

JULIANA MARTINS XAVIER FERRUCIO

Autorrenovação de células-tronco hematopoiéticas: Papel da via Hedgehog na mielodisplasia e da Arhgap21 na hematopoiese

> CAMPINAS 2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS Faculdade de Ciências Médicas

JULIANA MARTINS XAVIER FERRUCIO

Autorrenovação de células-tronco hematopoiéticas:

Papel da via Hedgehog na mielodisplasia e da

Arhgap21 na hematopoiese

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para Obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, Área de Concentração Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento.

ORIENTADOR: SARA TEREZINHA OLALLA SAAD

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO JULIANA MARTINS XAVIER FERRUCIO, E ORIENTADO PELO PROF. DR. SARA TEREZINHA OLALLA SAAD.

> CAMPINAS 2015

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

 Xavier Ferrucio, Juliana Martins, 1986-Autorrenovação de células-tronco hematopoiéticas : papel da via Hedgehog na mielodisplasia e da Arhgap21 na hematopoiese / Juliana Martins Xavier Ferrucio. --Campinas, SP : [s.n.], 2015.
Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.
1. Hematopoese . 2. Proteínas Hedgehog. 3. Síndromes mielodisplásicas. 4. Arhgap21 proteína de camundongo . 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: Hematopoietic stem cells self-renew : the role of the Hedgehog pathway in myelodysplastic syndrome and Arhgap21 in hematopoiesis Palavras-chave em inglês: Hematopoiesis Hedgehog proteins Myelodysplastic syndromes Arhgap21, Protein, Mouse Área de concentração: Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento Titulação: Doutora em Fisiopatologia Médica Banca examinadora: Sara Teresinha Olalla Saad [Orientador] Eduardo Magalhães Rego Rodrigo do Tocantins Calado de Soloma Rodrigues Jose Andres Yunes Nicola Amanda Conran Zorzetto Data de defesa: 20-02-2015 Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

JULIANA MARTINS XAVIER FERRUCIO

Orientacor (a) PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

	A. Laker	
1. PROF(A). DR(A). SAF	TERESINHA OLALLA SAAD Studente	
	1/2/ The	
2. PROF(A). DR(A). EDU	RDO MAGALHÃES REGO	
		tr.M. And
3. PROF(A). DR(A). ROI	IGO DO TOCANTINS CALADO DE SOLOMA RODRIGUES	Jet al
	Vr	NI
4. PROF(A).DR(A). JOSI	NDRES YUNES	
		2.5
5. PROF(A).DR(A). NICC	A AMANDA CONRAN ZORZETTO	
	* 15	

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

Data: 20 de fevereiro de 2015

RESUMO

A hematopoiese, processo pelo qual a célula-tronco hematopoiética (CTH) dá origem a todas as células do sangue, é regulada através do seu contato com diversos tipos celulares que compõem o estroma da medula óssea, mantendo o balanço entre autorrenovação e diferenciação das CTHs, processos também regulados por vias de sinalização como a via Hedgehog e proteínas reguladoras de citoesqueleto como RhoGTPases.

Sendo assim, os objetivos gerais do trabalho foram investigar a via Hedgehog na medula óssea de pacientes com síndromes mielodisplásica (SMD) e a função da ARHGAP21 na autorrenovação das CTH.

Através de imunohistoquímica de bióspias de medula óssea de pacientes com SMD em comparação com anemia megaloblástica (usada como controle) observamos o aumento de células marcadas para os ligantes Sonic e Dessert Hedgehog e células positivas para c-Kit nas amostras de SMD. Em seguida, analisamos a expressão gênica dos membros da via Hedgehog em células totais de medula óssea de pacientes SMD e doadores normais. Não houve diferença na expressão de Patched (PTCH) em SMD em comparação com doadores saudáveis, porém quando as amostras são classificadas de acordo com a WHO 2008, observamos aumento significativo de PTCH nos pacientes com <5% de blastos na medula óssea (AR, ARSA e CRDM). As expressões tanto de GLI1 como de SUFU foram reduzidas nos pacientes SMD e no grupo de pacientes com ARSA, CRDM e CRDU quando comparados aos doadores normais. A expressão de SUFU também foi reduzida em grupo de pacientes SMD com \geq 5% de blastos na medula óssea (AREB-1 e 2). Observamos aumento de 7 vezes na expressão de SMO no grupo de SMD e de 14 vezes no grupo AREB-1 e 2 em comparação com doadores normais. Análises de sobrevida de Cox demonstraram que o aumento na expressão de SMO e a redução na expressão de PTCH são fatores independentes na sobrevida global dos pacientes com SMD. Além disso, confirmamos o aumento da ativação da via Hedgehog em células CD34⁺ de pacientes com SMD através do aumento da expressão dos alvos da via: GLI1, BMI1 e Nanog. Nossos dados

indicam que a via Hedgehog está desregulada na medula óssea dos pacientes com SMD e o possível envolvimento dessa via na progressão da doença.

Através do modelo murino *Arhgap21*^{+/-} estudamos a importância dessa proteína na hematopoiese normal e observamos que esses animais apresentam redução nas diferenciações eritroide e megacariocítica juntamente com aumento da mobilização mielóide. Observamos ainda o aumento na frequência das CTHs de curta e longa duração na medula óssea dos heterozigotos. Esse aumento foi responsável pela maior recuperação no número de neutrófilos após indução de estresse hematopoiético nos animais *Arhgap21*^{+/-}. Durante o transplante seriado de células de medula óssea observamos menor reconstituição após 4 semanas, juntamente com menor reconstituição a longo prazo nos animais que receberam células dos heterozigotos, sugerindo menor autorrenovação das CTHs nas células com redução da Arhgap21.

O nicho medular dos animais *Arhgap21*^{+/-} demonstrou redução no suporte inicial da hematopoiese o que foi relacionado à maior produção de ROS após irradição subletal dos heterozigotos. Juntos, esses resultados indicam que a ARHGAP21 tem importante papel na hematopoiese normal, pois participa de processos como a diferenciação, mobilização e autorrenovação das CTHs.

Palavras chaves: Autorrenovação. Célula-tronco hematopoiética. Via Hedgehog. Síndrome mielodisplásica. Arhgap21.

ABSTRACT

Hematopoiesis is a process by which hematopoietic stem cell (HSC) gives rise to all blood cells and it is regulated by HSC contact with different cell types that compose the bone marrow stroma and maintain the balance between HSC selfrenewal and differentiation, processes that are also regulated by signaling pathways such as the Hedgehog and regulatory proteins of the cytoskeleton as RhoGTPases.

The overall aims of this work were to investigate the Hedgehog pathway in myelodysplastic syndrome (MDS) bone marrow and the ARHGAP21 role in hematopoiesis.

Immunohistochemistry assays revealed that MDS bone marrow biopsies showed increased Sonic and Dessert Hedgehog together with c-kit positive stained cells compared to megaloblastic anemia (used as control).We also analyzed gene expression of the Hedgehog pathway members in total cells from MDS bone marrow and healthy donors. There was no difference in Patched (PTCH) expression in MDS compared to healthy donors, however, when MDS samples were classified according to WHO 2008, we observed a significant increase in *PTCH1* expression in MDS patients <5% bone marrow blast (RCUD, RCMD, ARSA). *GL11 and SUFU* expressions were significantly reduced in the MDS patients and in the group of patients with RCUD, RCMD, ARSA, when compared to healthy donors. *SUFU* expression was also decreased in MDS patients \geq 5% bone marrow blast (RAEB-1 and RAEB-2) compared to controls. We also observed 7-fold increase of *SMO* transcripts in the MDS group and 14-fold increase in RAEB-1 and RAEB-2. Cox survival analyses showed that increased SMO and decreased PTCH expression were considered as independent factors influencing the survival of these patients.

We also confirmed the enhanced Hedgehog activation in CD34⁺ cells from MDS patients through increased expression of the pathway targets: GLI1, BMI1 and Nanog. Together, our data indicate that the Hedgehog pathway is deregulated in MDS bone marrow and the possible role of that pathway in disease progression.

Arhgap21^{+/-} murine model study showed the importance of this protein in normal hematopoiesis as these animals showed alterations in erythroid and megakariocyte differentiation along with increased myeloid mobilization. We also

observed increased short and long term HSC frequency in the heterozygous bone marrow. This increase was responsible for enhanced neutrophil reconstitution during induced hematopoietic stress in *Arhgap21*^{+/-}.

Serial bone marrow transplantation assay showed lower chimerism in peripheral blood 4 weeks after the transplant together with lower long term reconstitution in animals who received *Arhgap21*^{+/-} bone marrow, indicating decreased HSC self-renew from heterozygous cells. Bone marrow niche of *Arhgap21*^{+/-} animals showed a reduction in initial support hematopoiesis and this result was correlated with the increased ROS production from *Arhgap21*^{+/-} bone marrow after sublethally irradiation.

Taken together, our data indicate that ARHGAP21 has an important role in hematopoiesis regulating process such as differentiation, mobilization and self-renewal of HSC.

Key words: Self-renewal. Hematopoietic stem cells. Hedgehog pathway. Myelodysplastic syndrome. Arhgap21.

SUMÁRIO

RESUMOvii
ABSTRACTix
AGRADECIMENTOSxv
LISTA DE FIGURASxxi
LISTA DE TABELASxxv
LISTA DE ABREVIAÇÕES xxvii
INTRODUÇÃO
OBJETIVOS
MATERIAIS E MÉTODOS
RESULTADOS73
PARTE I: Estudo da via Hedgehog na mielodisplasia75
PARTE II: Papel da Arhgap21 na hematopoiese e na autorrenovação de
células tronco hematopoiéticas87
DISCUSSÃO 109
CONCLUSÃO 125
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS129
ANEXOS

Dedico este trabalho à minha mãe, meu exemplo de força, feminilidade e profissionalismo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Julio e Ana Maria, pela educação que me proporcionaram e, apesar de não terem tido a oportunidade de fazer faculdade, sempre insistirem na importância do estudo e do conhecimento. Em especial a minha mãe, por tudo o que sou. Por me ensinar a disciplina e o carinho. Por confiar tanto em mim e por acreditar em todos os meus sonhos, muito mais que eu mesma.

Ao meu amor, Bruno, por ser o melhor companheiro que eu poderia ter em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis, que se tornaram menos difíceis por você estar por perto. Sou muito melhor porque tenho você. Obrigada por me apoiar mesmo sem entender direito o que faço e por embarcar no que seria a "oportunidade da minha vida" para ser a "experiência das nossas vidas".

Aos meus avôs Maria Tereza e Adalberto, os responsáveis por minha infância maravilhosa e por tantas lembranças. Ao meu avô, a pessoa que mais se orgulhou de mim e que durante meu doutorado tornou-se meu orientador lá do céu. A minha família: Paulo, Tereza, Bianca e Ricardo, obrigada pelo amor, suporte e por torcerem e acreditarem em mim.

À minha orientadora Profa. Dra. Sara Saad, que me recebeu no primeiro ano da faculdade e confiou em mim desde o princípio. Meu grande exemplo pessoal e profissional que tive a oportunidade de trabalhar junto há praticamente 10 anos. Ensinou-me a sonhar sem deixar de lado a independência e a objetividade.

À minha amiga Lauremília Ricon, nossa amizade foi amor àterceira vista. Somos diferentes e complementares. Agradeço por todo aprendizado que me proporcionou com nosso convívio tão intenso onde compartilhamos momentos de alegrias, angústias e medos. Meu exemplo de mãe e profissional.

À minha amiga Karla, minha calma de todos os dias. Obrigada pelo companheirismo. Pelo suporte intelectual, técnico, emocional e por tanto carinho.

À minha amiga Letícia, que me ensinou tanto. Tenho sorte, pois meu trabalho tem muita influência sua. Obrigada pela sua generosidade.

Às minhas queridas amigas Mariana e Karin, que estão comigo desde a iniciação e à Patrícia Favaro que me ajudou muito na finalização desse trabalho. Obrigada pela orientação, companheirismo, preocupação, carinho e amizade.

À querida Ana Leda, por ter me ensinado tudo o que sei sobre citometria. Além do conhecimento técnico, sempre tem aquela palavra que eu estou precisando ouvir e que junto com a Irene, me ajudam a ser uma pessoa cada vez melhor.

Ao professor Hernandes (IB Unicamp) que me acolheu em seu laboratório sempre que precisei. Obrigada por todo o seu incentivo e conselhos.

Ao professor Stefan Bohlander (LMU-Munique), por ter me recebido tão bem em seu grupo e por todo aprendizado indispensável na minha formação.

Ao professor José Vassalo por ter disponibilizado seu laboratório, pela ajuda com as análises e ao Paulinho pela ajuda na imunohistoquímica, sempre com bom humor.

Ao Gilberto (CIPOI-Unicamp) pela excelente colaboração. Por disponibilizar seu laboratório, me ensinar sobre experimentação animal e por madrugar para levar meus animais para irradiar em São Paulo.

xvi

A Beth e ao Carlos (IPEN-USP) pela ajuda e por me receberem tão prontamente nas irradiações dos camundongos.

Aos meus queridos amigos da faculdade: Marcela, Andréa, Débora, Maria Letícia e Fábio, meu quarteto que sempre aliviou meu stress e entendeu a minha ausência.

As minhas amigas de Mogi: Aline, Fernanda, Mery, Laura e Marina, que acompanharam todo meu crescimento, meu interesse pela pesquisa desde o colégio e sempre estiveram comigo nos dias tristes e felizes.

Aos meninos do laboratório: Tiba, Victor, Matheus e João Kleber por serem sempre tão queridos comigo e por tornarem o meu dia-a-dia mais leve.

Aos meus amigos de tantos outros lugares fora do trabalho: Mazinha, Andréa, Luis, Ana e Wilson por tornarem a minha vida mais feliz e muito mais fácil.

À Tereza Sueko pela amizade, socorro em inúmeros momentos e o melhor abraço.

A Patrícia Juliani e a Raquel por estarem sempre dispostas a resolver os problemas da forma mais rápida possivel.

A Lena e Simone por serem as primeiras a me receberem no laboratório e cuidarem tão bem de mim desde então.

À Arlete e ao Michel pelo apóio didático durante a realização deste trabalho.

Aos alunos e funcionários do Laboratório de Biologia Molecular e Celular que acompanharam meu trabalho: Adriana, Fernanda Niemann, João, Rita, Bruna, Vanessa, Aline, Andrana, Fernanda Roversi, Flávia, Juares, Renata, Fernando, Isabela, Paula, Marisa e Ada. Obrigada por tornarem o ambiente mais alegre e por terem contribuído tanto na execução desse trabalho.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e CAPES.

Agradeço a Deus pela minha vida, pela minha saúde e por me dar sempre força e por mais esta conquista.

"Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a

colaborar e improvisar foram os que prevaleceram".

Charles Darwin

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cascata hematopoética.

Figura 2: O nicho das células-tronco e progenitoras hematopoéticas.

Figura 3. Ativação da via Hedgehog em célula hematopoiética.

Figura 4. Patogênese das síndromes mielodisplásicas (SMD).

Figura 5. Função das RhoGTPases na regulação das atividades das células-

tronco e progenitoras hematopoiéticas.

Figura 6. Regulação das RhoGTPases.

Figura 7. Exemplo de PCR da genotipagem de prole gerada do cruzamento entre camundongos selvagens (WT) e Arhgap21^{+/-}.

Figura 8. Ligantes Hedgehog têm expressão aumentada em medula de pacientes com mielodisplasia.

Figura 9. Ligantes da via Hedgehog que são mais expressos em medula óssea de SMD possuem correlação positiva com marcador de célula tronco hematopoiética. Figura 10. Via Hedgehog está desregulada em medula óssea de pacientes com mielodisplasia quando comparados a doadores normais.

Figura 11. Aumento da expressão dos reguladores e alvos da via Hedgehog em células CD34⁺ de sangue periférico de pacientes com mielodisplasia quando comparados a doadores normais.

Figura 12. Caracterização da população linfoide do camundongo Arhgap21^{+/-}.

Figura 13. Camundongo *Arhgap21^{+/-}* apresenta diminuição na diferenciação eritróide.

Figura 14. Alteração na diferenciação megacariocítica dos animais Arhgap21

Figura 15. Redução da Arhgap21 afeta frequência das células-tronco hematopoiéticas (CTH) na medula óssea e a reconstituição após indução de estresse hematopoiético de camundongos heterozigotos.

Figura 16. Alteração da população mieloide de camundongos Arhgap21^{+/-}.

Figura 17. Aumento da mobilização mieloide e de células-tronco hematopoiéticas

(CTHs) após estímulo com 5-Fluoracil ou AMD3100 em camundongos Arhgap21+/-

Figura 18. Redução na formação de colônias *in vitro* e *in vivo* de camundongos *Arhgap21*^{+/-}.

Figura 19. Frequencia de células tronco hematopoiéticas é reduzida após 8 semanas do transplante primário de células selvagens utilizando-se como recepetores camundongos selvagens e *Arhgap21*^{+/-}.

Figura 20. Redução na reconstituição do sangue periférico após 12 e 16 semanas do transplante primário utilizando-se como recepetores camundongos selvagens e *Arhgap21*^{+/-}.

Figura 21. Redução na reconstituição inicial da medula óssea e da autorrenovação das células-tronco hematopoiéticas de animais transplantados com células de camundongos *Arhgap21*^{+/-}.

