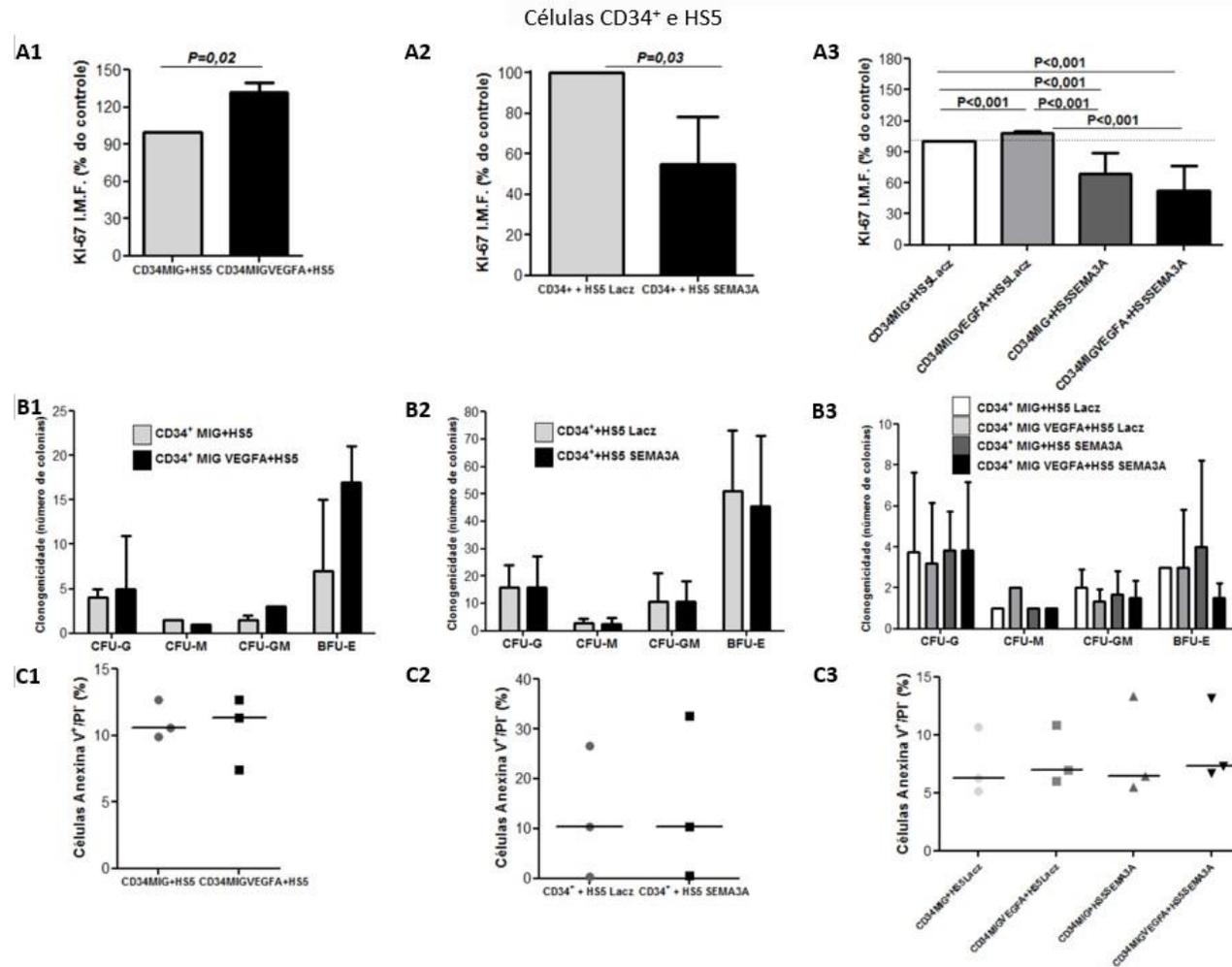


Figura 17. O efeito da hiperexpressão de SEMA3A parece ser dominante em ensaios de cocultura com as células CD34⁺ e HS5. (A). A proliferação de células CD34⁺ foi determinada pela I.M.F de Ki-67 através de citometria de

fluxo após cocultura de células CD34⁺ e HS5 nas seguintes condições: CD34⁺ MIG VEGFA ou CD34⁺ MIG e HS5 não transduzida (A1), CD34⁺ não nucleofectada e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (A2), CD34⁺ MIG VEGFA ou CD34⁺ MIG e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (A3). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes, Teste *t* Student. **(B)**. As colônias de células CD34⁺ foram contadas em microscópio invertido e classificadas de acordo com sua morfologia após 10 dias de cultura em meio semi-sólido. As células foram semeadas em meio semi-sólido após a cocultura de células CD34⁺ e HS5 nas seguintes condições: CD34⁺ MIG VEGFA ou CD34⁺ MIG e HS5 não transduzida (B1), CD34⁺ não nucleofectada e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (B2), CD34⁺ MIG VEGFA ou CD34⁺ MIG e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (B3). Os resultados estão apresentados como média e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. **(C)**. A apoptose de células CD34⁺ foi detectada por Anexina V e PI através de citometria de fluxo após cocultura de células CD34⁺ e HS5 nas seguintes condições: tose de células CD34⁺ após cocultura de células CD34⁺ e HS5 nas seguintes condições: CD34⁺ MIG VEGFA ou CD34⁺ MIG e HS5 não transduzida (C1), CD34⁺ não nucleofectada e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (C2), CD34⁺ MIG VEGFA ou CD34⁺ MIG e HS5 SEMA3A ou HS5 Lacz (C3). Cada ponto representa um experimento independente e as linhas horizontais representam mediana.

Associação preferencial do receptor NRP1 com SEMA3A ao invés de VEGFA

Para investigar se o efeito dominante de SEMA3A sobre VEGFA pode ser devido à competição pelo receptor NRP1, nós realizamos ensaio de imunoprecipitação utilizando o receptor NRP1 como imunoprecipitado seguido por imunoblote dos receptores VEGFR-2 e Plexin-A4. O extrato proteico das células KG1 e HS5 foi coletado seguindo as condições: Controle (sem proteínas recombinantes), VEGFA (100ng/uL de VEGFA recombinante), SEMA3A (250ng/uL de proteína recombinante) and VEGFA+SEMA3A (ambas as proteínas). O imunoblote revelou que na presença combinada das proteínas VEGFA e SEMA3A recombinantes há maior associação do receptor NRP1 com

plexina A4, favorecendo a sinalização induzida por SEMA3A. Esse resultado sugere que o efeito dominante de SEMA3A pode estar associado à competição pelo receptor NRP1 (Figura 18).

IP: NRP1

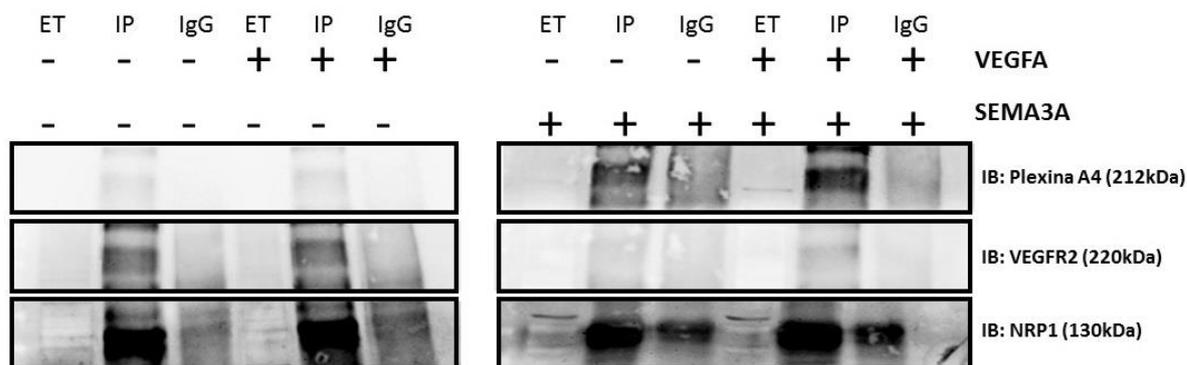


Figura 18. Associação preferencial do receptor NRP1 com plexina A4 ao invés de VEGFR2. Imunoprecipitação (IP) de NRP1 e imunoblote (IB) dos receptores Plexina A4, VEGFR2 e NRP1 em extrato de proteínas obtidas da cocultura de células KG1 e HS5 tratadas ou não com as proteínas recombinantes VEGFA (100ng/uL) e SEMA3A (250ng/uL). O isotipo IgG foi utilizado como controle negativo da imunoprecipitação. Extrato total (ET) foi utilizado como controle positivo do imunoblote.

DISCUSSÃO

A cada dia fica mais evidente a importância do microambiente no processo de leucemogênese. Kim e colaboradores mostraram, num estudo elegante, a capacidade que as células leucêmicas tem de redefinir interação entre o microambiente e as células-tronco hematopoéticas (HSCs) e adquirir vantagens seletivas sobre elas [63]. Com o objetivo de entender melhor a interação entre o microambiente e as células leucêmicas, nosso grupo de pesquisa realizou um ensaio de microarranjo utilizando células CD34⁺ e células mesenquimais estromais (MSCs) da medula óssea de pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) [8]. Dentre os diversos genes alterados, selecionamos para posterior estudo o gene VEGFA, que se encontrava hiperexpresso em células CD34⁺, e o gene SEMA3A, hiperexpresso nas MSCs desses pacientes [8].

Para validar os resultados de microarranjo, selecionamos células CD34⁺ da medula óssea de 18 pacientes com SMD e 15 de pacientes com LMA e encontramos aumento na expressão gênica de VEGFA em células de pacientes com LMA *de novo* comparada ao grupo controle. O aumento de VEGF foi estudado em diversos tipos de câncer e está associado ao pior prognóstico em tumores sólidos [43]. No final da década de 90 foi relatado o aumento de VEGF em doenças hematopoéticas, e a seguir, diversos estudos mostraram o aumento da angiogênese e da microdensidade vascular (MDV) em biópsias de medula óssea de pacientes com LMA [64-68]. O aumento plasmático [50, 65, 69, 70] e o aumento da expressão gênica de VEGF em células mononucleares da medula óssea de pacientes [66, 67, 71, 72] também foram relatados. Entretanto, não encontramos na literatura dados de VEGFA em células CD34⁺ de LMA.

Por outro lado, não detectamos diferença entre a expressão gênica de VEGFA nas células CD34⁺ de pacientes com SMD em relação ao grupo controle. Na literatura, os dados de VEGFA na SMD são controversos, entretanto há relatos de aumento gradativo da concentração plasmática de VEGF e da MVD em amostras de medula óssea destes pacientes de acordo com a progressão da doença [64, 65]. Em contraste, Zorat e colaboradores [73]

e Madry e colaboradores [74] não encontraram aumento nos níveis plasmáticos de VEGF comparado ao grupo controle. No presente trabalho, descrevemos pela primeira vez, a expressão gênica de VEGFA₁₆₅ em células CD34⁺ da MO de pacientes com SMD e LMA.