Figura 22. Leve redução na reconstituição do sangue periférico após 12 semanas e das células-tronco hematopoiéticas (CTH) após 8 semanas do transplante primário utilizando-se como receptor camundongos *Arhgap21*^{+/-}.

Figura 23. Redução da Arhgap21 no nicho não afeta a reconstituição no transplante secundário.

Figura 24. Medula óssea dos camundongos *Arhgap21^{+/-}* produzem mais espécie reativa de oxigênio (ROS) em resposta a irradiação sub-letal.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes com mielodisplasia utilizados no estudo.

Tabela 2. Sequências dos primers utilizados para PCR em tempo real relacionados a via Hedgehog.

Tabela 3: Sequência dos iniciadores usados para genotipagem dos camundongos *Arhgap21*^{+/-}.

Tabela 4. Análises uni e multivariada da sobrevida global e livre de eventos dos pacientes com mielodisplasia.

Tabela 5. Correlação de Speraman entre a expressão gênica dos membros da via Hedgehog.

LISTA DE ABREVIAÇÕES

- 5-FU 5-Fluoracil
- APC Allophycocyanin
- ARHGAP21 RhoGTPase Activating Protein 21
- BFU-E burst forming unit-erythroid; unidades formadoras da explosão eritroide.
- BMI1 B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog
- cDNA complementary DNA
- CFU colony-forming unit; unidade formadora de colônia.
- CFU-GM colony-forming unit-granulocyte, macrophage; unidade formadora de

colônia granulocítica-macrofágica.

- CFU-S colony-forming unit spleen
- CTH célula-tronco hematopoiética
- CXCL-12 C-X-C motif chemokine 12
- DNA Desoxiribonucleic Acid
- DO densidade óptica
- EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid
- FITC Fluorescein Isothiocyanate
- GFP green fluorescence protein
- GLI1 Glioma-Associated Oncogene Homolog 1
- GLI3 Glioma-Associated Oncogene Homolog 3
- GM-CSF Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
- Gy Gray
- IMDM Iscove's Modified Dulbecco's Media

IPSS - International Prostate Sympton Score

LMA - Leucemia Mieloide Aguda

LSK - Lin⁺ c-kiT⁺Sca⁺

LT-HSC - *Long-term Hematopoietic stem cell*; célula-tronco hematopoiética de longa duração.

MEP - Progenitor Megacariocítico-Eritroide

- MPP Progenitor Multi-Potente
- PBS tampão fostato salino
- PDZ PSD-95/Discs-large/ZO-1
- PE R-Phycoerythrin
- PepBoy Black6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ
- PH Pleckstrin Homology
- PTCH Patched
- RhoA Ras Homolog gene family, member A
- RhoB Ras Homolog gene family, member B
- RhoC Ras Homolog gene family, member C

RhoGAP - Rho GTPase activating protein

- RNA Ribonucleic Acid
- RPM rotações por minuto
- RT-PCR Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction
- SCF Fator de Célula-Tronco
- SFB Soro Fetal Bovino
- SMD Síndrome mielodisplásica

SMO - Smoothened

ST-HSC - *Short-term Hematopoietic stem cell*; célula-tronco hematopoiética de curta duração.

SUFU - Suppressor of Fused Homolog

- TBST Tris-Buffered Saline
- WHO World Health Organization

INTRODUÇÃO

A hematopoiese é um processo hierárquico onde a célula-tronco hematopoiética (CTH) dá origem a todas as células do sangue através da cascata de diferenciação, demonstrada na Figura 1.

Esse processo inicia-se durante a vida embrionária e deve perdurar por toda a fase adulta ocorrendo diariamente [1]. Dessa maneira, torna-se necessária a manutenção do do grupo das células que iniciam essa cascata, que se dá através da autorrenovação das CTHs de longa duração (do inglês *long term hematopoietic stem cell; LT-HSC*) processo pelo qual essa célula gera uma CTH filha idêntica e com a mesma capacidade de autorrenovação[2]. Além disso, através de divisão assimétrica a LT-HSC, além da célula-filha idêntica, também dá origem a CTH de curta duração (do inglês *short term hematopoietic stem cell; ST-HSC*) que possui menor capacidade de autorrenovação e se diferencia no progenitor multi-potente (*do inglês multi-potent progenitor; MPP*) que, por sua vez, diferencia-se progressivamente em progenitores mais comprometidos até originar as linhagens linfoide, mieloide, megacariocítica e eritrocítica [3](Figura 1).



Figura 1: Cascata hematopoética. Ilustração simplificada do processo hematopoético no qual células-tronco hematopoéticas (HSC) se diferenciam progressivamente em progenitores mais comprometidos até originarem todos os tipos de células sanguíneas maduras. LT-HSC= células-tronco hematopoéticas de longa duração; seta indica autorrenovação. ST-HSC= células-tronco de curta duração cuja capacidade de autorrenovação é menor a das células LT-HSC. MPP= Progenitor Multipotente. CMP= Progenitor Mieloide Comum. CLP= Progenitor Linfoide Comum. MEP= Progenitor Megacariocítico-Eritroide. GMP= Progenitor de Granulócitos e Monócitos [1]. *Figura adaptada de [4].*

Existe uma regulação muito fina para que esses processos ocorram de maneira adequada e é através das interações das CTHs com os diversos tipos celulares que compõem o estroma hematopoiético que se dá esse controle. Esse ambiente proporciona nichos específicos para cada etapa da diferenciação das células hematopoiéticas [5]. Na década de 70, Shofield usou o termo nicho para definir microambientes adaptados compostos por células e por substratos extracelulares necessários para apoiar а localização, sobrevivência e autorrenovação de células-tronco in vivo [6]. Conceitualmente, existem, pelo menos, dois tipos de nichos para as CTHs na medual óssea: o nicho endosteal ou osteoblástico e o nicho vascular que, através da troca de sinais bidirecionais,

mantém o balanço entre autorrenovação e diferenciação das CTHs[7], ilustrado na Figura 2.

Diferente do que se acreditava os osteoblastos, que juntamente com os osteoclastos formam o nicho endosteal, não atuam diretamente na CTH; eles secretam fatores importantes para a manutenção do nicho e diferenciação de progenitores linfóides que residem no nicho endosteal[8]. Entretanto, CTHs transplantadas localizam-se preferencialmente, em vasos sanguíneos próximos às regiões endosteais e estão mais próximas a esse nicho do que células progenitoras também transplantadas [9].

Sabe-se que a fração mais quiescente das CTHs localiza-se principalmente na região adjacente aos vasos sanguíneos da medula óssea (nicho vascular), onde sua manutenção é regulada por células endoteliais e mesenquimais estromais através da secreção de fatores, como por exemplo, SCF (do inglês, *Stem Cell Factor*) e da quimiocina CXCL-12[5].

Foi descrito que essas células endoteliais e mesenquimais estão sob forte influência das fibras do sistema nervoso simpático [10] que também regulam a secreção de CXCL12 pelos macrófagos de acordo com o ritmo circadiano[11, 12].

Os monócitos e macrófagos são as principais células encontradas no nicho da medula óssea após irradiação, onde eles protegem o grupo de CTHs da exaustão produzindo prostaglandina E2 para mantê-las indiferenciadas; a perda dos macrófagos resulta no egresso das CTHs para a circulação sanguínea [13].

Os processos de manutenção do fluxo dinâmico das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas entre os microambientes da medula óssea e o sangue periférico são essenciais para a hematopoiese homeostática; são eles: o

35

homing, pelo qual as células-tronco e progenitoras hematopoéticas presentes na circulação sanguínea cruzam a barreira endotelial e se alojam na medula óssea; e a mobilização que, ao contrário do *homing*, é a saída das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas da medula óssea para o sangue periférico em resposta a algum estímulo [14]. Esse tráfego pode ser induzido pela ação de citocinas, quimioterapia, e antagonistas de quimiocinas. O uso de drogas indutoras de tráfego como o inibidor de CXCR4 (AMD3100) e o fator estimulador de formação de colônia granulocítica (do inglês, *Granulocyte-colony stimulating factor, G-CSF*) permitem a coleta de células-tronco e progenitoras para o uso terapêutico como o transplante de medula óssea [15].


Figura 2: O nicho das células-tronco e progenitoras hematopoéticas. As células-tronco hematopoéticas (na figura HSC) são principalmente encontradas na região adjacente aos vasos sanguíneos da medula óssea, onde sua manutenção é regulada principalmente por células endoteliais e mesenquimais estromais através da secreção de fatores, como SCF (do inglês, *Stem Cell Factor*) e CXCL-12. As fibras do sistema nervoso simpático, através das células Schwann regulam a retenção das HSC. Outras células importantes para a regulação do nicho hematopoético são os macrófagos, osteoclastos e as células CAR (células reticulares abundantes em CXCL-12). Os osteoblastos não atuam diretamente na célula-tronco hematopoética, mas secretam fatores para a manutenção do nicho e diferenciação de progenitores linfóides que residem no nicho endosteal. *Figura adaptada de*[5].

Via Hedgehog

Uma importante via de sinalização que regula a autorrenovação de CTHs é a via Hedgehog, que foi descrita pela primeira vez em *Drosophila* como sendo um

importante regulador no desenvolvimento e no destino de diferenciação da célula [16] . Em mamíferos existem 3 isoformas de ligantes Hedgehog: Sonic (SHH), Dessert (DHH) e Indian (IHH) Hedgehog, cuja expressão depende, principalmente, do status de desenvolvimento do tecido [17]. Na ausência dos ligantes Hedgehog, o receptor transmembrânico Patched (PTCH) reprime a atividade do transdutor Smoothened (SMO). Após a interação de um dos ligantes Hedgehog a PTCH ocorre mudança conformacional no receptor que deixa de inibir SMO[18].

Em células que respondem à via Hedgehog, a ativação de SMO deflagra eventos de sinalização que culminam na ativação de fatores de transcrição pertencentes à família GLI: GLI1, GLI2 e GLI3(do inglês, glioma-associated oncogene). Uma vez ativo, GLI transloca-se para o núcleo onde modifica a expressão de genes alvo incluindo elementos regulatórios negativo (PTCH) e positivo (GLI1) que ativam a transcrição programada de alvos da via Hedgehog como: Myc, Ciclinas D e E, Patched, GLI1, Nanog e BMI1 [19].Outro regulador da via Hedgehog é o supressor de proteínas fusionadas (do inglês, Supressor of fused protein ou SUFU) que atua de duas maneiras: sequestrando GLI no citoplasma, inibindo, dessa maneira, a sua translocação nuclear[20] ou suprimindo diretamente no núcleo a transcrição regulada por GLI[21]. Um exemplo de ativação da via Hedgehog é apresentado na Figura 3.



Figura 3. Ativação da via Hedgehog em célula hematopoiética. Na ausência dos ligantes Hedgehog, o receptor transmembrânico Patched (PTCH) reprime a atividade do receptor Smoothened (SMO). Após a interação de um dos ligantes Hedgehog [22] a PTCH ocorre mudança conformacional no receptor que deixa de inibir SMO. Isso deflagra sinalização intracelular que libertam proteínas da família GLI da interação com SUFU no citoplasma. GLI livre transloca-se para o núcleo onde age como fator de transcrição de genes alvo da via como *Myc, Ciclinas D* e *E, Patched, GLI1, Nanog* e *BMI1*.

A importância da via Hedgehog na hematopoiese foi inicialmente investigada em 2001, quando um estudo descreveu que SHH juntamente com PTCH e SMO eram expressos em células primitivas do sangue humano e eram responsáveis pela expansão dessa população de células[23].

As proteínas Hedgehog são expressas em todos os órgãos linfoides e são secretadas como ligantes solúveis pelas células estromais da medula óssea[24]. Entretanto, a sinalização Hedgehog pode estimular o ciclo celular de células tronco e progenitoras hematopoiéticas e de progenitores eritróides de maneira parácrina e/ou autócrina [25, 26].

A via Hedgehog tem sido relacionada à várias malignidades hematológicas onde, em cooperação com outras vias, contribui para a manutenção do tumor, o crescimento e a resistência à quimioterapia[27]. Em recente estudo de triagem de ribavirina para pacientes com leucemia mieloide aguda [28]foi observado que 9 entre 9 pacientes resistentes à droga apresentaram aumento na expressão de GLI1. Além disso, a expressão de GLI1 foi fortemente associada ao pior prognóstico em LMA[29].

Estudos sugerem que a via Hedgehog participa na sobrevivência e na expansão de células-tronco cancerígenas em doenças como mieloma múltiplo, leucemia mieloide crônica e aguda [30-33]. Kobune e colaboradores demonstraram que há ativação da via Hedgehog em blastos e em linhagens celulares CD34⁺ de LMA [32]. Além disso, o mesmo grupo descreveu que células CD34⁺ de LMA e de síndrome mielodisplásica (SMD) apresentam expressão de *IHH* e *SMO*[34].

Célula-tronco leucêmica e síndromes mielodisplásicas

A quiescência é muito importante para se manter o grupo das CTHs na medula óssea, entretanto, estudos demonstram que a quiescência não é uma capacidade exclusiva das células-tronco normais, uma vez que que as célulastronco leucêmicas podem interferir nos sinais entre o nicho e a célula-tronco normal ou até mesmo recrutar outras células e estabelecer um novo nicho, tornando-se também quiescentes [35]. Apesar de apresentarem um imunofenótipo mais maduro que as CTHs normais, através de transformação oncogênica, as células-tronco leucêmicas adiquirem capacidade de autorrenovação e acredita-se

que esta pode ser uma das causas de recorrência de LMA [28] após o tratamento com quimioterápicos [36].

Essa caracterização das capacidades de quiescência e autorrenovação das células-tronco leucêmicas permitiu a suposição de que a leucemia respeite uma organização hierárquica semelhante à hematopoiese normal, na qual existe uma população rara de células com potencial de autorrenovação que dá origem a outra população de células que perde esse potencial. [37].

Assim como em LMA, recentemente foi comprovado que as SMDs também possuem um tipo de célula-tronco cancerígena, responsável pela propagação da doença [38]. Isso foi possível graças a estudos recentes usando modelos murinos de SMD bem como células primárias provenientes de pacientes que confirmaram as evidências que suas células-tronco e progenitoras hematopoiéticas estão criticamente alteradas [39-41]. Essas células-tronco е progenitoras hematopoiéticas apresentam alterações na proliferação e na diferenciação e, dessa maneira, persistem e expandem após o tratamento, levando às recaídas após remissão clínica[42]. Sendo assim, genes reguladores da autorrenovação, diferenciação e quiescência das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas são alvos terapêuticos potenciais.

Embora os eventos relacionados à patogênese da SMD sejam, na maioria, provenientes de defeitos moleculares nas células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, vale ressaltar que a hematopoiese ineficaz encontrada na doença pode ser resultado de anormalidades no microambiente da medula óssea desses pacientes, incluindo desordens tanto da interação da célula hematopoiética

com o estroma quanto da produção de fatores de crescimento pelas células do nicho[43].

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são desordens hematológicas caracterizadas pela hematopoiese ineficaz e pelo risco da progressão para LMA em aproximadamente 1/3 dos pacientes[44].

A hematopoiese ineficaz encontrada na SMD resulta também do aumento da suscetibilidade do clone progenitor mieloide à apoptose que causa citopenia apesar da hipercelularidade observada na medula óssea[45]. A progressão para LMA (demonstrada na Figura 4) ocorre, principalmente, como resultado do subsequente desequilíbrio dos progenitores favorecendo a proliferação em detrimento da apoptose[46].





RhoGTPases

Foram descritas inúmeras moléculas e vias de sinalização que regulam os eventos relacionados à CTH como autorrenovação, *homing* e mobilização, em especial proteínas regulatórias do citoesqueleto como as RhoGTPases, que são fudamentais nos processos celulares como: dinâmica de microtúbulos, sinalização intracelular, tráfego de vesículas, polarização, progressão do ciclo celular, divisão assimétrica, adesão e migração[47-49]. Em mamíferos, a família das RhoGTPases consiste em 22 membros que são divididos em 5 subfamílias: Rho, Rac, Cdc42, Rnd e Rho-BTB baseados na sua sequência, estrutura e função [50].

As funções das RhoGTPases no sistema hematopoiético foram inicialmente estudadas em células maduras como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, onde descreveu-se que a inibição de RhoA diminuía a motilidade de neutrófilos e macrófagos assim como a adesão de leucócitos[51, 52]. Com o avanço das técnicas de desenvolvimento de animais nocaute, novos estudos *in vivo* foram possíveis. Animais nocaute para Rac2 demonstraram aumento no número de CTH circulantes no sangue periférico, como reflexo da redução da adesão dessas células ao microambiente da medula óssea, entretanto, as CTHs desse animal apresentaram aumento na migração segundo o gradiente de CXCL12, possivelmente por mecanismo compensatório, com aumento da atividade de Rac1 e Cdc42 [53].

Por meio de modelo nocaute, Aguilera et al, demonstraram que Vav1, ativador *upstream* de Rac, age nas células estromais do nicho causando danos na mobilização e reconstituição da hematopoiese de curto e longo prazo [54].

Estudos semelhantes com foco em Cdc42 confirmam sua importância nas CTHs para adesão, mobilização, *homing* e reconstituição de curto e longo prazo [55]. A Cdc42 parece atuar também no envelhecimento das células-tronco e progenitoras hematopoéticas. Quando envelhecidas essas células apresentam maior atividade de Cdc42 e menor capacidade de polarização e autorrenovação. Além disso, no que diz respeito à hematopoese, os camundongos nocautes para Cdc42 apresentam fenótipo similar aos camundongos velhos, sugerindo que a Cdc42 regula o mecanismo de envelhecimento das CTHs [56].