Para entendermos melhor de que maneira o aumento de VEGFA influencia as células leucêmicas, hiperexpressamos VEGFA₁₆₅ na linhagem celular leucêmica KG1, que é CD34⁺ positiva [57], e em células CD34⁺ isoladas de sangue de cordão umbilical. Realizamos ensaios de proliferação, viabilidade, apoptose e formação de colônias, e a hiperexpressão de VEGFA resultou em aumento da viabilidade e proliferação de células KG1 e CD34⁺ e o aumento da formação de colônias das células KG1. Nossos resultados estão de acordo com os dados publicados por List e colegas, que descreveram aumento da proliferação de células KG1 após tratamento com a proteína recombinante VEGF [75]. Eles descreveram também inexplicável aumento da taxa de apoptose das células KG1 tratadas com VEGFA. Nós não encontramos diferença na taxa de apoptose entre as células KG1 VEGFA e KG1 Lacz, corroborando que o aumento de viabilidade encontrado em nossos estudos está relacionado ao aumento da proliferação. Ainda corroborando nossos dados, Xu e colaboradores descreveram aumento da viabilidade porém, verificaram aumento da formação de colônias e diminuição de apoptose em linhagem celular leucêmica HL-60 hiperexpressando VEGFA₁₆₅ [76].

Em contraste com os dados de KG1, o aumento de VEGFA não causou aumento da clonogenicidade de células CD34⁺ de sangue de cordão umbilical. Encontramos na literatura um artigo que descreve aumento da clonogenicidade de células mononucleares da medula óssea de pacientes com SMD de alto risco após tratamento com VEGF recombinante [48]. Esses resultados discrepantes podem estar relacionados às vias de sinalização que são ativadas. List e colaboradores descreveram aumento da clonogenicidade de células KG1 dependente da via PI3K/Akt e independente de ERK [75]. Já Koistinen e colaboradores descreveram aumento da clonogenicidade da linhagem leucêmica OCI/AML-2 dependente de óxido nítrico [77]. As células leucêmicas possuem mutações frequentes nos genes FLT3, NPM1 [78] e EZH2 [79], que podem contribuir para a desregulação de vias de sinalização [80],

mas que não estão presentes em células CD34⁺ normais, portanto, hipotetizamos que as células leucêmicas estão mais alteradas molecularmente e o aumento de VEGFA seja suficiente para estimular o crescimento clonal. Entretanto, as células CD34⁺ isoladas de sangue de cordão não possuem acúmulo de mutações e provavelmente seus mecanismos de controle são eficazes e capazes de barrar a clonogenicidade induzida pela hiperexpressão de VEGFA.

Nossos resultados sugerem que o aumento da expressão de VEGFA confere vantagens às células leucêmicas, que se tornam capazes de proliferar mais do que células normais. O aumento de VEGFA foi encontrado somente em células CD34⁺ da medula óssea de pacientes com LMA *de novo*; esse resultado está de acordo com a teoria de “*loop* parácrino-autócrino” sugerida por alguns autores [81-83]. Acredita-se que as células leucêmicas produzam e liberem VEGFA e de forma parácrina estimule as MSCs do microambiente a produzir mais VEGFA e outras citocinas e fatores de crescimento que as beneficie de forma autócrina [81-83] (Figura 19). Nosso grupo de pesquisa investigou a expressão gênica de VEGFA em MSCs da medula óssea de 16 pacientes com SMD de baixo risco, 6 pacientes com SMD de alto risco, 7 pacientes com LMA secundária e 11 pacientes com LMA *de novo* e encontrou aumento da expressão de VEGFA em MSCs de pacientes com LMA *de novo* comparados ao grupo controle (Tese_Lopes, M.R.). Esses resultados corroboram com a teoria do “*loop* parácrino-autócrino”.

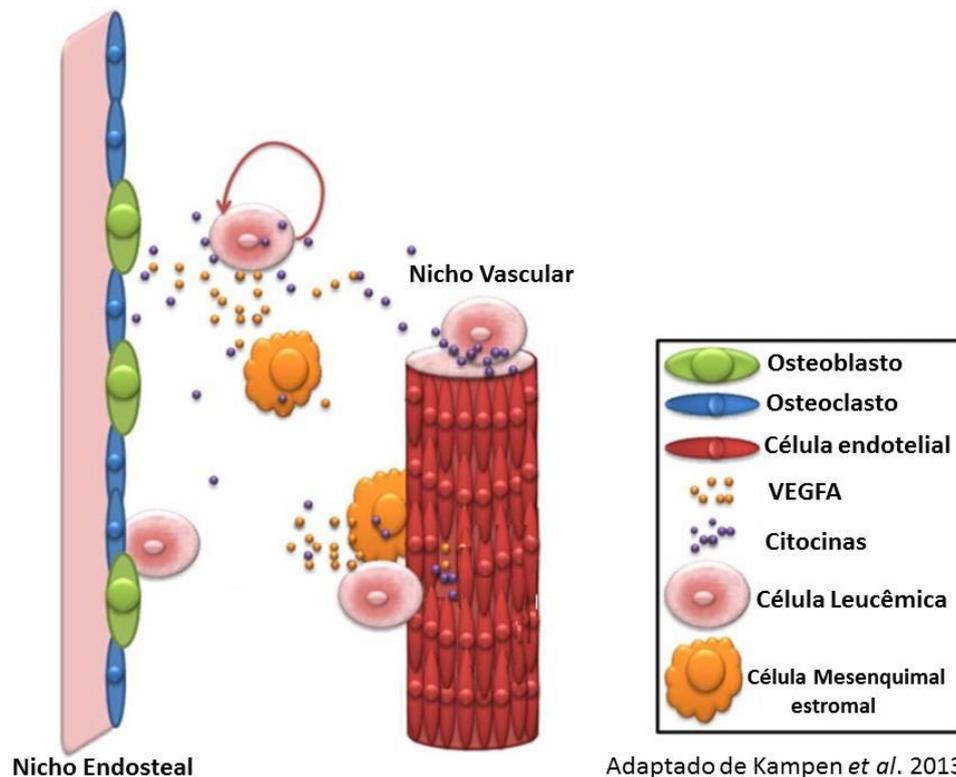


Figura 19. Loop Parácrino-Autócrino. As células leucêmicas produzem e liberam VEGFA e de forma parácrina estimulam células mesenquimais estromais a produzirem mais VEGFA e outras citocinas que beneficiam a célula leucêmica.