Enquanto as CTHs deficientes em Rac1 apresentam problemas na reconstituição da hematopoiese após transplante em receptores irradiados, a reconstituição das CTHs provenientes de animais Rac2^{-/-} é normal [57], entretanto sua interação com o nicho e reconstituição em longo prazo é defeituosa [58].

A inibição de RhoA através da expressão de mutante negativo (RhoAN19) causou aumento na autorrenovação e no potencial de reconstituição das CTHs [59]. Já as CTHs de camundongos RhoA^{-/-}, apesar de manterem a capacidade de reconstituição a longo prazo, falharam na diferenciação para progenitores multipotentes e para as células sanguíneas [60].

As funções das RhoGTPases nas interações entre o nicho e as CTHs são ilustradas na Figura 5.



Figura 5. Função das RhoGTPases na regulação das atividades das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas. RhoGTPases como Rac1, Rac2, Cdc42, RhoA e RhoH e RhoGEF Vav regulam as funções das células-tronco e progenitoras hematopoiéticas (na figura ilustrada como HSC/P). Cdc42 e RhoA controlam a autorrenovação e Cdc42 é necessário para a entrada do ciclo das HSCs quiescentes. Rac1 e Cdc42 controlam a proliferação, enquanto que Rac2 e Cdc42 regulam a sobrevivência das HSCs. Rac1, Rac2 e Cdc42 controlam a retenção das HSCs nos nichos da medula óssea. Vav1 regula a localização das HSCs perto das células-tronco mesenquimais positivas para nestina. Com o envelhecimento, as HSCs apresentam elevados níveis de Cdc42 que está correlacionado com a perda da polaridade e do potencial de autorrenovação. *Figura adaptada de [49].*

As RhoGTPases ciclam entre as formas ativas, quando estão ligadas a GTP, e inativas, quando ligadas a GDP (Figura 3). O ciclo de ativação-inativação das RhoGTPases é controlado por diferentes proteínas: as GEFs (do inglês, *Guanine Exchange Factors*) catalisam a troca de GDP para GTP, ativando as RhoGTPases que se ligam às proteínas efetoras, iniciando uma cascata de sinalização, a qual deflagra os diversos processos celulares dos quais as

RhoGTPases participam; por outro lado, as GAPs (do inglês, *GTPase-activating protein*) promovem a hidrólise do GTP a GDP levando à sua inativação. Além dos GEFs e GAPs, o ciclo de ativação-inativação das RhoGTPases é regulado pelos GDIs (do inglês, *Guanine nucleotide Dissociation Inhibitors*) que seqüestram as formas Rho-GDP (inativas), tentando inibir a ativação aberrante das RhoGTPases. O balanço da ação de GEFs e GAPs é crucial para o adequado funcionamento das RhoGTPases e controle da sua atividade e localização [61]. A regulação das RhoGTPases está representada na Figura 6.



Figura 6. Regulação das RhoGTPases. GEFs catalisam a troca de GDP por GTP ativando as RhoGTPases deflagrando seus efeitos biológicos de ativação. GAPs inativam as RhoGTPases estimulando sua atividade instrínseca de hidrólise do GTP. RhoGDIs se ligam a formas de RhoGTPases ligadas a GDP e regulam a sua distribuição entre a membrana e o citoplasma.

Diferente das RhoGTPases que tiveram suas funções na hematopoiese amplamente estudadas, pouco se sabe da função das RhoGAPs nesses mecanismos. Animais nocaute para Cdc42GAP apresentam aumento na atividade de Ccd42, porém apresentam fenótipo das CTHs muito parecido com os já descritos em animais Cdc42^{-/-}, como problemas de adesão, migração e reconstituição da hematopoiese após transplante, indicando que a regulação da atividade de Cdc42 deve estar estritamente regulada, visto que tanto a sua ativação quanto inibição resulta em migração e adesão ineficazes. Além disso, os animais apresentaram anemia e redução no número de células-tronco e progenitoras hematopoiéticas, na celularidade da medula óssea e na formação de colônias eritróides[62].

Ainda sobre RhoGAP, os animais nocautes para p190-B, GAP de RhoA, apresentam melhora na capacidade de repopulação das CTHs, sem alterar sua proliferação e a diferenciação, mas aumentando a capacidade de autorrenovação dessas células [63]. Esses animais também possuem alterações no nicho da medula óssea, já que as células-tronco mesenquimais p190^{-/-} falham no suporte à hematopoise além de apresentarem defeitos na diferenciação para adipócitos e osteoblastos [64].

ARHGAP21, uma RhoGAP

ARHGAP21 foi descrita pelo nosso grupo em 2002 [65]. O gene que codifica ARHGAP21 humana está presente no braço curto do cromossomo 10 e possui 26 éxons. A proteína codificada possui 1958 aminoácidos, um tamanho predito de 217 kDa e três domínios principais: PDZ, PH e RhoGAP, sendo este último o responsável pela classificação da ARHGAP21 como uma RhoGAP. O dominio PH está envolvido na interação da proteína com componentes de membranas e actina, podendo recrutar a ARHGAP21 para o local celular

apropriado. Já o dominio PDZ está envolvido na mediação de interações proteínaproteína[66].

Em tecidos humanos, a *ARHGAP21* é altamente expressa em cérebro, coração, músculo esquelético e placenta, porém foi observada baixa expressão em medula óssea[65]. No mesmo estudo foi visto que sua expressão gênica aumenta durante a diferenciação mieloide de células HL-60 induzidas com ATRA (ácido all trans-retinoico) e durante a diferenciação eritroide de células CD34⁺ induzida com eritropoetina [65], bem como na diferenciação megacariocítica (dados não publicados). Em relação às neoplasias, foi observada elevada expressão de *ARHGAP21* em carcinomas escamosos de cabeça e pescoço em relação ao tecido normal [67].

O gene da *ARHGAP21* é bem conservado,em termos filogenéticos, em mamíferos. Em camundongos, localiza-se no cromossomo 2, com 27 éxons e cerca de 86% de homologia ao humano. Codifica uma proteína de 1955 aminoácidos, com aproximadamente 217 KDa e, assim como em humanos, apresenta alta expressão em cérebro e coração, porém dados do nosso grupo apontam significativa expressão em medula óssea e baço murinos (dados não publicados).

Estudos demonstram atividade RhoGAP desta proteína para Cdc42[66, 68-71], RhoA [66, 69, 72, 73] e RhoC [73]. Além disso, a ARHGAP21 interage com outras proteínas, como por exemplo, com α -catenina em células epiteliais regulando as junções célula-célula [69], e ARF1- GTP sendo recrutada para o

complexo de Golgi, onde regula o complexo Arp2/3 e a dinâmica de F-actina através de sua atividade sobre Cdc42 [66].

Sabe-se também que a ARHGAP21 interage com β -Arrestina-1, formando um complexo que é estimulado por angiotensina e modula a atividade de RhoA. Quando o complexo β -Arrestina-1/ARHGAP21 é desfeito, a atividade da ARHGAP21 aumenta, atenuando a formação das fibras de estresse [72].

Desde 2002 a caracterização funcional da ARHGAP21 é uma das linhas de pesquisa do nosso grupo, que demostrou que ARHGAP21 interage com PKCζ e FAK, tanto nas formas totais quanto ativas [74]. Em células de glioblastoma humano, a inibição da ARHGAP21 induziu mudanças morfológicas, com desarranjo dos filamentos de actina, aumento da migração e da atividade de Cdc42, ativação da via de sinalização FAK/p130_{CAS} e aumento da secreção de metaloproteinase-2 (MMP-2) [68].

Observamos também que a ARHGAP21 sofre sumolação, mediada por SUMO 2/3 apresentando uma forma de 250kDa que, diferente da sua localização característica nuclear e/ou perinuclear, se encontra no citoplasma e pode estar relacionada à proliferação celular [75]. Em células de linhagem de câncer de próstata, a ARHGAP21 demonstrou-se essencial para a proliferação, migração e morfologia celulares, funções mediadas pelo aumento da atividade de RhoA e RhoC [73]. Nosso grupo ainda constatou que a ARHGAP21 interage também com α-tubulina, sendo necessária para sua acetilação e se co-localiza com a actina na junção célula-célula. Além disso, a sua inibição enfraquece a adesão célula-célula e aumenta a migração celular [76].

Em relação a células hematopoiéticas, nosso grupo, através do desenvolvimento de modelo murino com redução da expressão da Arhgap21, demonstrou que essa proteína é essencial para a migração e adesão das células progenitoras hematopoiéticas, uma vez que células progenitoras hematopoéticas e células negativas para os marcadores de linhagem (Lin⁻) dos camundongos *Arhgap21^{+/-}* demonstraram redução na quimiotaxia induzida por CXCL12 e adesão à fibronectina, além de *homing* ineficaz em transplante de medula óssea[4]. Por outro lado, o papel da Arhgap21 na hematopoiese ainda necessita de melhor entendimento, já que não se sabe sua função nas diferentes populações hematopoiéticas e em outros mecanismos como a reconstituição a curto e longo prazo após transplante de medula óssea. Para responder a essas questões, utilizamos o mesmo modelo dos camundongos *Arhgap21^{+/-}*.

Tendo em vista a importância do conhecimento das vias que regulam autorrenovação tanto homeostática quanto neoplásica, o presente trabalho será divido em dois grandes tópicos: o papel da via Hedgehog na mielodisplasia e da ARHGAP21 na hematopoiese normal.

OBJETIVOS

Parte 1

OBJETIVO GERAL:

Estudar a via Hedgehog na medula óssea de pacientes com mielodisplasia.

Objetivos Específicos:

- Avaliar a expressão dos ligantes da via Hedgehog em cortes histológicos de biópsias de pacientes com mielodisplasia.
- Avaliar a expressão gênica dos receptor *PTCH*, do transdutor *SMO*, do modulador *SUFU* e do efetor GL*I1* em células totais de medula óssea de pacientes com mielodisplasia.
- Avaliar a expressão gênica receptores do modulador SUFU, do efetor GL11

 e dos genes alvo Nanog e BMI1 em células CD34⁺ de pacientes com
 mielodisplasia.
- Correlacionar dados clínicos dos pacientes com dados de expressão dos elementos da via Hedgehog.

Parte 2

OBJETIVO GERAL:

Estudar o papel da *Arhgap21* na hematopoiese através do modelo animal *Arhgap21^{+/-}* gerado pelo nosso grupo.

Objetivos Específicos com camundongo Arhgap21^{+/-}:

1. Realizar a caracterização imunofenotípica das populações hematopoiéticas.

- 2. Avaliar a resposta ao estresse hematopoiético.
- 3. Estudar a reconstituição da hematopoiese a curto e longo prazos.
- 4. Estudar a autorrenovação das CTHs.
- 5. Estudar o papel do nicho osteoblástico na reconstituição da hematopoise após transplante de medula óssea.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Metodologias para o estudo da via Hedgehog na mielodisplasia.

1.1 Obtenção das células de pacientes com SMDs.

O projeto foi submetido para apreciação do Comitê de Ética da UNICAMP e recebeu parecer favorável (número CEP/CONEP 124/2005, ver anexo). Pacientes e controles tiveram a amostra de medula óssea encaminhada para pesquisa com coleta concomitante à realização de coleta para diagnóstico ou doação de medula. O estudo está de acordo com as normas e diretrizes das resoluções 196/96 e 251/97A. Os pacientes com diagnóstico confirmado foram atendidos pelo serviço médico do Hemocentro da Unicamp entre os anos de 1998 e 2013.

Foram coletadas amostras de medula óssea de 25 doadores saudáveis e de 59 pacientes não-tratados com mielodisplasia, classificados como baixo risco(43) e alto risco (16) de acordo com a classificação da organização mundial de saúde (WHO). Células CD34+ foram coletadas do sangue periférico de 20 pacientes SMD (13 baixo e 7 alto risco). Células da medula óssea total e CD34+ foram coletadas de 6 pacientes.

Bióspsias de medula óssea de 17 pacientes com SMD (14 baixo e 3 alto risco) também foram obtidas e foram comparadas a biópsias de medula óssea de 7 pacientes com anemia megaloblástica, utilizados no estudo como controles.

As características clínicas dos pacientes utilizados estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Dados clínicos dos pacientes com mielodisplasia utilizados no estudo.

Características	Valor		
Idade na data da coleta, média (intervalo)	64 (22-96)		
Sexo, <i>n</i> (%)			
Masculino/Feminino	36(61) / 23(39)		
Classificação WHO, <i>n</i>			
AR/RCDM/ARSA	10/30/3		
AREB-1/AREB-2	9/7/14		
Grupo de risco IPSS, <i>n</i>			
Baixo risco (Baixo/ Int-1)	23/28		
Alto risco (Int-2/Alto)	5/2		
Hemograma, média (intervalo)			
Hemoglobina (g/dL)	9,2 (4,27-14,3)		
Neutrófilos (número x10 ⁹ /L)	1,7 (0,3-5,3)		
Plaquetas (número x10 ⁹ /L)	102 (6-669)		
Mielograma, média (intervalo)			
Porcentagem de blastos (%)	2,2 (0-17,5)		

Das amostras de medula óssea total foram isoladas células mononucleadas por centrifugação num gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma) a 1.500rpm por 30 minutos, que foram lavadas 2 vezes em centrifugações a 1500rpm por 10 minutos, à temperatura ambiente. Células mononucleares obtidas da coleta de 5 ml de medula óssea em heparina foram separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque, e separadas para a extração de RNA por Trizol.

Realizamos também coleta de 20mL de sangue periférico de pacientes e doadores saudáveis em heparina. Após separação de células mononucleares, descrita acima, realizamos a separação de células CD34⁺ em colunas de imunoafinidade MIDI-MACS (Miltenyi). A eficiência da separação foi averiguada por citometria de fluxo e foram utilizadas no estudo apenas as amostras com pureza superior a 85%, que seguiram para a extração de RNA pelo kit da GE.

1.2 Extração do RNA total

O RNA de células de medula óssea total foi isolado utilizando-se o Trizol (Invitrogen, Life Technologies, USA). O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Ao precipitado contendo 5×10^6 a 1×10^7 células, foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A purificação do RNA se deu segundo o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer) com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO à 260 nm equivale a 40 μ g/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada

1.3 Tratamento do RNA total com DNAse I

Com o objetivo de eliminar possivel contaminação deste material com DNA genômico, o RNA total de células foi tratado com 1 unidade/µL de DNAse livre de RNAse (Life Techologies), utilizando-se 1 unidade de enzima para tratar 5 µg de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA na concentração final de 2 mM. Subsequentemente, a enzima foi inativada por incubação de 10 minutos a 65°C.

1.4 Transcrição em cDNA

As amostras de RNA total, contendo 2µg de RNA e previamente tratadas com DNAse I, foram reversamente transcritas em cDNA (híbrido RNA-cDNA) em uma reação de volume final de 20 µL (Life Techologies). A reação foi iniciada adicionando-se 1 µL de oligonucleotídeo [25] 500 µg/mL e 1µL da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) a 2 ug de RNA previamente tratado. Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C e, em seguida, incubada em gelo. Adicionou-se, então, 4 µL do tampão de reação 5x, contendo 250 mM Tris-HCI (pH 8,3), 375 mM KCI, 15 mM MgCl₂, e 0,1 M DTT, e também 200 unidades da enzima transcriptase reversa *SuperScript III*, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 50 minutos a 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos a 70°C e finalmente foram adicionadas 40 unidades de Rnase H e a solução incubada por 20 minutos a 37°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer).

1.5 RT-PCR em tempo real

Amplificação gênica em tempo real foi realizada no aparelho ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando-se o reagente *Power SybrGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems). Sessenta nanogramas de cada amostra de cDNA foram utilizados nas reações. A sequência dos iniciadores utilizados encontra-se na Tabela 2. Um controle negativo, com adição de água no lugar 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. Cada reação de PCR em tempo real foi realizada em triplicata. A expressão gênica de *HPRT* foi utilizada como controle endógeno das reações. A quantificação relativa das expressões de cada gene normalizado pelo controle endógeno foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. As sequências dos primers utilizados são apresentadas na Tabela 2. Tabela 2. Sequências dos primers utilizados para PCR em tempo realrelacionados a via Hedgehog.

Gene alvo	Sequência senso	Sequência anti-senso
Patched	TCAGTGTCATCCGCGTGGCC	GCAACCAGCAGGACGCCAG
Smoothened	GCCTGACTTCCTGCGCTGCA	AGGGCACTTCGCACTGGC
GLI1	CAGCCCCAACTCCACAGG	CTGCAGCCATCCCAACGG
SUFU	GACCTAGTGGTTTTGGCTTTGAG	GCCAAGCCCTGCATTAACTC
Nanog	CCAACATCCTGAACCTCAGC	CCTTCTGCGTCACACCATT
BMI1	GCTCATCCTTCTGCTGAT	TTCATTAGAGCCATTGGCAG

1.6 Análise histológica e Imunohistoquímica

Esta técnica foi utilizada em biópsias do banco de pacientes SMD do Hemocentro da Unicamp e da Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Unicamp e realizada em colaboração com o Laboratório de Investigação em Patologia do CIPED, Unicamp.