Também observamos neste estudo aumento da expressão gênica de SEMA3A em MSCs de todos os pacientes comparado ao grupo controle. Na literatura encontramos dois trabalhos sobre o estudo de SEMA3A e LMA: Um deles descreve que alterações epigenéticas aumentam a expressão de SEMA3A e isto contribui para o silenciamento de EZH2 em pacientes com LMA secundária [84]. O outro descreve menor expressão de SEMA3A em células não aderentes provenientes do estroma da medula óssea de pacientes com LMA comparado ao grupo controle [31]. Pouco se sabe sobre o papel de SEMA3A no microambiente da medula óssea e mais estudos são necessários para podermos afirmar seu envolvimento na patogênese dessas doenças.

Para entender melhor os efeitos de VEGFA e SEMA3A em células leucêmicas, hiperexpressamos VEGFA em células KG1 e em células CD34⁺ de sangue de cordão umbilical e hiperexpressamos SEMA3A em linhagem

estromal HS5, e realizamos ensaios de cocultura. Houve aumento da proliferação e clonogenicidade de células KG1 e aumento da proliferação de células CD34⁺. Não encontramos diferença na apoptose em nenhuma das células.

Por outro lado, o cultivo de células KG1 ou CD34⁺ com células HS5 hiperexpressando SEMA3A causou a diminuição da proliferação e da clonogenicidade de células KG1 e diminuição da proliferação de células CD34⁺. Esses dados são condizentes com os efeitos antiangiogênicos associados a SEMA3A e menor proliferação de tumores sólidos [11, 26]. Quando cocultivamos células KG1 hiperexpressando VEGFA e células HS5 hiperexpressando SEMA3A, o efeito de SEMA3A predominou sobre o efeito de VEGFA, causando diminuição da proliferação e da formação de colônias. Em coculturas com células CD34⁺, o efeito de SEMA3A também foi dominante e causou a diminuição da proliferação.

Nossos dados sugerem que o modelo proposto em tumores sólidos, em que SEMA3A inibe os efeitos causados por VEGFA [47, 56], também se aplica à LMA. A hiperexpressão de VEGFA confere vantagens às células leucêmicas aumentando sua capacidade de proliferação, e SEMA3A inibe esses efeitos, impedindo a proliferação descontrolada das células leucêmicas. O mecanismo que media essa interação ainda não está elucidado mas especula-se que possa haver uma competição entre VEGFA e SEMA3A pela ligação ao receptor NRP1 [15]. Para testar essa teoria, cocultivamos células KG1 e HS5 tratadas ou não com as proteínas recombinantes VEGFA e SEMA3A e extraímos a proteína dessas células. A seguir, imunoprecipitamos o receptor NRP1 e fizemos imunoblote com os anticorpos anti-VEGFR2 e PlexinaA4. Verificamos que na presença das duas proteínas recombinantes, VEGFA e SEMA3A, o receptor NRP1 forma preferencialmente complexos com Plexina-A4 ao invés de VEGFR2. A formação do complexo SEMA3A-NRP1-Plexina-A4 é essencial para a sinalização desencadeada por SEMA3A [10]. Portanto, esses dados sugerem que o efeito dominante de SEMA3A possa estar relacionado à competição pelo receptor NRP1.

No presente estudo, descrevemos o aumento na expressão de VEGFA e SEMA3A em células da medula óssea de pacientes com LMA *de novo*; e que,

em ensaios de cocultura, na presença combinada de VEGFA e SEMA3A, o efeito de SEMA3A é dominante. Esses dados sugerem que o aumento de SEMA3A possa controlar os efeitos causados por VEGFA. Porém, ainda restam as questões: Porque SEMA3A estaria aumentado em MSCs de pacientes com SMD e LMA secundária? Se SEMA3A inibe os efeitos causados por VEGFA, porque os pacientes ainda exibem proliferação descontrolada de blastos leucêmicos?

Pouco se sabe sobre o efeito de SEMA3A no microambiente da medula óssea de pacientes com SMD. Devido ao seu efeito tecido-específico, SEMA3A pode estar retardando efeitos causados por outros fatores de crescimento, ou pode atuar na patogênese da doença, porém estudos são necessários para elucidar o papel de SEMA3A em células da medula óssea de pacientes com SMD. Considerando apenas a interação entre VEGFA e SEMA3A em células de pacientes com LMA *de novo*, nossos dados sugerem que SEMA3A possa ter uma função terapêutica, inibindo os efeitos causados por VEGFA. Apesar dos resultados obtidos, sabemos que apenas a proteína SEMA3A não é capaz de reverter o quadro clínico provavelmente porque diversos fatores contribuem para a patogênese de LMA e podem induzir a proliferação de células leucêmicas e agir em sinergia com VEGFA [85]. Ademais, o complexo formado entre os receptores VEGFR e NRP1 potencializa os efeitos desencadeados por VEGFA, mas não é essencial para a sinalização iniciada pela ligação entre VEGFR e VEGFA. Sendo assim, apesar da competição pela ligação por NRP1, uma fração de VEGFA é capaz de ligar-se diretamente a VEGFR2 e desencadear seus efeitos. Sabe-se ainda que as células que expressam VEGFR2 podem participar de um loop autócrino interno, onde o receptor é internalizado e o VEGFA não precisa ser secretado para desencadear a via de sinalização [86], portanto, a competição pelo receptor NRP1 também não seria relevante (Figura 20). Foi sugerido que em condições fisiológicas, VEGFA₁₆₅ e SEMA3A estejam ligados através de um “*feedback*” negativo, onde o aumento da expressão de VEGFA₁₆₅ em células endoteliais induz o aumento da expressão de SEMA3A como controle do balanço angiogênico; e que esse “*feedback*” é desregulado durante processos malignos [26, 87]. Portanto, sabendo que o aumento de VEGFA pode conferir vantagens às células