Biópsias de medula óssea de pacientes com SMD de baixo e alto risco, além de pacientes com anemia megaloblástica (usados como controle) foram submetidas à imunohistoquímica com anticorpos para os ligantes Dessert, Sonic e Indian Hedgehog, além de c-Kit.

As amostras foram fixadas em 10% de tampão formalina, descalcificadas em EDTA e embebidas em parafina. Os cortes de 4mm foram re-hidratados com lavagens seriadas de etanol e tampão salino Tris (TBS; 10mM Tris com pH 7.4, 150mM NaCl) com Tween-20 (0.05%). Para a recuperação antigênica, os cortes foram imersos em uma solução de 20 µg/ml de proteinase k por 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, os corte foram bloqueados utilizando métodos padrões com 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos (anti-c-kit, anti-SHH, anti-DHH e anti-IHH) foram diluídos a 1:50 e incubados durante a noite a 4°C. Os cortes foram lavados com TBST antes e depois da marcação com anticorpos secundários. Além disso, foram lavados com tampão de acetato equilibrado. O corante ELF97 TRAcP foi diluído em tampão de acetato em 1:1000 e os cortes foram inucubados por 15 minutos a temperatura ambiente.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz com aumento de 400x e foram feitas 4 fotografias de diferentes áreas contendo alta frequência de células marcadas em cada lâmina. As células marcadas foram contadas com a ajuda do software ImageJ.

1.7 Análises Estatísticas

Os grupos foram comparados utilizando teste de Mann-Whitney e coeficiente de correlação de Spearman utilizando-se o software GraphPad.

Análises de sobrevida foram realizadas com o método Kaplan-Meier e a sobrevida global foi definida como o tempo (em meses) entre a data da coleta e a data de morte ou do último acompanhamento. Já a progressão livre de eventos foi definida como o tempo (em meses) entre a coleta e a data do primeiro evento (morte, progressão na classificação de SMD ou transformação leucêmica) ou o último acompanhamento. O modelo de riscos proporcionais de Cox foi usado para avaliar a sobrevida dos pacientes em relação à cada uma das variáveis.

Na análise múltipla o critério de seleção de variáveis *stepwise* foi usado para encontrar os fatores de risco que atuam em conjunto na sobrevida. Variáveis numéricas com ou sem distribuição normal foram classificadas para análise. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando p<0.05.

2.0 Metodologias para o estudo da Arhgap21 na hematopoiese.

2.1 Caracterização do animal heterozigoto para Arhgap21

A geração dos camundongos noucates para *Arhgap21* foi realizada pelas doutoras Carolina Bigarela e Lauremília Ricon. Células-tronco embrionárias com inibição do transcrito da Arhgap21 foram obtidas do consórcio GeneTrap (<u>http://www.genetrap.org</u>) e injetadas em blastocisto de camundongos C57/Bl6 realizada no CEDEME-UNIFESP, sob supervisão do professor João Pesquero. A linhagem C57/Bl6 é a mais comumente usada na geração de animais transgênicos. Além disso, a maioria dos trabalhos relacionados ao estudo da hematopoese a utilizam como modelo.

O vetor inserido nas células-tronco embrionárias possui um gene *reporter*, o β -Geo, que permite a genotipagem dos animais heterozigotos (*Arhgap21*^{+/-}) gerados. As quimeras foram cruzadas com animais C57/BI/6/JUnib selvagens (Cemib, Unicamp). A prole possuía animais heterozigotos, que apresentavam pelagem aguti, e animais selvagens (ou WT, abreviatura utilizada nas figuras e legendas relativa à denominação do inglês *wild type*) que foram genotipados através de PCR do DNA genômico, utilizando iniciadores no gene *reporter* (β - Geo).

Foram realizados 10 cruzamentos consecutivos para a obtenção de animais trangênicos com background C57/BI6, após a qual foram iniciados os cruzamentos entre camundongos heterozigotos para obtenção do animal nocaute. Inicialmente

foram gerados dois fundadores, entretanto, durante os cruzamentos foram selecionados apenas um chamado de ARHG21RRR.

2.2 Genotipagem dos camundongos heterozigotos (Arhgap21^{+/-})

A prole gerada do cruzamento entre animais heterozigotos (*Arhgap21*^{+/-}) e selvagens foi genotipada através de PCR do DNA genômico, usando um par de iniciadores no gene *reporter* da construção. O fragmento gerado por este PCR é de 587 pares de base (bp), presente apenas nos *Arhgap21*^{+/-}. O ciclo da reação foi: desnaturação inicial: 94°C – 30 segundos; Ciclo de 35 vezes : 94°C – 15 segundos; 58°C- 40 segundos; 72°C – 1 minuto; Extensão final: 72°C – 5 minutos, com enzima Taq Polimerase (ThermoScientific).

Tabela 3: Sequência dos iniciadores usados para genotipagem dos camundongos *Arhgap21*^{+/-}

Gene alvo	Sequência senso	Sequência antissenso
β -Geo	GGCGCCTCATGAATATTAACC	CACTCCAACCTCCGCAAACTC



Figura 7. Exemplo de PCR da genotipagem de prole gerada do cruzamento entre camundongos selvagens (WT) e *Arhgap21^{+/-}*. As setas azuis mostram as amostras nas quais houve amplificação do fragmento de aproximadamente 580bp correspondente à construção do vetor inserido para inibição gênica da Arhgap21 e que caracteriza os animais *Arhgap21^{+/-}*. Gel de agarose 1% com brometo de etídio. B: Branco; CTRL: Controle positivo (DNA da célula-tronco embrionária); 1-17: prole de duas fêmeas de cruzamento entre selvagens e Arhgap21^{+/-} [4]

2.3 Obtenção das células da medula óssea murina

O projeto obteve parecer favorável no comitê de ética animal número 2146-1 da UNICAMP (ver anexo). As células da medula óssea foram obtidas através da maceração de fêmures, tíbias e úmeros de animais selvagens C57/BI/6/JUnib (Cemib, Unicamp) ou *Arhgap21^{+/-}*. As hemácias foram lisadas por 15 minutos no gelo com solução tampão de lise (155mM NH₄Cl, 10 mM NaHCO₃, 0,1 mM mM EDTA). Em seguida, lavou-se 3 vezes com PBS e por fim, as células foram ressuspendidas em meio ou PBS dependendo da utilização.

2.4 Imunofenotipagem das populações hematopoiéticas murinas

1x10⁶ células de medula óssea ou de sangue periférico foram obtidas como descrito acima e marcadas para análise das seguintes populações hematopoiéticas: CTH de longa duração (LT-LSK): CD4-FITC, CD8-FITC, B220-FITC, Ter119-FITC, Gr1-FITC, Mac1-FITC, Sca1-PerCP, c-Kit-APC-Cy7, CD150-PE e CD48-PE-Cy7(todos BD Pharmingen) ; CTH de curta duração (ST-LSK):

CD4-FITC, CD8-FITC, B220-FITC, Ter119-FITC, Gr1-FITC, Mac1-FITC, Sca1-PE (todos BD Pharmingen) e c-Kit-APC(eBioscience, Affymetrix); linhagem linfoide B: B220-FITC; linhagem linfoide T: CD4-FITC, CD8-PE; linhagem eritrocítica: Ter119-FITC; progenitores mieloides: Gr1-PE, Mac1-APC (todos BD Pharmingen). Todos os anticorpos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e foram diluídos a 1:250 em PBS. Após duas lavagens as células foram ressuspendidas em 300µL de PBS e lidas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). As análises das populações hematopoiéticas foram realizadas através dos programas BD FACSDiva e/ou FlowJo.

A contagem dos parâmetros hematopoiéticos foi realizada através de hemograma e utilizada em conjunto com a tese de doutorado da aluna Lauremília Costa [4].

2.5 Ensaio de formação de colônias mieloides murinas em metilcelulose

2x10⁴ células de medula óssea foram centrifugadas a 1500 RPM por 5 minutos, ressuspendidas em meio IMDM com 2% de SFB (soro fetal bovino) e adicionadas ao meio metilcelulose suplementado com citocinas (M3434, StemCell Technologies). As colônias geradas pelo cultivo em metilcelulose suplementada com citocinas foram contadas após 10 dias em microscópio invertido. Para análise da autorrenovação, após 10 dias de cultura as células foram lavadas 3 vezes em PBS, contadas e novamente adicionadas ao meio metilcelulose suplementado com citocinas na confluência de 2x10⁴ células/mL de meio. Após 12 dias de

cultivo, as colônias foram contadas, no que chamamos de formação de colônias secundária.

2.6 Avaliação da resposta ao stress hematopoiético

Camundongos selvagens e *Arhgap21*^{+/-} foram desafiados com 150mg/Kg do quimioterápico 5-Fluoracil (5-FU) injetado via intra-peritonial. O 5-FU provoca a morte de células que estejam ciclando, causando queda brusca em praticamente todas as populações hematopoiéticas, além de mobilização de progenitores e CTHs [77]. A reconstituição da hematopoiese foi avaliada após 7, 14, 21 e 28 dias pelo número de neutrófilos no hemograma dos animais. Após 28 dias do tratamento, os animais foram sacrificados e as CTHs da medula óssea foram quantificadas por citometria de fluxo.

2.7 Mobilização das células progenitoras mielóides e das células-tronco hematopoiéticas.

Induzimos a mobilização das células progenitoras mielóides e das CTHs através da injeção sub-cutânea do antagonista do receptor de CXCL12, CXCR4, AMD3100 (Sigma-Aldrich) na concentração de 5mg/Kg em animais selvagens e *Arhgap21^{+/-}*. Após 1 hora do tratamento, sacrificamos os camundongos e quantificamos, por citometria de fluxo, as células progenitoras mielóides (Gr1⁺/Mac⁺) e as CTHs (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) no sangue periférico, medula óssea e baço.

2.8 Ensaio de formação de colônia no baço (CFU-S)

A formação de colônias no baço foi utilizada para avaliar a reconstituição inicial das células tronco e progenitoras hematopoiéticas após o transplante de medula óssea. Dessa maneira, 5x10⁵ células totais da medula de camundongos selvagens ou *Arhgap21^{+/-}* foram transplantadas via veia caudal de receptores selvagens sub-letalmente irradiados (9,5 Gy no irradiador do Ipen/USP). Após 12 dias os camundongos foram sacrificados e seus baços foram retirados e fixados para contagem das colônias.

2.9 Transplante seriado de medula óssea murina

Essa metodologia foi utilizada para duas finalidades:

 Avaliar as células tronco e progenitoras hematopoiéticas com redução da Arhgap21 na reconstituição de curto e longo prazo;

2) Avaliar a função do nicho com redução da *Arhgap21* no surporte a reconstituição da hematopoiese de curto e longo prazo.

Para o primeiro objetivo foram utilizados como doadores camundongos selvagens ou *Arhgap21^{+/-}*. Esses animais possuem o sistema hematopoiético positivo para a marcação de anticorpo anti-CD45.2. Como receptores utilizamos camundongos B6.SJL-*Ptprc^a Pep3^b*/BoyJ (Jackson`s Lab, USA), chamados de PepBoy. Esses animais possuem o sistema hematopoiético positivo para a marcação de anticorpo anti-CD45.1.

Em relação ao segundo objetivo, utilizamos como doadores camundongos C57BL/6 GFP HET (Cemib, Unicamp) que possuem o sistema hematopoiético GFP⁺. Como receptores utilizamos camundongos selvagens ou *Arhgap21^{+/-}*.

Em ambos os casos, 1x10⁶ células totais de medula óssea foram injetadas na veia caudal de receptores sub-letalmente irradiados (9,5Gy). Foram realizadas coletas de sangue mensais para avaliação do quimerismo (CD45.2⁺ para estudo da hematopoiese/GFP⁺ para estudo do nicho) por citometria de fluxo até 4 meses após o transplante primário. Em seguida, os camundongos foram sacrificados e sua medula óssea foi transplantada em novos receptores sub-letalmente irradiados que seguiram o mesmo protocolo de avaliação da reconstituição por mais 4 meses, caracterizando o transplante secundário.

No final dos transplantes primário e secundário realizamos a imunofenotipagem das populações hematopoiéticas na medula óssea.

A capacidade de autorrenovação das CTHs é diretamente relacionada à capacidade de reconstituição, principalmente nos transplantes secundários, e é mensurada pela frequência das CTHs na medula óssea dos receptores após 16 semanas do transplante secundário.

2.10. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS)

Essa técnica foi utilizada para quantificar a produção de ROS em animais selvagens e heterozigotos sem tratamento e após 24 horas da irradiação sub-letal de 9,5Gy. Desse modo, 1×10^6 células da medula óssea de camundongos foram marcadas com 0,5 µL da probe conjugada a FITC do kit CellROX (Invitrogem) e incubadas por 30 minutos à 37 graus Celsius no escuro. Após uma lavagem as células foram ressuspendidas em 300µL de PBS e lidas em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences). Realizamos o controle positivo da reação com a adição de água oxigenada (H₂O₂). As análises da média geométrica da intensidade de fluorescência foram realizadas através do programa FlowJo.

2.11 Análise Estatística

Os dados foram analisados como média \pm desvio padrão pelo teste t de *Student* e os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $P \le 0,05$.
RESULTADOS

PARTE I

Estudo da via Hedgehog

na mielodisplasia

1. Ligantes da via Hedgehog em biópsias de medula óssea de pacientes com mielodisplasia.

Para o estudo dos ligantes DHH, SHH e IHH foram realizadas imunohistoquímica de biópsias de medula óssea de pacientes com SMD comparadas a pacientes com anemia megaloblástica (AM), tendo em vista que, assim como a SMD, a AM apresenta hematopoiese ineficaz, entretanto, suas causas são diferentes [78].

De acordo com a Figura 8, observamos aumento da expressão dos ligantes SHH e DHH em biópsias de medula óssea de pacientes SMD quando comparados a AM. Para DHH: [média(min-max do número de células marcadas)] [AM=102(84-183), SMD=189(69-317)]; P=0,01. Já o ligante SHH apresentou aumento de expressão de 2 vezes na medula de SMD: [AM= 47(18-74), SMD= 98,38(53-129)]; P=0,0005. Entretanto, IHH foi o único ligante não significativamente modulado: [AM=47(18-75,2), SMD=67,66(1,2-153,8)].

Em todos os cortes, pudemos observar a preferência de marcação para células com morfologia de progenitores eritróides, como eritroblastos. De acordo com o esperado, observamos maior número de células marcadas para c-Kit em medula de pacientes SMD em comparação a AM como demonstrado na Figura 8 [AM=53,5(39-76); SMD=106(57-136,8)]; P=0,0008. Testes de correlação, demonstraram grande correlação entre a marcação de c-Kit com os ligantes DHH e SHH(P=0,003 e P=0,001, respectivamente). (Figura 9).

77



Figura 8. Ligantes Hedgehog têm expressão aumentada em medula de pacientes com mielodisplasia. Imunohistoquímica de IHH, DHH, SHH e c-kit em biópsias de medula de mielodisplasia em comparação com medula de anemia megaloblástica (usado como controle). Os gráficos da terceira coluna representam a média do número de células positivas para cada marcação em quatro campos de cada amostra.



Figura 9. Ligantes da via Hedgehog que são mais expressos em medula óssea de SMD possuem correlação positiva com marcador de célula tronco hematopoiética. Correlação de Sperman do número de células positivas para (A) IHH, (B) DHH e (C) SHH em relação a células positivas para c-kit.

2. Expressão dos integrantes da via Hedgehog em células totais de medula óssea e em células CD34⁺ de pacientes com mielodisplasia.

Em células de medula total, não observamos diferença na expressão do receptor *PTCH1* em SMD comparada a doadores normais (Figura 10A). Entretanto, quando categorizamos as amostras de SMD em baixo e alto risco de acordo com a WHO 2008, observamos aumento na expressão do receptor apenas nos pacientes de SMD classificados como AR, ARSA e RCDM: [CTR=1,96(0,2-7,3); SMD <5% de blastos na medula óssea=4(0,3-24); SMD alto risco=2,6(0,11-30,9)]; CTR *vs* SMD ≥5% de blastos na medula óssea *P=0,03*; Figura 10B.

A expressão dos transcritos do mediador SUFU e do efetor GLI1 foi diminuída na medula óssea de pacientes com SMD (Figuras 10C e E, respectivamente), no caso de SUFU essa redução em relação ao controle permanece nos pacientes tanto com <5% e≥5% de blastos na medula óssea (Figura 10D; P=0.03). Já GLI1 manteve-se reduzido apenas nas amostras de SMD classificados como AR, ARSA e RCDM (Figura 10F; P=0,03). Curiosamente, observamos aumento na expressão de SUFU, GL11 e de dois alvos da via Hedgehog, Nanog e BMI1, em células CD34⁺ de sangue periférico de pacientes com SMD, como ilustrado na Figura 11. SUFU: [1,0(0,7-1,9); SMD <5% de blastos na medula óssea=2,8(1,8-4,8); SMD ≥5% de blastos na medula óssea=1,5(1,1-3,4)]; CTR vs SMD <5% de blastos na medula óssea P=0,0008; GLI1: [CTR=1,0(0,6-2,9); SMD baixo risco=2,9(0,7-14,5); SMD ≥5% de blastos na medula óssea=1,3(0,7-2,6)], CTR vs <5% de blastos na medula ósseaP=0,03; BMI1: [CTR=0,6(0,4-1,0), SMD <5% de blastos na medula óssea =0,8(0,6-4,3) e SMD \geq 5% de blastos na medula óssea=0,8(0,3-1,9)]; CTR *vs* <5% de blastos na medula óssea P=0,02. Nanog: CTR=0,9(0,2-7,3), <5% de blastos na medula óssea=5,0(0,7-6,9) e ≥5% de blastos na medula óssea=7,4(3,0-18,5); CTR vs <5% de blastos na medula óssea*P=0,03* e CTR *vs* ≥5% de blastos na medula óssea*P=0,001*.