leucêmicas e está associado ao pior prognóstico de pacientes com LMA [88]; que SEMA3A parece anular parcialmente os efeitos causados por VEGFA, sugerimos que a administração combinada de inibidores de VEGFA e SEMA3A pode ser benéfica no tratamento de pacientes com LMA.

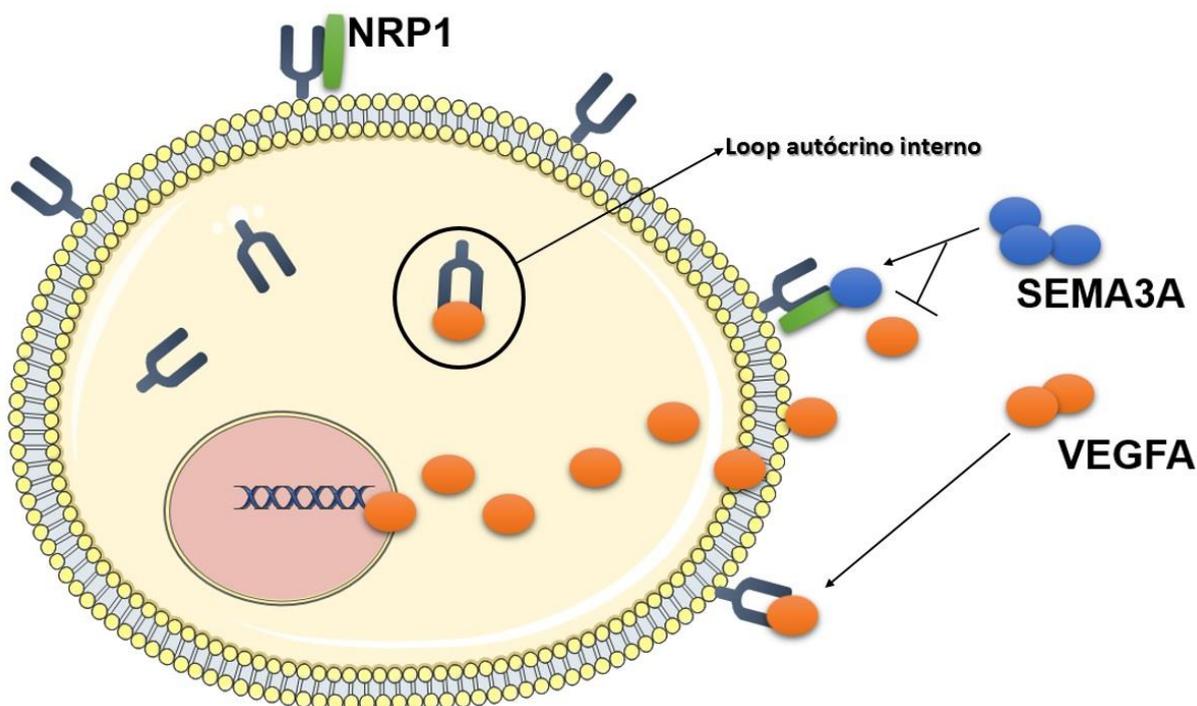


Figura 20. Interação entre VEGFA e SEMA3A. A figura ilustra a discussão do trabalho sobre a possível interação entre VEGFA e SEMA3A na medula óssea de pacientes com LMA.

CONCLUSÕES

- Descrevemos pela primeira vez a expressão gênica de VEGFA em células CD34⁺ da medula óssea de pacientes com SMD e LMA. Encontramos aumento significativo na expressão de VEGFA em pacientes com LMA *de novo* comparado ao grupo controle. Não houve diferença entre pacientes com SMD e o grupo controle.
- Descrevemos pela primeira vez a expressão gênica de SEMA3A em células mesenquimais estromais da medula óssea de pacientes com SMD e LMA. Encontramos aumento significativo na expressão de SEMA3A em todos os pacientes comparado ao grupo controle.
- A hiperexpressão de VEGFA₁₆₅ na linhagem leucêmica KG1 promoveu aumento na viabilidade, proliferação e não alterou a apoptose e clonogenicidade dessas células.
- A hiperexpressão de VEGFA₁₆₅ em células CD34⁺ de sangue de cordão umbilical promoveu aumento na viabilidade e proliferação e não alterou a apoptose e clonogenicidade dessas células.
- A cocultura de células KG1 ou CD34⁺ com a linhagem celular HS5 hiperexpressando SEMA3A promoveu a diminuição da proliferação e da clonogenicidade de células KG1, e a diminuição da proliferação de células CD34⁺.
- Na cocultura de células KG1 ou CD34⁺ hiperexpressando VEGFA₁₆₅ com células HS5 hiperexpressando SEMA3A, o efeito de SEMA3A é dominante.
- Em ensaio de imunoprecipitação há formação preferencial de complexos entre os receptores NRP1 e Plexina A4 na presença das proteínas VEGFA₁₆₅ e SEMA3A recombinantes.