Em comparação com o grupo controle, houve aumento de 7 vezes na expressão do transdutor de sinal *SMO* em células totais de medula óssea de SMD (P=0,008), além disso, quando estratificados, observamos aumento de 14 vezes nos pacientes com SMD AREB-1 e 2 (P=0,003), demonstrados nas Figuras 10G e H, respectivamente.

Segundo análises de regressão de Cox, pacientes com SMD que apresentaram as seguintes características: alto risco de progressão segundo a WHO e a IPSS e aumento na expressão de *SMO*, apresentaram pior prognóstico em análise univariada tanto para sobrevida livre de evento como para sobrevida global. Surpreendentemente, análises multivariadas apontaram que o aumento na expressão de *SMO* e diminuição de *PTCH1* são fatores independentes que prejudicam a sobrevida global nos pacientes com SMD. Consistentemente, os índices de classificação mais utilizados no prognóstico da SMD como alto risco pela WHO e pela IPSS permaneceram como fatores de risco independentes na sobrevida livre de evento e na globlal, respectivamente. (Tabela 3)

É interessante ressaltar que foi observada alta correlação entre todos os genes da via Hedgehog estudados em células totais de medula óssea de pacientes com SMD, confirmando que a via está ativada nesses pacientes, como demonstra a tabela 4.



Figura 10. Via Hedgehog está desregulada em medula óssea de pacientes com mielodisplasia quando comparados a doadores normais. Expressão relativa dos transcritos dos membros da via Hedgehog (A) *PTCH1*, (C) *SUFU*, (E) *GL11* e (G) *SMO* em células de medula óssea total de doadores normais em comparação com pacientes SMD. Realizamos a classificação dos pacientes SMD de acordo com a WHO2008 para melhor descrever o subgrupo da doença com alteração na expressão gênica de (B) *PTCH1*, (D) *SUFU*, (F) *GL11* e (H) *SMO*. Utilizamos como normalizador uma amostra de doador saudável e como endógeno a expressão de *HPRT*.



Figura 11. Aumento da expressão dos reguladores e alvos da via Hedgehog em células CD34⁺ de sangue periférico de pacientes com mielodisplasia quando comparados a doadores normais. Expressão relativa dos transcritos do regulador (A) *SUFU* e dos alvos da via Hedgehog (C) *GL11*, (E) *BMI1* e (G) *Nanog* em células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais em comparação com pacientes SMD. Realizamos a classificação dos pacientes SMD de acordo com a WHO 2008 para melhor descrever o subgrupo da doença com alteração na expressão gênica de (B) *SUFU*, (D) *GL11*, (F) *BMI1* e (H) *Nanog*. Utilizamos como normalizador uma amostra de doador saudável e como endógeno a expressão de *HPRT*.

	Análise Univariada				Análise Multivariada				
Parâmetros analisados	Sobrevida livre de eventos		Sobrevida global		Sobrevida livre de eventos		Sobrevida global		
	Razão de riscos* (95% IC)	Ρ	Razão de riscos* (95% IC)	Р	Razão de riscos* (95% IC)	Ρ	Razão de riscos* (95% IC)	Ρ	
Sexo									
Feminino vs Masculino	1,16(0,5-2,8)	0,7	1,2 (0,5-3,02)	0,7	-	-	-	-	
Classificação pela WHO									
AREB1 e AREB2 <i>vs</i> AR, ARSA e RCDM	6,4 (2,5-16,5)	0,0001	6,5 (2,4-17,6)	0,0002	5,8 (1,9-17,3)	0,001	-	-	
Grupo de risco pela IPSS									
Int2 + Alto vs Int1 + Baixo	9,74 (2,9-32,7)	0,0002	8,9 (2,7-29,9)	0,0004	-	-	10,5 (2,5-43,6)	0,001	
Valores Numéricos									
Idade na data da coleta**	1,02 (0,99-1,06)	0,2	1,01 (0,9-1,05)	0,4	-	-	-	-	
Expressão de SMO***	1,01 (1,002 -1,02)	0,02	1,008 (1,001- 1,02)	0,04	-	-	1,03 (1,01-1,06)	0,0003	
Expressão de PTCH****	1,01 (0,9-1,08)	0,6	0,9 (0,9-1,06)	0,9	-	-	0,7 (0,6-0,9)	0,003	

Tabela 4. Análises uni e multivariada da sobrevida global e livre de eventos dos pacientes com mielodisplasia.

Abreviações: WHO: World Health Organization; IPSS: International Prognostic Scoring System; Int: intermediário.

*Razão de riscos >1 indica que a primeira característica apresentou o pior prognóstico. **Idade avançada prediz menor sobrevida. ***Aumento na expressão de *SMO* prediz pior prognóstico. ****Diminuição na expressão de *PTCH* prediz pior prognóstico.

Tabela 5. Correlação de *Sperman* entre a expressão gênica dos membros da via Hedgehog.

	PTCH1		SUFU		GLI1		SMO	
	r	Р	r	Р	r	Р	r	Р
PTCH1	-	-	0,4	0,02	0,7	<,0001	0,5	0,0006
SUFU	-	-	-	-	0,4	0,008	0,5	0,0006
GLI1	-	-	-	-	-	-	0,5	0,0001

PARTE II: Papel da

Arhgap21 na

hematopoiese e na

autorrenovação de

células tronco

hematopoiéticas

2.1. Hematopoiese no camundongo Arhgap21*/-

Iniciamos o estudo do papel da *Arhgap21* na hematopoiese com a imunofenotipagem das diferentes populações hematopoiéticas por citometria de fluxo dos camundongos *Arhgap21^{+/-}* em comparação com camundongos selvagens.

Caracterizamos as células da linhagem linfoide no timo, sangue periférico e medula óssea e constatamos diminuição de 24% das células CD8⁺ (P=0,04) e aumento de 60% das células CD4⁺CD8⁺ (P=0,02) no sangue periférico dos animais *Arhgap21^{+/-}*. Não observamos diferença na frequência dos linfócitos T no timo e nem dos linfócitos B na medula e no sangue (Figura 12).



Figura 12. Caracterização da população linfoide do camundongo *Arhgap21^{+/-}*. Células do timo e do sangue periférico de camundongos selvagens e *Arhgap21^{+/-}* foram marcadas com anticorpo CD4-PE e CD8-APC para que as populações de linfócitos T (A, E) auxiliar, (B,F) citotóxico e imaturo (C, G) fossem caracterizadas. Para os linfócitos B, células da (D) medula óssea e do (H) sangue periférico foram marcadas com anticorpo B220-FITC.

Em relação à linhagem eritroide, observamos na medula óssea dos heterozigotos uma redução de cerca de 40% nas células comprometidas com a linhagem eritroide (Terr119⁺) e nas colônias eritroides (BFU-E) nos ensaios de formação de colônia em meticelulose ($P \le 0,05$). Essas alterações na medula óssea refletiram no sangue periférico, onde houve queda de 26% na frequência das células eritroides (Terr119⁺). Dados do hemograma demonstram que mesmo dentro da normalidade, podemos observar uma pequena, porém significativa, redução nos níveis de hemoglogina e número de hemácias, além de aumento no volume corpuscular médio ($P \le 0,005$), demonstrados na Figura 13.



Figura 13. Camundongo *Arhgap21^{+/-}* **apresenta diminuição na diferenciação eritróide.** Células de medula óssea de camundongos selvagens e *Arhgap21^{+/-}* foram marcadas com anticorpo (A) Terr119-FITC e analisadas por citometria de fluxo ou submetidas à cultura de formação de colônia em metilcelulose. Após 10 dias, as (B) colônias eritroides (BFU-E) foram contadas. Sangue periférico dos animais também foi submetido à citometria de fluxo para (C) linhagem eritroide Terr119⁺. Parâmetros hematológicos como (D) quantidade de hemácias, (E) níves de hemoglobina e (F) volume corpuscular médio (VCM) foram avaliados através de hemograma.

Através de contagem dos megacariócitos em cortes de fêmures corados com hematoxilina e eosina (Figura 13 A e B), observamos aumento dessas células na medula óssea dos camundongos *Arhgap21*^{+/-} em relação aos animais selvagens

(Figura 14 C), juntamente com a leve redução no número (Figura 14D) e aumento do volume corpuscular das plaquetas (Figura 14 E; $P \le 0,02$).



Figura 14. Alteração na diferenciação megacariocítica dos animais *Arhgap21*^{+/-}. Cortes de medula óssea de camundongos (A) selvagem e (B) *Arhgap21*^{+/-} foram corados com hematoxilina e eosina para a contagem de megacarióctios de quatro campos de cada fêmur. A média do número de megacariócitos dos animais analisados é demonstrada no gráfico (C). Contagem de (D) plaquetas e (E) volume plaquetário médio foram obtidos do hemograma.

A frequência das CTHs tanto de curta (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) como de longa duração (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺CD150⁺CD48⁻) foi aumentada na medula óssea dos heterozigotos ($P \le 0,04$); entretanto, não observamos diferença na frequência das CTHs no sangue periférico dos animais analisados (Figura 15).

Para acompanhar a resposta das CTHs ao estresse hematopoiético, desafiamos os camundongos com a injeção intra-peritonial de 150mg/Kg de 5-Fluoracil (5-FU), quimioterápico que induz a morte de células em proliferação, causando queda das populações e estimulando a rápida reconstituição pelas células tronco/progenitoras hematopoiéticas. Para avaliar essa reconstituição acompanhamos o número de neutrófilos 7, 14, 21 e 28 dias após o tratamento. Confirmando nossa hipótese, observamos aumento de cerca de 43% na reconstituição de neutrófilos nos animais $Arhgap21^{+/-}$ após 14 e 21 dias do tratamento (P=0,02; Figura 15D). Além disso, de acordo com o esperado, constatamos que o stress hematopoiético induziu a proliferação das CTHs tanto em camundongos selvagens (de 0,1% para 1,6%) como nos heterozigotos (de 0,3% a 2,6%), porém manteve-se a maior frequência dessas células na medula óssea dos animais $Arhgap21^{+/-}$ (Figura 15E).



Figura 15. Redução da Arhgap21 afeta frequência das células-tronco hematopoiéticas (CTH) na medula óssea e a reconstituição após indução de estresse hematopoiético de camundongos heterozigotos. Análises de citometria de fluxo da frequência de (A) células-tronco hematopoiéticas de curta duração (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) e de (B) longa duração (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺CD150⁺CD48⁻) na medula óssea. Também realizamos em (C) a quantificação das células-tronco hematopoiéticas de curta duração (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) no sangue periférico. Após a indução de stress hematopoiético pela injeção intra-peritonial de 150mg/Kg de 5-Fluoracil, acompanhamos a (D) reconstituição do número de neutrófilos por hemograma e (E) a porcentagem de CTH (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) na medula óssea dos animais 28 dias após o tratamento

Análises de citometria de fluxo de células mieloides (Gr1⁺Mac1⁺; Figura 16A),

assim como formação de colônias de granulócito/monócitos (CFU-GM; Figura

16B) indicaram diminuição dessa população na medula óssea dos heterozigotos ($P \le 0,04$). Entretanto, observamos aumento de 2 vezes na frequência de células mieloides (Gr1⁺Mac1⁺) juntamente com o aumento no número de leucócitos no sangue periférico desses camundongos (Figuras 16 C e D, respectivamente), o que sugere maior mobilização mieloide nos animais heterozigotos.



Figura 16. Alteração da população mieloide de camundongos *Arhgap21*^{+/-}. Diminuição na população de células mieloides na medula óssea de animais heterozigotos em análises de citometria de fluxo de (A) células Gr1⁺Mac⁺ e (B) na formação de colônias granulocítica/monocítica (CFU-GM) em ensaio de metilcelulose. Aumento na frequência das (C) células mieloides Gr1⁺Mac⁺ no sangue periférico também por citometria de fluxo e do número de leucócitos avaliado por hemograma

Para confirmar a hipótese de maior mobilização, realizamos a indução da mobilização mieloide e de CTHs através da injeção subcutânea do antagonista de CXCR4, AMD3100 na dose de 5mg/kg. Após 1 hora do tratamento os animais foram sacrificados e quantificamos as células mieloides (Gr1⁺/Mac⁺) e as CTHs

(Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) no sangue, baço e medula óssea. Confirmando os dados anteriores, observamos leve redução na medula óssea (Figura 17C) seguida pelo aumento de cerca de 2 vezes tanto no baço (Figura 17D) como no sangue periférico (Figura 17E) das células mieloides.

As CTHs também sofreram maior mobilização, mas apenas para o sangue



periférico onde também duplicou sua frequência (Figura 17H).

Figura 17. Aumento da mobilização mieloide e de células-tronco hematopoiéticas (CTHs) após estímulo com 5-Fluoracil ou AMD3100 em camundongos *Arhgap21^{+/-}*..A indução da mobilização de células mieloides e tronco hematopoiéticas foi feita pela injeção subcutânea de 5mg/Kg do antagonista de CXCR4, AMD3100. Após 1 hora do tratamento, quantificamos, por citometria de fluxo, as células mieloide (Gr1⁺/Mac⁺) na (C) medula óssea, (D) baço e (E) sangue periférico. Quantificamos também as CTHs (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) na (F) medula óssea, (G) baço e (H) sangue periférico. Os dados são provenientes de 2 experimentos independentes.

2.2 Papel da Arhgap21 na reconstituição da hematopoiese

A capacidade de formação de colônias pelas células da medula óssea foi avaliada tanto *in vitro*, pelo ensaio em metilcelulose suplementada com citocinas para diferenciação mieloide, como *in vivo* através de ensaio de CFU-S (do inglês, unidade formadora de colônia no baço). De acordo com o descrito anteriormente, os camundongos *Arhgap21*^{+/-} apresentaram redução na formação das colônias CFU-GM e BFU-E, além de 28% de redução no número de colônias totais (Figura 18A). Quando repassamos as células depois da primeira formação de colônia em nova metilcelulose suplementada para a formação de colônias secundária, houve uma diminuição ainda maior (48%), no número de colônias dos animais heterozigotos, indicando menor proliferação *in vitro* (Figura 18B). Observamos o mesmo resultado na formação de colônias no baço, 12 dias após o transplante de células de medula óssea de animais selvagens e heterozigotos em camundongos selvagens sub-letalmente irradiados (*P=0,002*; Figura 18D).



Figura 18. Redução na formação de colônias *in vitro* **e** *in vivo* **de camundongos** *Arhgap21*^{+/-} (A) Ensaio de formação de colônias em metilcelulose suplementada com citocinas para diferenciação mieloide. (B) Após 10 dias, as células foram lavadas e transferidas para nova metilcelulose para formação de colônias secundária. (C) Exemplo de colônias formadas no baço de camundongos após 12 dias do transplante de 1x10⁵ células totais de medula óssea de camundongos selvagens e *Arhgap21*^{+/-} em receptores selvagens sub-letalmente irradiados. (D) Contagem das colônias em dois experimentos independentes.

A redução na formação de colônias no baço, 12 dias após transplante de medula óssea, sugere que a Arhgap21 interfira na migração e na reconstituição inicial da hematopoiese. Para avaliar os efeitos de longa duração, como a autorrenovação das CTHs, realizamos transplantes seriados de células totais de medula óssea de doadores selvagens ou heterozigotos em receptores B6.SJL-Ptprc^a Pepc^b/BoyJ (PepBoy). A análise do quimerismo é possível uma vez que camundongos PepBoy possuem o sistema hematopoiético positivo para a marcação de CD45.1 e os animais selvagens e heterozigotos positivos para CD45.2 como demonstra a Figura 19.

Dessa maneira, 1x10⁶ células de medula óssea total provenientes de camundongos selvagens ou heterozigotos foram transplantadas via veia caudal em camundongos PepBoy sub-letalmente irradiados. A reconstituição da hematopoiese foi avaliada mensalmente através da expressão de CD45.2 (células provenientes do doador) no sangue periférico dos receptores.

De acordo com a Figura 20A, observamos ligeira diminuição na reconstituição inicial da medula óssea de animais que receberam células dos *Arhgap21^{+/-}*, visto que nesses animais, observamos redução na frequência de células CD45.2 no sangue periférico 4 semanas após o transplante primário (*P=0,03*). Entretanto, após 8, 12 e 16 semanas não observamos diferença no quimerismo.

Dezesseis semanas após o transplante os receptores foram sacrificados e analisamos por citometria de fluxo a reconstituição das diferentes populações hematopoiéticas provenientes do doador na medula óssea e no sangue periférico dos receptores. Surpreendentemente, animais transplantados com células da

100

medula óssea de camundongos *Arhgap21^{+/-}* resgataram algumas das características do fenótipo já apresentado desses animais como a redução das células eritroides (Terr119⁺) no sangue periférico (Figura 19E) e dos progenitores mieloides (Gr1⁺Mac⁺) na medula óssea (Figura 20F); entretanto, não observamos diferença na frequência das CTHs de acordo com a Figura 20H.