Nossos resultados sugerem que a hiperexpressão de VEGFA₁₆₅ confere vantagens às células leucêmicas, aumentando a sua capacidade de proliferação, e que a proteína SEMA3A parece anular parcialmente os efeitos causados por VEGFA. Portanto, a administração combinada de inibidores de

VEGFA e a proteína SEMA3A pode ser benéfica no tratamento de pacientes com LMA.

REFERÊNCIAS

1. Jagannathan-Bogdan, M. and L.I. Zon, Hematopoiesis. *Development*, 2013. 140(12): p. 2463-7.
2. Lee, G.Y., J.A. Kim, and I.H. Oh, Stem cell niche as a prognostic factor in leukemia. *BMB Rep*, 2015. 48(8): p. 427-8.
3. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*, 2014. 505(7483): p. 327-34.
4. Woll, P.S., et al., Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. *Cancer Cell*, 2014. 25(6): p. 794-808.
5. Ades, L., R. Itzykson, and P. Fenaux, Myelodysplastic syndromes. *Lancet*, 2014. 383(9936): p. 2239-52.
6. Harris, N.L., et al., World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol*, 1999. 17(12): p. 3835-49.
7. Sabattini, E., et al., WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica*, 2010. 102(3): p. 83-7.
8. Baratti, M.O., et al., Identification of protein-coding and non-coding RNA expression profiles in CD34+ and in stromal cells in refractory anemia with ringed sideroblasts. *BMC Med Genomics*, 2010. 3: p. 30.
9. Luo, Y., D. Raible, and J.A. Raper, Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell*, 1993. 75(2): p. 217-27.
10. Goshima, Y., et al., Class 3 semaphorins as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets*, 2012. 16(9): p. 933-44.
11. Tamagnone, L., Emerging role of semaphorins as major regulatory signals and potential therapeutic targets in cancer. *Cancer Cell*, 2012. 22(2): p. 145-52.
12. Neufeld, G., et al., Semaphorins in angiogenesis and tumor progression. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012. 2(1): p. a006718.
13. Nasarre, P., R.M. Gemmill, and H.A. Drabkin, The emerging role of class-3 semaphorins and their neuropilin receptors in oncology. *Onco Targets Ther*, 2014. 7: p. 1663-87.
14. Capparuccia, L. and L. Tamagnone, Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 11): p. 1723-36.

15. Pellet-Many, C., et al., Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J*, 2008. 411(2): p. 211-26.
16. Janssen, B.J., et al., Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. 19(12): p. 1293-9.
17. Hayashi, M., et al., Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature*, 2012. 485(7396): p. 69-74.
18. Lepelletier, Y., et al., Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization. *Eur J Immunol*, 2006. 36(7): p. 1782-93.
19. Yamaguchi, J., et al., Semaphorin3A alleviates skin lesions and scratching behavior in NC/Nga mice, an atopic dermatitis model. *J Invest Dermatol*, 2008. 128(12): p. 2842-9.
20. Holtmaat, A.J., et al., Transient downregulation of Sema3A mRNA in a rat model for temporal lobe epilepsy. A novel molecular event potentially contributing to mossy fiber sprouting. *Exp Neurol*, 2003. 182(1): p. 142-50.
21. Cole, A.R., et al., Collapsin response mediator protein-2 hyperphosphorylation is an early event in Alzheimer's disease progression. *J Neurochem*, 2007. 103(3): p. 1132-44.
22. Duplan, L., et al., Collapsin response mediator protein 4a (CRMP4a) is upregulated in motoneurons of mutant SOD1 mice and can trigger motoneuron axonal degeneration and cell death. *J Neurosci*, 2010. 30(2): p. 785-96.
23. Kaneko, S., et al., A selective Sema3A inhibitor enhances regenerative responses and functional recovery of the injured spinal cord. *Nat Med*, 2006. 12(12): p. 1380-9.
24. Bachelder, R.E., et al., Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells. *Cancer Res*, 2003. 63(17): p. 5230-3.
25. Song, X., et al., Expression of semaphorin 3A and neuropilin 1 with clinicopathological features and survival in human tongue cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 2012. 17(6): p. e962-8.
26. Vacca, A., et al., Loss of inhibitory semaphorin 3A (SEMA3A) autocrine loops in bone marrow endothelial cells of patients with multiple myeloma. *Blood*, 2006. 108(5): p. 1661-7.
27. Bagci, T., et al., Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene*, 2009. 28(40): p. 3537-50.
28. Muller, M.W., et al., Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int J Cancer*, 2007. 121(11): p. 2421-33.

29. Nguyen, Q.D., et al., Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-165 and semaphorin 3A-mediated cellular invasion and tumor growth by the VEGF signaling inhibitor ZD4190 in human colon cancer cells and xenografts. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(8): p. 2070-7.
30. Moretti, S., et al., Semaphorin3A signaling controls Fas (CD95)-mediated apoptosis by promoting Fas translocation into lipid rafts. *Blood*, 2008. 111(4): p. 2290-9.
31. Wang, Z., et al., KDR and Sema3 genes expression in bone marrow stromal cells and hematopoietic cells from leukemia patients and normal individuals. *Hematology*, 2005. 10(4): p. 307-12.
32. Kliche, S. and J. Waltenberger, VEGF receptor signaling and endothelial function. *IUBMB Life*, 2001. 52(1-2): p. 61-6.
33. Ferrara, N. and T. Davis-Smyth, The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 1997. 18(1): p. 4-25.
34. Harper, S.J. and D.O. Bates, VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer*, 2008. 8(11): p. 880-7.
35. Fearnley G.W., S.G.A., Harrison M.A., Wheatcroft S.B., Tomlinson D.C., Ponnambalam S., Vascular endothelial growth factor-A regulation of blood vessel sprouting in health and disease. *OA Biochemistry*, 2013. 1(1): p. 9.
36. Tammela, T., et al., The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res*, 2005. 65(3): p. 550-63.
37. Gerber, H.P., et al., Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem*, 1998. 273(46): p. 30336-43.
38. Shiojima, I. and K. Walsh, Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circ Res*, 2002. 90(12): p. 1243-50.
39. Gerber, H.P., V. Dixit, and N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1998. 273(21): p. 13313-6.
40. Tran, J., et al., Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 264(3): p. 781-8.
41. Pedram, A., M. Razandi, and E.R. Levin, Extracellular signal-regulated protein kinase/Jun kinase cross-talk underlies vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*, 1998. 273(41): p. 26722-8.