Ainda com as células da medula óssea dos animais reconstituídos, realizamos transplantes em novos receptores PepBoy sub-letalmente irradiados, caracterizando o transplante secundário. Assim como no transplante primário, observamos leve redução na reconstituição inicial (4 semanas) da medula óssea de animais transplantados com células provenientes dos animais reconstituídos com medula óssea dos heterozigotos, como demonstra a Figura 21A.



Figura 19. Diferenças na marcação do sistema hematopoiético de animais utilizados no transplante de medula óssea. Aquisição de citometria de fluxo da medula óssea marcada com anticorpos CD45.1-APC e CD45.2-PE em camundongos utilizados no transplante de medula óssea: (A) receptores PepBoy e (B) doadores Selvagem ou *Arhgap21*^{+/-}.



Figura 20. Redução na reconstituição inicial da medula óssea de animais transplantados com células de camundongos *Arhgap21^{+/-}*. Análises por citometria de fluxo do sangue periférico de

receptores do transplante primário de medula óssea de células de camundongos selvagens e *Arhgap21^{+/-}* após 4, 8, 12 e 16 semanas. O (A) quimerismo foi avaliado pela frequência de células positivas para CD45.2 (células dos doadores) no sangue periférico dos receptores. A reconstituição das populações hematopoiéticas foi avaliada após 16 semanas do transplante, também por citometria de fluxo, analisando dentro da população proveniente do doador (CD45.2⁺) as células linfoides (B220⁺) (B) na medula óssea e (C) no sangue; as células eritróides (Terr119⁺) (D) na medula óssea e (E) no sangue; as células mieloides (Gr1⁺Mac⁺) na (F) medula óssea e no (G) sangue e CTHs (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) (H) na medula óssea. Os resultados são provenientes de 3 experimentos independentes.

Diferente do observado no transplante primário,foi constatada redução na frequência das CTHs (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) nos animais que receberam medula óssea dos heterozigotos 16 semanas após o transplante secundário, caracterizando redução da autorrenovação das CTHs dos animais *Arhgap21^{+/-}* (Figura 21B).



Figura 21. Redução na reconstituição inicial da medula óssea e da autorrenovação das células-tronco hematopoiéticas de animais transplantados com células de camundongos *Arhgap21^{+/-}*. Análises por citometria de fluxo do sangue periférico de receptores do transplante secundário de medula óssea de células de camundongos selvagens e *Arhgap21^{+/-}* após 4, 8, 12 e 16 semanas. O (A) quimerismo foi avaliado pela frequência de células positivas para CD45.2 (células dos doadores) no sangue periférico dos receptores. A autorrenovação das células-tronco hematopoiéticas foi avaliada pela sua frequência após 16 semanas do transplante secundário, também por citometria de fluxo, analisando dentro da população proveniente do doador as CTHs (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) (B) na medula óssea. Os resultados são provenientes de 3 experimentos independentes.

2.3 Estudo do papel da Arhgap21 no nicho da medula óssea na

reconstituição após transplante

Para avaliar a função da Arhgap21 em relação ao suporte do nicho para a reconstituição da hematopoiese de curta e longa duração, realizamos transplantes seriados utilizando como doadores camundongos C57Black6-GFP⁺ e como receptores camundongos selvagens ou *Arhgap21^{+/-}* sub-letalmente irradiados.

Após 4, 8 12 e 16 semanas realizamos coleta de sangue periférico para acompanhar a reconstituição da hematopoiese através da expressão de GFP nas células do sangue. Sacrificamos os receptores após 8 e 16 semanas e quantificamos as CTHs provenientes do doador (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺ que eram GFP⁺). Além disso, após 16 semanas a medula reconstituída foi usada para transplantar novos receptores selvagens ou *Arhgap21^{+/-}* também sub-letalmente irradiados (transplante secundário). As coletas seguiram as mesmas datas já descritas no transplante primário.

De acordo com a Figura 22A, houve leve redução de células GFP⁺ no sangue periférico nos receptores *Arhgap21^{+/-}* após 12 semanas do transplante primário, sem alterar nenhum ponto do secundário.

Após 8 semanas do transplante primário (reconstituição de curto prazo) observamos redução das CTHs na medula óssea dos receptores heterozigotos (Figura 22B; *P=0,01*), o que explicaria a leve queda no quimerismo desses animais 12 semanas após o transplante. Entretanto, a frequência das CTHs não foi alterada após 16 semanas dos transplantes primário e secundário (Figura 22C, 23B, respectivamente), indicando que a redução da Arhgap21 no nicho não afeta a autorrenovação das CTHs transplantadas.

105



Figura 22. Leve redução na reconstituição do sangue periférico após 12 semanas e das células-tronco hematopoiéticas (CTH) após 8 semanas do transplante primário utilizandose como receptor camundongos *Arhgap21^{+/-}*. (A) Quantificação da frequência de células GFP⁺ no sangue periférico de camundongos após 4, 8, 12 e 16 semanas do transplante primário. Após (B) 8 e (C) 16 semanas do transplante primário os receptores foram sacrificados e as CTH (Lin⁻ Sca⁺c-kit⁺) dentro da população de células reconstituídas (GFP⁺) foram quantificadas. Os dados são provenientes de 2 experimentos independentes.



Figura 23. Redução da Arhgap21 no nicho não afeta a reconstituição no transplante secundário. (A) Quantificação da frequência de células GFP⁺ no sangue periférico de camundongos após 4, 8, 12 e 16 semanas do transplante secundário. Após (B) 16 semanas do transplante secundário os receptores foram sacrificados e as CTH (Lin⁻Sca⁺c-kit⁺) dentro da população de células reconstituídas (GFP⁺) foram quantificadas. Os dados são provenientes de 2 experimentos independentes.

Partindo-se da observação que o nicho com redução da Arhgap21 afeta apenas as fases iniciais do suporte à hematopoiese, estudamos a resposta da medula óssea desses animais à irradiação sub-letal que são submetidos para o transplante de medula óssea. Assim, animais selvagens e heterozigotos foram submetidos a irradiação de 9,5Gy; após 24 horas foram sacrificados e analisamos por citometria de fluxo a produção de ROS pelas células totais da medula óssea. De acordo com a Figura 24A, os níveis de produção basal de ROS dos animais selvagens e heterozigotos são semelhantes; entretanto, após a irradiação as células da medula óssea dos camundongos *Arhgap21^{+/-}* apresentam maior produção de ROS quando comparados aos selvagens (Figura 24B).



Figura 24. Medula óssea dos camundongos *Arhgap21^{+/-}* **produzem mais espécie reativa de oxigênio (ROS) em resposta a irradiação sub-letal.** Análises por citometria de fluxo da média geométrica da produção de ROS em células totais de medula óssea de animais (A) controle ou (B) após 24 horas da irradiação com 9,5Gy.
DISCUSSÃO

1. Via Hedgehog na mielodisplasia

Algumas evidências mostram que a via de sinalização Hedgehog é importante para a proliferação e autorrenovação das células-tronco leucêmicas. Por outro lado, a maioria dos estudos foi desenvolvida em leucemia mielóide crônica[33], onde a deleção de *Smo* reduziu a incidência de leucemia através da redução no número de células-tronco leucêmicas, diminuindo assim, as chances de surgimento da doença nos receptores secundários de transplante de medula óssea [22].

Dados de Hedge *et al* sugerem que as células tronco leucêmicas de modelo murino de eritroleucemia necessitam da via Hedegehog para autorrenovar tanto *in vitro* como *in vivo* [79].

Recentemente, o conceito de célula-tronco leucêmica começou a ser utilizado para a mielodisplasia, sendo que essa nova visão poderá trazer novas abordagens de tratamento para essa doença [39]. Em trabalho de Kobune et al, foi demonstrado que blastos CD34⁺ de pacientes com LMA ou SMD expressam IHH, PTCH1, GLI1 e GLI2[34]. Nosso trabalho agrega mais informações a esse respeito, pois apresenta estudo comparativo de células de pacientes SMD com doadores normais, ou com pacientes com anemia megaloblástica.

O estudo dos ligantes da via Hedgehog demonstrou aumento da expressão de DHH e SHH nas amostras de SMD comparadas com anemia megaloblástica (Figura 7). Pudemos ainda notar certa preferência de marcação em eritroblastos e mieloblastos, justamente as células que estão aumentadas tanto na medula óssea de mielodisplasia como da anemia megaloblástica, o que nos permite inferir que o aumento de células marcadas para os ligantes Hedgehog são relacionado a fisipatologia da SMD e não apenas devido a expansão desses tipos celulares. Poucos estudos demonstraram alterações na via Hedgehog em medula óssea de malignidades hematológicas. Altos níveis de SHH foram detectados em biópsias de medula óssea de pacientes com mieloma múltiplo[80]; outro estudo demonstrou que 100% das amostras de leucemia mieloide aguda e 45% das amostras de leucemia promielocítica eram positivas para SHH [81]. Pela primeira vez, descreve-se o aumento de proteínas ligantes Hedgehog na medula óssea de SMD.

No que se diz respeito à expressão gênica, o receptor *PTCH1* tem níveis de expressão relativa semelhantes em células totais de medula óssea de doadores saudáveis e pacientes com SMD (Figura 9A). Entretanto, quando classificados de acordo com a WHO 2008, podemos observar aumento da expressão desse receptor em amostras do grupo de AR, RCMD e ARSA (Figura 9B).

Tanto o mediador *SUFU*, quanto o efetor *GL11* apresentaram expressão diminuída nas amostras de SMD em relação ao controle. Por outro lado, as células CD34⁺ do sangue periférico de pacientes SMD (AR, RCMD e ARSA) apresentaram aumento da expressão tanto de *SUFU* quanto de *GL11*. Observamos também nas células CD34⁺ de pacientes SMD aumento da expressão de dois possíveis alvos da via Hedgehog: *BMI1*[82, 83] e *Nanog*[84], todos demonstrados na Figura 10. De fato, Nilsson *et al* já haviam descrito o aumento de *BMI-1* em células CD34⁺CD38⁻ de pacientes com SMD e deleção do 5q[85]. Juntos, esses resultados corroboram estudo de rastreamento de expressão gênica de células progenitoras de pacientes com SMD que sugerem a

ativação da via Hedgehog nas progenitoras tanto de medula quanto de sangue periférico nesta doença [86].

Em relação ao transdutor de sinais SMO, observamos aumento de 7 vezes na expressão de seus transcritos em medula óssea de SMD, e de 14,8 vezes nos pacientes AREB-1 e 2 (Figura 7G e H). Consistente com nossos dados, um perfil semelhante de expressão foi identificado em pacientes com câncer gástrico, onde a via Hedgehog foi associada com a progressão tumoral [87].

Comparando a expressão dos membros da via Hedgehog entre si, como mostra a Tabela 5, encontramos significante correlação entre a expressão dos transcritos. *PTCH1* se correlacionou com todos os membros investigados ($P \le 0,02$; r $\ge 0,40$) e *SMO* correlaciou-se positivamente com *GL11* (P=0,0001, r=0,58). Esses resultados sugerem que a via Hedgehog está ativada e desregulada em medula óssea de SMD.

Análises de regressão de Cox indicaram que tanto o diagnóstico de alto risco pela WHO quanto pela IPSS, assim como a alta expressão de *SMO* (variável contínua) predizem pior prognóstico por análise univariada tanto para sobrevida livre de evento como para sobrevida global. Já as análises multivariadas mostraram que a alta expressão de *SMO* e a baixa expressão de *PTCH1* são fatores desfavoráveis e independentes na sobrevida global de pacientes com SMD (Tabela 4). Esses resultados estão de acordo com conceitos de tumorigênese, no qual *PTCH* é visto como gene supressor tumoral e *SMO* como oncogene[88].

Consistentemente, fatores prognósticos usuais, como a classificação pela WHO 2008 e IPSS, permaneceram como preditores da sobrevida livre de evento e global, respectivamente. Nossos dados ainda corroboram outros estudos que identificam o aumento da expressão de SMO como sendo significativamente associado com pior prognóstico em análises multivariadas de hepatoblastoma[89], mesotelioma pleural malígno [90] e ainda como fator independente na sobrevida livre de metástase pós-operatória de câncer de cólon [91].

Recentemente, foi descrito que a ativação da via Hedgehog induz LMA fatal em um modelo murino de SMD, resultando em menor sobrevida com expansão de células mielóides imaturas[92]. Dessa maneira, sugerimos que as alterações na expressão de *PTCH* e *SMO* podem estar envolvidas na progressão da SMD. Entretanto, os seus envolvimentos nesse processo merecem melhor elucidação.

De fato, a via de sinalização Hedgehog tem se mostrado marcador de prognóstico, tanto que inibidores de SMO estão, atualmente, em triagem clínica para diversos tipos de câncer [93], incluindo malignidades mieloides e, especificamente SMD, e encontram-se em estudo de fase I/II/III (clinicaltrials.gov).

Deste modo, descrevemos que a via Hedgehog está desregulada em medula óssea de pacientes com SMD, e o possível envolvimento da expressão de *PTCH1* e de *SMO* na progressão da doença, o que sugere que a via Hedgehog seja um bom alvo para novas abordagens terapêuticas nas desordens dos progenitores hematopoiéticos, assim como nas SMD.

2. Arhgap21 na hematopoiese, autorrenovação das células-tronco hematopoiéticas e no suporte do nicho.

As proteínas da família das RhoGTPases desempenham importante papel na regulação do citoesqueleto já que participam da dinâmica de microtúbulos e da polimerização de filamentos de actina. Dessa maneira, estão envolvidas na migração, *homing* e mobilização das CTHs, além da reconstituição da hematopoiese após transplante de medula óssea [47, 94]. As RhoGTPases são inativadas pelas RhoGAPS e apenas duas (p190 e Cdc42GAP) das mais de 70 RhoGAPs possuem função conhecida na hematopoise [62, 63].

Nosso grupo descreveu em 2002 a proteína ARHGAP21[65] e trabalha nos últimos anos para a geração de um camundongo noucaute para melhor compreender o papel dessa RhoGAP na hematopoise. Até o momento, não obtivemos camundongos *Arhgap21*^{-/-}, o que confirma que estes sejam inviáveis. Dessa maneira, o modelo experimental utilizado foram camundongos heterozigotos que possuem redução em cerca de 50% na expressão gênica e proteica da Arhgap21. É importante ressaltar que esses animais apresentaram aumento tanto da proteína como da atividade de Cdc42 [4], confirmando a redução da atividade da Arhgap21 nesses heterozigotos.

Análises do hemograma, citometria de fluxo e de formação de colônia em metilcelulose de camundongos *Arhgap21^{+/-}* demonstraram que esses animais possuem redução na frequência de células da linhagem eritroide (Ter119⁺) tanto na medula óssea quanto no sangue, além de redução na formação de colônias BFU-E nas células da medula. Tais alterações foram confirmadas pelo hemograma que apresentou, mesmo que dentro na normalidade esperada para

C57BL6, redução leve, porém significativa, no número de hemácias e na quantidade de hemoglobina, juntamente com aumento no volume corpuscular médio das hemácias, indicando problemas na diferenciação eritroide dos camundongos *Arhgap21^{+/-}* (Figura 13). Os resultados com o modelo animal corroboram dados observados em células humanas, no qual se observou aumento na expressão gênica de *ARHGAP21* durante a diferenciação eritroide de células CD34⁺ [65], indicando possível papel desta RhoGAP na linhagem eritroide.

Além disso, pudemos observar maior número de megacariócitos na medula óssea dos heterozigotos juntamente com leve redução no número e aumento no volume corpuscular das plaquetas, indicando problemas na diferenciação megacariocítica (Figura 14). Sabe-se que no microambiente da medula óssea a presença de colágeno tipo I, um dos componentes da matriz extracelular, regula os estágios iniciais da diferenciação megacariocítica através da ativação da via de sinalização Rho-ROCK- Cadeia leve da miosina IIA [95]. Adicionamente, RhoA e RhoC tem importante função na formação da fibra de estresse, na poliploidização dos megacariócitos durante sua diferenciação e na sinalização via integrinas das plaquetas[96, 97]. Por fim, em estudo de micro-arranjos de DNA de células submetidas à diferenciação megacariocítica utilizando-se a linhagem CHFR em comparação com células CD34⁺ humanas, foi constatado aumento na expressão da ARHGAP21 nos dois tipos celulares durante a diferenciação megacariocítica [98]. Juntos, esses dados indicam que a Arhgap21 seja importante para a diferenciação megacariocítica.

Resultados muito semelhantes aos nossos, como o aumento da atividade de Cdc42, anemia e plaquetopenia, foram observados no camundongo noucaute para *Cdc42GAP* [62]. Assim, inferimos que as alterações observadas possam estar relacionadas ao aumento de atividade de Cdc42.

Nosso grupo descreveu que a ARHGAP21 interage com tubulina e assim participa da dinâmica de microtúbulos[99]. Sabe-se que esse processo é de extrema importância para a diferenciação celular, o que explicaria a redução observada tanto na diferenciação eritróide como megacariocítica. Entretanto, novos estudos são necessários para se desvendar em qual fase da diferenciação ocorrem essas disfunções.

Em relação à população mieloide, observamos diminuição das células mielóides (Gr1⁺Mac1⁺) na medula óssea dos animais *Arhgap21^{+/-}*, juntamente com diminuição nas colônias de granulócitos/monócitos (CFU-GM) também na medula desses animais. Surpreendentemente, o sangue periférico dos heterozigotos apresentou aumento da frequência de células mieloides juntamente com aumento no número de leucócitosde células Gr1⁺Mac1⁺, sugerindo mobilização de progenitores mieloides (Figura 16).

Para confirmar a hipótese de maior mobilização mieloide, realizamos a indução mobilização através do tratamento com o antagonista de CXCR4, AMD3100. Essa droga age através do bloqueio do receptor CXCR4 para a quimiocina CXCL12 e é utilizada na clínica para mobilizar células tronco e progenitoras hematopoiéticas como fonte de transplante de medula óssea [100]. Sendo assim, 5mg/mL de AMD3100 foi injetado nos animais e após 1 hora, avaliamos a frequência das células mielóides e das CTHs na medula, baço e sangue periférico.

Foi possível observar o aumento na frequência das células mielóides tanto nos animais selvagens como *Arhgap21*^{+/-} em relação aos animais sem tratamento, indicando que a mobilização ocorreu em ambos os grupos. Entretanto, a mobilização mielóide tanto para o sangue periférico como para o baço duplicou nos animais *Arhgap21*^{+/-} em relação aos selvagens (Figuras 17C-E). Juntos, esses dados indicam que mesmo fortes indutores de mobilização não são capazes de igualar a capacidade de mobilização dos animais selvagens aos heterozigotos.

Já em relação às CTHs, observamos aumento de 3 vezes na mobilização dessas células para o sangue periférico apenas nos heterozigotos. Células progenitoras provenientes da medula óssea dos animais *Arhgap21^{+/-}* apresentam redução na adesão a fibronectina, que é um importante componente da matriz extracelular do estroma da medula[4]. Esse mesmo fenômeno também foi observado em camundongos Rac2^{-/-}, que apresentam redução na adesão à fibronectina mediada por integrinas e os autores do estudo relacionam esse fenômeno à redução na retenção das células do animal na medula óssea e aumento da mobilização [57]. Adicionalmente, o nicho dos animais Arhaap21+/apresentaram redução no suporte ao homing de células progenitoras selvagens [4, 101]. Portanto, a Arhgap21 regula tanto a adesão do nicho como das células hematopoiéticas, o que explica a maior mobilização das células progenitoras mielóides e das CTHs nos heterozigotos. Por esse motivo, estudamos a seguir, as alterações na reconstituição das células hematopoiéticas e no suporte do nicho com redução da Arhgap21.

Na medula óssea dos animais heterozigotos também detectamos aumento na frequência das CTHs de curta (Lin⁻Sca⁺c-Kit⁺) e de longa duração (Lin⁻Sca⁺c-

Kit⁺CD150⁺CD48⁻). Para avaliar a resposta rápida das CTHs ao estresse hematopoiético, desafiamos os animais através da injeção de 5-Fluoracil e acompanhamos a reconstituição da hematopoise pelo número de neutrófilos no sangue. Houve significativo aumento no número de neutrófilos no sangue dos heterozigotos em comparação com selvagens após 14 e 21 dias. Entretanto, após 28 dias, período no qual o sistema hematopoético já foi restabelecido, observamos que os números de neutrófilos eram semelhantes entre o camundongo heterozigoto e o selvagem, confirmando reconstituição nos camundongos *Arhgap21^{+/-}*. Além disso, após 28 dias do tratamento confirmamos que a medula óssea dos heterozigotos possui maior frequência de CTHs. Por serem quiescentes, as CTHs não são afetadas pelo tratamento com 5-Fluoracil, pelo contrário, são estimuladas para reestabelecer os níveis das células afetas. Por esse motivo, inferimos que o aumento das CTHs nos heterozigotos seja o responsável pela maior reconstituição hematopoiética em curto período.

Para melhor compreender a função da Arhgap21 nas CTHs, realizamos estudos *in vitro* e *in vivo* como a formação de colônia seriada *in vitro*, formação de colônia no baço (CFU-S) e transplantes seriados de medula óssea.

Ensaios de formação de colônia em metilcelulose demonstraram diminuição na formação de colônias totais. Além disso, quando repassamos essas células para nova metilcelulose suplementada para a formação de colônias secundária, houve uma diminuição ainda maior no número de colônias dos animais heterozigotos, indicando menor proliferação *in vitro* (Figuras 18A e B). O mesmo resultado foi observado na formação de colônias no baço, 12 dias após o transplante de células de medula óssea, indicando falha na migração ou na

reconstituição inicial das células tronco e progenitoras *Arhgap21^{+/-}* (Figura 18D). Esses dados corroboram com achados desses mesmos animais, visto que suas células progenitoras apresentaram redução na adesão, migração e *homing [4]*.

Com objetivo de avaliar a reconstituição da hematopoiese em longo prazo, realizamos transplantes seriados de medula óssea de animais selvagens e heterozigotos em receptores CD45.1 sub-letalmente irradiados. Pudemos constatar tanto no transplante primário como no secundário, que os animais que receberam células da medula óssea dos *Arhgap21^{+/-}* apresentaram uma leve redução do quimerismo 4 semanas pós transplante; indicando alterações na chegada e no estabelecimento inicial das células tronco e progenitoras hematopoiéticas.

A frequência das CTHs na medula óssea dos receptores após 16 semanas do transplante primário dos selvagens e heterozigotos foram semelhantes; entretanto, observamos redução das CTHs nos camundongos receptores de células *Arhgap21*^{+/-} 16 semanas após o transplante secundário. Levando-se em consideração que os heterozigotos possuem maior quantidade de CTHs, no transplante primário os receptores dessa medula receberam maior número de CTHs em relação ao controle, porém após 16 semanas a frequência das CTHs dos heterozigotos igualou-se ao dos selvagens, trazendo indícios da redução da autorrenovação. No transplante secundário, onde os receptores receberam praticamente a mesma quantidade de CTHs, observamos a redução na frequência dessas células nos heterozigotos. Para confirmar esses dados, realizamos o transplante competitivo, onde o receptor recebe tanto células de medula óssea de animais selvagens como heterozigotos em proporções iguais. Dessa maneira,

exclui-se varáveis que poderiam influenciar na reconstituição. Dois experimentos independentes encontram-se em andamento, entretanto, podemos observar menor porcentagem de células provenientes dos heterozigotos no sangue periférico dos receptores. Juntos, esses dados confirmam que a Arhgap21 participa da autorrenovação das CTHs e dessa maneira, seria interessante o estudo dessa proteína na regulação das divisões simétrica e assimétrica.

A importância das RhoGAPs na autorrenovação das CTHs foi avaliada nos camundongos nocautes para p190GAP e Cdc42GAP. O aumento da atividade de RhoA nos camundongos nocautes para p190RhoGAP resultou no aumento na autorrenovação das CTHs juntamente com maior reconstituição da hematopoiese após o transplante de medula óssea[63]. Por outro lado, o modelo nocaute condicional de RhoA exibiu bloqueio na hematopoiese com acúmulo de progenitores multipotentes, mas sem afetar a reconstituição da medula óssea após o transplante [60].

Duas publicações significantes demonstraram o papel de Cdc42 na autorrenovação das CTHs. No primeiro, Cdc42 foi apontada como *downstream* da via não canônica de Wnt no nicho das CTH [102]. Outro grupo observou que as CTHs de idade avançada apresentam atividade aumentada de Cdc42, resultando na perda da polaridade celular, problemas na distribuição da tubulina e de Cdc42 e , consequentemente, redução na capacidade de repopulação e autorrenovaçao dessas células[103]. O mesmo artigo mostra que a inibição farmacológica de Cdc42 nessas células reestabelece a sua polaridade e funcionalmente "rejuvenesce" as CTHs.

Outro importante processo para a autorrenovação das CTHs é a divisão assimétrica, que é garantida pela localização celular de complexos protéicos como: PAR3-PAR6-aPKC (na região apical) ; Crumb e LgL/Dlg/Scribble (na região basal) [104]. Em invertebrados foi descrito que Cdc42 interage diretamente com PAR6, o que resulta na fosforilação e mudança da localização de Numb, uma das proteínas responsáveis pela determinação celular, visto que células-filhas que herdam Numb tornam-se diferenciadas[105]. Essa hipótese ainda não foi testada em CTHs de mamíferos, e deve ser elucidada.

Em relação ao papel da Arhgap21 no suporte do nicho na reconstituição da hematopoiese, realizamos transplantes seriados utilizando receptores selvagens e heterozigotos que receberam células de medula óssea normal com expressão de GFP. Os receptores *Arhgap21*^{+/-} apresentaram leve queda no quimerismo nas fases iniciais da reconstituição da hematopoiese com redução na frequência das CTHs após 8 semanas do transplante. Não observamos diferença em nenhum parâmetro do transplante secundário, indicando que a Arhgap21 não afeta o suporte do nicho para a autorrenovação das CTHs.

Após a irradiação de 9.5Gy a maioria das células da medula óssea é afetada, com exceção dos osteoblastos, que darão suporte para a chegada, fixação e a autorrenovação das células tronco hematopoiéticas[106]. Sabe-se que a inibição de p190-BGAP causa alterações na composição do nicho como redução na formação de colônias de fibroblastos, adipócitos e osteoblastos causando defeitos no suporte à hematopoiese [64]. Então a redução da Arhgap21 nos osteoblastos poderia causar alterações no suporte do nicho para a reconstituição da hematopoiese após transplante de medula óssea. Para melhor compreender a redução do suporte inicial da hematopoiese observada nos animais *Arhgap21*^{+/-} analisamos a resposta da medula óssea desses animais em relação aos selvagens após a irradiação sub-letal. Interessantemente, a medula óssea dos camundongos *Arhgap21*^{+/-} produz mais ROS após essa irradiação. O aumento na produção de ROS inibe a liberação de CXCL12 o que causa um ambiente menos propício para o *homing* e o estabelecimento das CTHs[107]; isso explicaria a redução do suporte ao *homing* [4] e a reconstituição inicial da hematopoiese observada nos heterozigotos. Entretanto, as alterações no nicho dos camundongos *Arhgap21*^{+/-} devem ser melhor elucidadas como a capacidade das células tronco mesenquimais em se diferenciarem nos diversos compenentes no nicho e a função das células postivas para nestina no suporte à hematopoiese dos heterozigotos

Em resumo, podemos concluir que a Arhgap21 exerce papel relevante em processos curciais para a manutenção da hematopoiese como a adesão, migração, *homing* (já descritos) juntamente com a mobilização e autorrenovação de células tronco hematopoéticas através de sua ação sobre Cdc42.

CONCLUSÃO

Via Hedgehog na mielodisplasia

Este é o primeiro estudo comparativo que demonstra a importância da via Hedgehog em mielodisplasia, já que identificamos:

- 1) Aumento da expressão dos ligantes Sonic e Dessert Hedgehog
- 2) Alteração na expressão dos membros da via Hedgehog
- 3) SMO como fator independente na sobrevida livre de eventos em pacientes com SMD
- 4) PTCH como fator independente na sobrevida global de pacientes com ٠ SMD

Arhgap21 na hematopoiese normal

- Célula hematopoiética do camundongo Arhgap21^{+/-}
 - Redução diferenciação eritroide •
 - Alteração na diferenciação megacariocítica
 - Maior mobilização mieloide
 - Aumento células-tronco hematopoiéticas de curta e longa duração
 - Menor capacidade de formação de colônias in vitro (CFU) e in vivo • (CFU-S)
 - Menor reconstituição inicial no transplante de medula óssea
 - Redução da autorrenovação das células-tronco hematopoiéticas
- Nicho do camundongo Arhgap21^{+/-} ٠
 - Menor capacidade de suportar apenas a reconstituição inicial no transplante de medula óssea
 - Maior produção de ROS em resposta ao estresse da irradiação

 Não afeta a autorrenovação da célula-tronco hematopoiética transplantada

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

- 1. Kfoury, Y., F. Mercier, and D.T. Scadden, *SnapShot: The hematopoietic stem cell niche*. Cell, 2014. **158**(1): p. 228-228 e1.
- 2. Knoblich, J.A., *Mechanisms of asymmetric stem cell division*. Cell, 2008. **132**(4): p. 583-97.
- 3. Congdon, K.L. and T. Reya, *Divide and conquer: how asymmetric division shapes cell fate in the hematopoietic system.* Curr Opin Immunol, 2008. **20**(3): p. 302-7.
- 4. Costa, L.R.G.R.d., *Estudo da Participação da Arhgap21 na migração e adesão de Células Progenitoras Hematopoéticas*, in *Fisiopatologia Médica*. 2014, Unicamp: Campinas. p. 113.
- 5. Morrison, S.J. and D.T. Scadden, *The bone marrow niche for haematopoietic stem cells*. Nature, 2014. **505**(7483): p. 327-34.
- 6. Schofield, R., *The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell*. Blood Cells, 1978. **4**(1-2): p. 7-25.
- 7. Weber, J.M. and L.M. Calvi, *Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche*. Bone, 2010. **46**(2): p. 281-5.
- 8. Sacchetti, B., et al., *Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment*. Cell, 2007. **131**(2): p. 324-36.
- 9. Ellis, S.L., et al., *The relationship between bone, hemopoietic stem cells, and vasculature.* Blood, 2011. **118**(6): p. 1516-24.
- 10. Katayama, Y., et al., Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. Cell, 2006. **124**(2): p. 407-21.
- 11. Mendez-Ferrer, S., et al., *Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations*. Nature, 2008. **452**(7186): p. 442-7.
- 12. Kollet, O., et al., *Physiologic corticosterone oscillations regulate murine hematopoietic stem/progenitor cell proliferation and CXCL12 expression by bone marrow stromal progenitors.* Leukemia, 2013. **27**(10): p. 2006-15.
- 13. Winkler, I.G., et al., Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. Blood, 2010. **116**(23): p. 4815-28.
- 14. Suarez-Alvarez, B., A. Lopez-Vazquez, and C. Lopez-Larrea, *Mobilization and homing of hematopoietic stem cells*. Adv Exp Med Biol, 2012. **741**: p. 152-70.
- 15. Winkler, I.G., et al., *Hematopoietic stem cell mobilizing agents G-CSF*, cyclophosphamide or AMD3100 have distinct mechanisms of action on bone marrow HSC niches and bone formation. Leukemia, 2012. **26**(7): p. 1594-601.
- 16. Nusslein-Volhard, C. and E. Wieschaus, *Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila*. Nature, 1980. **287**(5785): p. 795-801.
- 17. Echelard, Y., et al., Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. Cell, 1993. **75**(7): p. 1417-30.

- 18. Rohatgi, R., L. Milenkovic, and M.P. Scott, *Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium*. Science, 2007. **317**(5836): p. 372-6.
- 19. Ruiz i Altaba, A., Catching a Gli-mpse of Hedgehog. Cell, 1997. 90(2): p. 193-6.
- 20. Monnier, V., et al., Suppressor of fused links fused and Cubitus interruptus on the hedgehog signalling pathway. Curr Biol, 1998. **8**(10): p. 583-6.
- 21. Cheng, S.Y. and J.M. Bishop, Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(8): p. 5442-7.
- 22. Zhao, C., et al., *Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia.* Nature, 2009. **458**(7239): p. 776-9.
- 23. Bhardwaj, G., et al., Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 172-80.
- 24. Kobune, M., et al., Indian hedgehog gene transfer augments hematopoietic support of human stromal cells including NOD/SCID-beta2m-/- repopulating cells. Blood, 2004. **104**(4): p. 1002-9.
- 25. Dierks, C., et al., *Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies*. Nat Med, 2007. **13**(8): p. 944-51.
- 26. Detmer, K., et al., *Hedgehog signaling and cell cycle control in differentiating erythroid progenitors.* Blood Cells Mol Dis, 2005. **34**(1): p. 60-70.
- 27. Irvine, D.A. and M. Copland, *Targeting hedgehog in hematologic malignancy*. Blood, 2012. **119**(10): p. 2196-204.
- 28. Stewart, J.D., et al., *POLG mutations cause decreased mitochondrial DNA repopulation rates following induced depletion in human fibroblasts.* Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(3): p. 321-5.
- 29. Zahreddine, H.A., et al., *The sonic hedgehog factor GLI1 imparts drug resistance through inducible glucuronidation*. Nature, 2014. **511**(7507): p. 90-3.
- 30. Peacock, C.D., et al., *Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(10): p. 4048-53.
- 31. Lin, T.L., et al., *Self-renewal of acute lymphocytic leukemia cells is limited by the Hedgehog pathway inhibitors cyclopamine and IPI-926.* PLoS One, 2010. **5**(12): p. e15262.
- 32. Kobune, M., et al., *Drug resistance is dramatically restored by hedgehog inhibitors in CD34+ leukemic cells.* Cancer Sci, 2009. **100**(5): p. 948-55.
- 33. Dierks, C., et al., *Expansion of Bcr-Abl-positive leukemic stem cells is dependent on Hedgehog pathway activation.* Cancer Cell, 2008. **14**(3): p. 238-49.
- 34. Kobune, M., et al., *Stromal cells expressing hedgehog-interacting protein regulate the proliferation of myeloid neoplasms*. Blood Cancer J, 2012. **2**: p. e87.
- 35. McGovern, M., et al., *A "latent niche" mechanism for tumor initiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(28): p. 11617-22.