42. Rousseau, S., et al., p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene*, 1997. 15(18): p. 2169-77.
43. Ferrara, N., Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*, 2004. 25(4): p. 581-611.
44. Rahimi, N., VEGFR-1 and VEGFR-2: two non-identical twins with a unique physiognomy. *Front Biosci*, 2006. 11: p. 818-29.
45. Neufeld, G., et al., Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 1999. 13(1): p. 9-22.
46. Gerber, H.P. and N. Ferrara, The role of VEGF in normal and neoplastic hematopoiesis. *J Mol Med (Berl)*, 2003. 81(1): p. 20-31.
47. Chekhonin, V.P., et al., VEGF in tumor progression and targeted therapy. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013. 13(4): p. 423-43.
48. Bellamy, W.T., et al., Vascular endothelial cell growth factor is an autocrine promoter of abnormal localized immature myeloid precursors and leukemia progenitor formation in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2001. 97(5): p. 1427-34.
49. Wimazal, F., et al., Immunohistochemical detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the bone marrow in patients with myelodysplastic syndromes: correlation between VEGF expression and the FAB category. *Leuk Lymphoma*, 2006. 47(3): p. 451-60.
50. Aguayo, A., et al., Plasma vascular endothelial growth factor levels have prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia but not in patients with myelodysplastic syndromes. *Cancer*, 2002. 95(9): p. 1923-30.
51. Verstovsek, S., et al., Clinical relevance of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*, 2002. 118(1): p. 151-6.
52. Gianelli, U., et al., High levels of vascular endothelial growth factor protein expression are associated with an increased risk of transfusion dependence in myelodysplastic syndromes. *Am J Clin Pathol*, 2013. 139(3): p. 380-7.
53. Graziani, G. and P.M. Lical, Neuropilin-1 as Therapeutic Target for Malignant Melanoma. *Front Oncol*, 2015. 5: p. 125.
54. Bondeva, T. and G. Wolf, Role of Neuropilin-1 in Diabetic Nephropathy. *J Clin Med*, 2015. 4(6): p. 1293-311.
55. Ruiz de Almodovar, C., et al., Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev*, 2009. 89(2): p. 607-48.

56. Bender, R.J. and F. Mac Gabhann, Dysregulation of the vascular endothelial growth factor and semaphorin ligand-receptor families in prostate cancer metastasis. *BMC Syst Biol*, 2015. 9: p. 55.
57. Morimoto, K., et al., CD44 mediates hyaluronan binding by human myeloid KG1A and KG1 cells. *Blood*, 1994. 83(3): p. 657-62.
58. Roecklein, B.A. and B. Torok-Storb, Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood*, 1995. 85(4): p. 997-1005.
59. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods*, 2001. 25(4): p. 402-8.
60. Gresch, O., et al., New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods*, 2004. 33(2): p. 151-63.
61. Van Parijs, L., et al., Uncoupling IL-2 signals that regulate T cell proliferation, survival, and Fas-mediated activation-induced cell death. *Immunity*, 1999. 11(3): p. 281-8.
62. Yu, W., et al., Inhibition of pathological retinal neovascularization by semaphorin 3A. *Mol Vis*, 2013. 19: p. 1397-405.
63. Kim, J.A., et al., Microenvironmental remodeling as a parameter and prognostic factor of heterogeneous leukemogenesis in acute myelogenous leukemia. *Cancer Res*, 2015. 75(11): p. 2222-31.
64. Pruneri, G., et al., Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer*, 1999. 81(8): p. 1398-401.
65. Aguayo, A., et al., Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood*, 2000. 96(6): p. 2240-5.
66. Hussong, J.W., G.M. Rodgers, and P.J. Shami, Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 2000. 95(1): p. 309-13.
67. de Bont, E.S., et al., Increased bone marrow vascularization in patients with acute myeloid leukaemia: a possible role for vascular endothelial growth factor. *Br J Haematol*, 2001. 113(2): p. 296-304.
68. Song, Y., et al., Levels of bone marrow microvessel density are crucial for evaluating the status of acute myeloid leukemia. *Oncol Lett*, 2015. 10(1): p. 211-215.
69. Lee, C.Y., et al., Marrow angiogenesis-associated factors as prognostic biomarkers in patients with acute myelogenous leukaemia. *Br J Cancer*, 2007. 97(7): p. 877-82.

70. Brunner, B., et al., Blood levels of angiogenin and vascular endothelial growth factor are elevated in myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia. *J Hematother Stem Cell Res*, 2002. 11(1): p. 119-25.
71. Fiedler, W., et al., Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood*, 1997. 89(6): p. 1870-5.
72. Mourah, S., et al., Quantification of VEGF isoforms and VEGFR transcripts by qRT-PCR and their significance in acute myeloid leukemia. *Int J Biol Markers*, 2009. 24(1): p. 22-31.
73. Zorat, F., et al., The clinical and biological effects of thalidomide in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 2001. 115(4): p. 881-94.
74. Madry, K., et al., [Angiogenesis in bone marrow of myelodysplastic syndrome patients]. *Pol Arch Med Wewn*, 2007. 117(4): p. 25-30.
75. List, A.F., et al., Vascular endothelial growth factor receptor-1 and receptor-2 initiate a phosphatidylinositide 3-kinase-dependent clonogenic response in acute myeloid leukemia cells. *Exp Hematol*, 2004. 32(6): p. 526-35.
76. Xu, D., F.Y. Meng, and Z.S. Yi, [Role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in development and progress of refractory acute myeloid leukemia]. *Ai Zheng*, 2003. 22(8): p. 844-8.
77. Koistinen, P., et al., Regulation of the acute myeloid leukemia cell line OCI/AML-2 by endothelial nitric oxide synthase under the control of a vascular endothelial growth factor signaling system. *Leukemia*, 2001. 15(9): p. 1433-41.
78. Thakral, G., et al., AML multi-gene panel testing: A review and comparison of two gene panels. *Pathol Res Pract*, 2016. 212(5): p. 372-80.
79. Zhu, Q., et al., Higher EZH2 expression is associated with extramedullary infiltration in acute myeloid leukemia. *Tumour Biol*, 2016.
80. van Gisbergen, M.W., et al., How do changes in the mtDNA and mitochondrial dysfunction influence cancer and cancer therapy? Challenges, opportunities and models. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2015. 764: p. 16-30.
81. Dias, S., et al., Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest*, 2000. 106(4): p. 511-21.
82. Casella, I., et al., Autocrine-paracrine VEGF loops potentiate the maturation of megakaryocytic precursors through Flt1 receptor. *Blood*, 2003. 101(4): p. 1316-23.
83. Kampen, K.R., A. Ter Elst, and E.S. de Bont, Vascular endothelial growth factor signaling in acute myeloid leukemia. *Cell Mol Life Sci*, 2013. 70(8): p. 1307-17.
84. Yang, X.H., B. Wang, and J.M. Cunningham, Identification of epigenetic modifications that contribute to pathogenesis in therapy-related AML: Effective

- integration of genome-wide histone modification with transcriptional profiles. *BMC Med Genomics*, 2015. 8 Suppl 2: p. S6.
85. Kornblau, S.M., et al., Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. *Blood*, 2010. 116(20): p. 4251-61.
 86. Santos, S.C. and S. Dias, Internal and external autocrine VEGF/KDR loops regulate survival of subsets of acute leukemia through distinct signaling pathways. *Blood*, 2004. 103(10): p. 3883-9.
 87. Catalano, A., et al., Cross-talk between vascular endothelial growth factor and semaphorin-3A pathway in the regulation of normal and malignant mesothelial cell proliferation. *FASEB J*, 2004. 18(2): p. 358-60.
 88. Zhang, J., et al., Cross-talk between leukemic and endothelial cells promotes angiogenesis by VEGF activation of the Notch/Dll4 pathway. *Carcinogenesis*, 2013. 34(3): p. 667-77.

ANEXOS

ANEXO I - Parecer do comitê de ética.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 02/02/12
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 1209/2011 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1110.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "BIOLOGIA DAS DOENÇAS NEOPLÁSICAS DA MEDULA ÓSSEA".
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Teresinha Olalla Saad
INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 11/11/2011
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 02/02/13 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II – OBJETIVOS.

Investigar os fatores envolvidos na auto-renovação e manutenção de células neoplásicas da medula óssea, a saber, as mielodisplasias, as leucemias agudas, mielóide linfóide, e o mieloma múltiplo.

III – SUMÁRIO.

Trata-se de projeto temático que visa investigar os mecanismos moleculares das interações, mudanças epigenéticas e caracterização funcional de proteínas envolvidas na patogênese de células neoplásicas que ocorrem no microambiente da medula óssea e regulam a diferenciação, proliferação e sobrevivência destas células. A estratégia de investigação envolve modelos *in vitro*, implantação de modelos em animais, ensaios funcionais, validação de resultados em coortes de pacientes, entre outros. É composto pelos "sub-projetos" assim intitulados: Nicho e auto-renovação; autofagia como alvo em malignidades hematopoiéticas; Novos ativos; Investigação de vias desreguladas em mielodisplasia, leucemias agudas e mieloma múltiplo a partir de resultados prévios obtidos em microarrays; Sequenciamento de última geração para investigação de casos selecionados; Imunomodulação; Caracterização estrutural de proteínas envolvidas em vias de sinalização celular de neoplasias hematológicas. O projeto inclui na inscrição das estratégias o item "Pacientes", no qual consta: "Este projeto foi submetido para apreciação do comitê de ética e aguarda parecer". Nestes itens informa-se que serão realizadas coletas de medula junto às coletas de rotina, para análise morfológica e de cariótipo. Além disto, serão obtidas medulas ósseas de controles normais, por ocasião da coleta de doação de doadores de medula óssea. Entre os pacientes, serão convidados aqueles com diagnóstico preciso de mielodisplasia e que estejam em acompanhamento por pelo menos 6 meses. A coleta (pacientes ou controles) será de 5 mL de medula, visando 1) extração de mRNA, 2) citometria de fluxo, 3) seleção de células CD34+, 4) co-cultivo com células estromais, 5) tratamento *in vitro* de células em suspensão com os agentes terapêuticos, 6) tratamento *in vitro* com agentes terapêuticos em ambiente de células estromais, 7) transplante xenogênico, 8) extração de DNA para investigação das mutações em casos selecionados. Não há informação do número de doadores previstos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br


V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

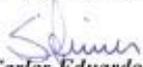
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
 PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
 FCM / UNICAMP