- 36. Tsiftsoglou, A.S., I.D. Bonovolias, and S.A. Tsiftsoglou, *Multilevel targeting of hematopoietic stem cell self-renewal, differentiation and apoptosis for leukemia therapy.* Pharmacol Ther, 2009. **122**(3): p. 264-80.
- 37. Krivtsov, A.V., et al., *Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9*. Nature, 2006. **442**(7104): p. 818-22.
- 38. 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.
- 39. Jaiswal, S. and B.L. Ebert, *MDS is a stem cell disorder after all*. Cancer Cell, 2014. **25**(6): p. 713-4.
- 40. Barlow, J.L., et al., A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. Nat Med, 2010. **16**(1): p. 59-66.
- 41. Choi, C.W., et al., Impaired differentiation and apoptosis of hematopoietic precursors in a mouse model of myelodysplastic syndrome. Haematologica, 2008. **93**(9): p. 1394-7.
- 42. Elias, H.K., et al., *Stem cell origin of myelodysplastic syndromes*. Oncogene, 2014. **33**(44): p. 5139-50.
- 43. Bulycheva, E., et al., *Myelodysplasia is in the niche: novel concepts and emerging therapies*. Leukemia, 2015. **29**(2): p. 259-268.
- 44. Ades, L., R. Itzykson, and P. Fenaux, *Myelodysplastic syndromes*. Lancet, 2014. **383**(9936): p. 2239-52.
- 45. Raza, A., et al., *Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes.* Blood, 1995. **86**(1): p. 268-76.
- 46. Raza, A. and N. Galili, *The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes.* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(12): p. 849-59.
- 47. Wennerberg, K. and C.J. Der, *Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it)*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 8): p. 1301-12.
- 48. Jaffe, A.B. and A. Hall, *Rho GTPases: biochemistry and biology*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 247-69.
- 49. Nayak, R.C., et al., *Rho GTPases control specific cytoskeleton-dependent functions of hematopoietic stem cells.* Immunol Rev, 2013. **256**(1): p. 255-68.
- 50. Schaefer, A., N.R. Reinhard, and P.L. Hordijk, *Toward understanding RhoGTPase specificity: structure, function and local activation.* Small GTPases, 2014. **5**(2): p. 1-11.
- 51. Stasia, M.J., et al., *ADP-ribosylation of a small size GTP-binding protein in bovine neutrophils by the C3 exoenzyme of Clostridium botulinum and effect on the cell motility.* Biochem Biophys Res Commun, 1991. **180**(2): p. 615-22.
- 52. Jones, G.E., W.E. Allen, and A.J. Ridley, *The Rho GTPases in macrophage motility and chemotaxis*. Cell Adhes Commun, 1998. **6**(2-3): p. 237-45.

- 53. Yang, F.C., et al., *Rac and Cdc42 GTPases control hematopoietic stem cell shape, adhesion, migration, and mobilization.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(10): p. 5614-8.
- 54. Sanchez-Aguilera, A., et al., *Guanine nucleotide exchange factor Vav1 regulates perivascular homing and bone marrow retention of hematopoietic stem and progenitor cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(23): p. 9607-12.
- 55. Yang, L., et al., *Rho GTPase Cdc42 coordinates hematopoietic stem cell quiescence* and niche interaction in the bone marrow. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(12): p. 5091-6.
- 56. Geiger, H. and Y. Zheng, *Regulation of hematopoietic stem cell aging by the small RhoGTPase Cdc42*. Exp Cell Res, 2014. **329**(2): p. 214-219.
- 57. Gu, Y., et al., *Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases.* Science, 2003. **302**(5644): p. 445-9.
- 58. Jansen, M., et al., *Rac2-deficient hematopoietic stem cells show defective interaction with the hematopoietic microenvironment and long-term engraftment failure.* Stem Cells, 2005. **23**(3): p. 335-46.
- 59. Ghiaur, G., et al., *Inhibition of RhoA GTPase activity enhances hematopoietic stem and progenitor cell proliferation and engraftment*. Blood, 2006. **108**(6): p. 2087-94.
- 60. Zhou, X., et al., *RhoA GTPase controls cytokinesis and programmed necrosis of hematopoietic progenitors*. J Exp Med, 2013. **210**(11): p. 2371-85.
- 61. Hall, A., *Rho GTPases and the control of cell behaviour*. Biochem Soc Trans, 2005. **33**(Pt 5): p. 891-5.
- 62. Wang, L., et al., Genetic deletion of Cdc42GAP reveals a role of Cdc42 in erythropoiesis and hematopoietic stem/progenitor cell survival, adhesion, and engraftment. Blood, 2006. **107**(1): p. 98-105.
- 63. Xu, H., et al., Loss of the Rho GTPase activating protein p190-B enhances hematopoietic stem cell engraftment potential. Blood, 2009. **114**(17): p. 3557-66.
- 64. Raman, R., et al., *p190-B RhoGAP regulates the functional composition of the mesenchymal microenvironment*. Leukemia, 2013. **27**(11): p. 2209-19.
- 65. Basseres, D.S., et al., *ARHGAP10, a novel human gene coding for a potentially cytoskeletal Rho-GTPase activating protein.* Biochem Biophys Res Commun, 2002. **294**(3): p. 579-85.
- 66. Dubois, T., et al., *Golgi-localized GAP for Cdc42 functions downstream of ARF1 to control Arp2/3 complex and F-actin dynamics*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(4): p. 353-64.
- 67. Carles, A., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma transcriptome analysis by comprehensive validated differential display.* Oncogene, 2006. **25**(12): p. 1821-31.
- 68. Bigarella, C.L., et al., *ARHGAP21 modulates FAK activity and impairs glioblastoma cell migration*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(5): p. 806-16.

- 69. Sousa, S., et al., *ARHGAP10 is necessary for alpha-catenin recruitment at adherens junctions and for Listeria invasion.* Nat Cell Biol, 2005. **7**(10): p. 954-60.
- 70. Hehnly, H., et al., *Retrograde Shiga toxin trafficking is regulated by ARHGAP21 and Cdc42*. Mol Biol Cell, 2009. **20**(20): p. 4303-12.
- 71. Schultz, M.L., et al., *CLN3 deficient cells display defects in the ARF1-Cdc42 pathway and actin-dependent events.* PLoS One, 2014. **9**(5): p. e96647.
- 72. Anthony, D.F., et al., *beta-Arrestin 1 inhibits the GTPase-activating protein function of ARHGAP21, promoting activation of RhoA following angiotensin II type 1A receptor stimulation.* Mol Cell Biol, 2011. **31**(5): p. 1066-75.
- 73. Lazarini, M., et al., *ARHGAP21 is a RhoGAP for RhoA and RhoC with a role in proliferation and migration of prostate adenocarcinoma cells.* Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(2): p. 365-74.
- 74. Borges, L., et al., ARHGAP21 associates with FAK and PKCzeta and is redistributed after cardiac pressure overload. Biochem Biophys Res Commun, 2008. **374**(4): p. 641-6.
- 75. Bigarella, C.L., et al., *Post-translational modification of the RhoGTPase activating protein 21, ARHGAP21, by SUMO2/3.* FEBS Lett, 2012. **586**(19): p. 3522-8.
- 76. Barcellos, K.S., et al., *ARHGAP21 protein, a new partner of alpha-tubulin involved in cell-cell adhesion formation and essential for epithelial-mesenchymal transition.* Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(4): p. 2179-89.
- 77. Itkin, T., et al., *Fibroblast growth factor signaling promotes physiological bone remodeling and stem cell self-renewal.* Curr Opin Hematol, 2013. **20**(3): p. 237-44.
- 78. Platzbecker, U., et al., Update on developments in the diagnosis and prognostic evaluation of patients with myelodysplastic syndromes (MDS): consensus statements and report from an expert workshop. Leuk Res, 2012. **36**(3): p. 264-70.
- 79. Hegde, S., P. Hankey, and R.F. Paulson, *Self-renewal of leukemia stem cells in Friend virus-induced erythroleukemia requires proviral insertional activation of Spi1 and hedgehog signaling but not mutation of p53.* Stem Cells, 2012. **30**(2): p. 121-30.
- 80. Liu, Z., et al., A critical role of autocrine sonic hedgehog signaling in human CD138+ myeloma cell survival and drug resistance. Blood, 2014. **124**(13): p. 2061-71.
- 81. Bai, L.Y., et al., *Differential expression of Sonic hedgehog and Gli1 in hematological malignancies*. Leukemia, 2008. **22**(1): p. 226-8.
- 82. Katoh, Y. and M. Katoh, *Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation*. Curr Mol Med, 2009. **9**(7): p. 873-86.
- 83. Liu, S., et al., *Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells.* Cancer Res, 2006. **66**(12): p. 6063-71.

- 84. Zbinden, M., et al., *NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53*. EMBO J, 2010. **29**(15): p. 2659-74.
- 85. Nilsson, L., et al., *The molecular signature of MDS stem cells supports a stem-cell origin of 5q myelodysplastic syndromes.* Blood, 2007. **110**(8): p. 3005-14.
- 86. Li, L., et al., Altered hematopoietic cell gene expression precedes development of therapy-related myelodysplasia/acute myeloid leukemia and identifies patients at risk. Cancer Cell, 2011. **20**(5): p. 591-605.
- 87. Saze, Z., et al., Activation of the sonic hedgehog pathway and its prognostic impact in patients with gastric cancer. Dig Surg, 2012. **29**(2): p. 115-23.
- 88. Wicking, C., I. Smyth, and A. Bale, *The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development*. Oncogene, 1999. **18**(55): p. 7844-51.
- 89. Li, Y.C., et al., *Prognostic value of hedgehog signal component expressions in hepatoblastoma patients*. Eur J Med Res, 2010. **15**(11): p. 468-74.
- 90. Zhang, Y., et al., *SMO expression level correlates with overall survival in patients with malignant pleural mesothelioma*. J Exp Clin Cancer Res, 2013. **32**: p. 7.
- 91. Ding, Y.L., et al., Expression of smoothened protein in colon cancer and its prognostic value for postoperative liver metastasis. Asian Pac J Cancer Prev, 2012. 13(8): p. 4001-5.
- 92. Gondek, L.P., et al., *Aberrant Hedgehog pathway activity marks clinical MDS progression and accelerates leukemic transformation in vivo*, in 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014, ASH: San Francisco.
- 93. Amakye, D., Z. Jagani, and M. Dorsch, *Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1410-22.
- 94. Mulloy, J.C., et al., *Rho GTPases in hematopoiesis and hemopathies*. Blood, 2010. **115**(5): p. 936-47.
- 95. Machlus, K.R. and J.E. Italiano, Jr., *The incredible journey: From megakaryocyte development to platelet formation.* J Cell Biol, 2013. **201**(6): p. 785-96.
- 96. Sabri, S., et al., *Differential regulation of actin stress fiber assembly and proplatelet formation by alpha2beta1 integrin and GPVI in human megakaryocytes.* Blood, 2004. **104**(10): p. 3117-25.
- 97. Smith, E.C., et al., Induction of megakaryocyte differentiation drives nuclear accumulation and transcriptional function of MKL1 via actin polymerization and RhoA activation. Blood, 2013. **121**(7): p. 1094-101.
- 98. Fuhrken, P.G., et al., *Comparative, genome-scale transcriptional analysis of CHRF-*288-11 and primary human megakaryocytic cell cultures provides novel insights into lineage-specific differentiation. Exp Hematol, 2007. **35**(3): p. 476-489.
- 99. Barcellos, K.S., et al., *ARHGAP21 protein, a new partner of alpha-tubulin involved in cell-cell adhesion formation and essential for epithelial-mesenchymal transition.* J Biol Chem, 2013. **288**(4): p. 2179-89.

- 100. Pusic, I. and J.F. DiPersio, *Update on clinical experience with AMD3100, an SDF-1/CXCL12-CXCR4 inhibitor, in mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells.* Curr Opin Hematol, 2010. **17**(4): p. 319-26.
- 101. Xavier, J.M., et al., Arhgap21 expression in bone marrow niche is crucial for hematopoietic progenitor homing and short term reconstitution after transplantation, in 56th ASH Annual Meeting and Exposition. 2014, American Society of Hematology: San Francisco.
- 102. Sugimura, R., et al., *Noncanonical Wnt signaling maintains hematopoietic stem cells in the niche*. Cell, 2012. **150**(2): p. 351-65.
- 103. Florian, M.C., et al., *Cdc42 activity regulates hematopoietic stem cell aging and rejuvenation*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(5): p. 520-30.
- 104. Knoblich, J.A., Asymmetric cell division: recent developments and their implications for tumour biology. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(12): p. 849-60.
- 105. Atwood, S.X., et al., Cdc42 acts downstream of Bazooka to regulate neuroblast polarity through Par-6 aPKC. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 18): p. 3200-6.
- 106. Dominici, M., et al., *Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation*. Blood, 2009. **114**(11): p. 2333-43.
- 107. Golan, K., O. Kollet, and T. Lapidot, *Dynamic Cross Talk between S1P and CXCL12 Regulates Hematopoietic Stem Cells Migration, Development and Bone Remodeling.* Pharmaceuticals (Basel), 2013. **6**(9): p. 1145-69.

ANEXOS





Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº <u>2146-1</u>, sobre "<u>Investigação de vias de auto-</u> renovação <u>de células tronco hematopoiéticas em síndromes</u> <u>mielodisplásicas e leucemia mielóide aguda</u>", sob a responsabilidade de <u>Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad / Juliana Martins Xavier da Silva</u>, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/Unicamp em <u>03 de maio de 2010</u>.

CERTIFICATE

We certify that the protocol n° 2146-1, entitled "Evaluation of hematopoietic stem cells self renewal networks in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 3, 2010.

Campinas, 13 de maio de 2010.

Profa. Dra Ana María A. Guaraldo Presidente

Fátima Alonso Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP Caixa Postal 6109 13083-970 Campinas, SP – Brasil Telefone: (19) 3521-6359 E-mail: comisib@unicamp.br http://www.ib.unicamp.br/ceea/ ~ 1 \sim



CEP, 24/05/05. (Grupo I)

PARECER PROJETO: Nº 124/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: **"INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NOVOS GENES ALVO E NOVAS TERAPÊUTICAS NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS E EM LINHAGENS LEUCÊMICAS"** PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Terezinha Olalla Saad INSTITUIÇÃO: Centro de Hematologia e Hemoterapia - UNICAMP APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/05/2005 **APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/06**

II - OBJETIVOS

O projeto visa a investigação funcional de novos genes alvo e novas terapêuticas nas mielodisplasias. Em vista de não haver modelos de células ou animais com mielodisplasias, para cumprimento de alguns objetivos serão utilizados linhagens leucêmicas. Analisar a regulação da expressão dos genes ARHGAP10, MASK em linhagens leucêmicas submetidas a diferentes agentes terapêuticos cultivadas em suspensão. Analisar a expressão diferencial dos genes ARHGAP10 e MASK em células de pacientes com SMDs cultivadas em suspensão e um ambiente de células estromais submetidas a diferentes terapias anti-tumorais. Huperxpressar MASK e ARHGAP10 em células hematopoéticas e verificar o perfil de expressão gênica por microarray. Induzir Ros e verificar a expressão de MASK, ARHFGAP10, formita, APAF e FLIP. Verificar a expressão das isofarmas de APAF e FLIP em células de medula óssea de pacientes com mielodisplasias e correlacionar com subgrupo e IPSS. Verificar a expressão de formita em células linfóides de pacientes com SMD e correlacionar com padrão de celularidade da medula óssea, grau de anemia, subgrupo de SMD e IPSS. Verificar a expressão de WT1 e PRAME e correlacionar com subgrupo de SMD e IPSS. Verificar o crescimento de colônias a partir de células precursoras de medula óssea de pacientes com SMD, em culturas de longa duração, submetidas a tratamento com diferentes drogas. Verificar a expressão de citocinas e moléculas de adesão em células aderente da cultura de longa duração. Verificar o perfil de expressão gênica de células CD34 + de pacientes co SMD, utilizando conjunto de genes conhecidos e transcritos humanos novos, imobilizados em lâminas de microarrays. Verificar a capacidade da célula dendritica de SMD, derivada de célula mononuclear, induzir imunogenicidade quando transformada com mRNA de WT1. Investigar mutações nos genes PTPN11, AML-1, FLT3 e GATA-1 e verificara se estas mutações se relacionam com subgrupo de SMD, IPSS, progressão para leucemia.

- 1 -

III - SUMÁRIO

Para esse estudo participarão, no mínimo, 34 pacientes, 23 mulheres, 11 homens, com idade entre 18 e 89 anos; sendo que pacientes novos admitidos no serviço serão convidados a participar. Serão incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica, acompanhados no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp por pelo menos 6 meses. o diagnóstico será feito com base em critérios clínicos e morfológicos, utilizados no serviço há pelo menos 15 anos, com exclusão de causas como carências vitamínicas, doenças inflamatórias, infecciosas, hepáticas, renais, endócrinas e outras neoplasias. Os pacientes e controles que aceitarem voluntariamente em participar do estudo serão submetidos a coleta de 5ml de medula óssea para extração de mRNA; citometriade fluxo para análise de PRAME, formina em leucócitos e células dendríticas; cultivo de células estromais (apenas em pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* de células em suspensão com agentes terapêuticos em ambiente de células estromais (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* de células estromais de 65 anos); extração de DNA para investigação das mutações.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

É um projeto bem elaborado, condizente com as normas do CEP e do CONEP. Apresenta bibliografia atualizada; o orçamento tem como fonte financiadora a FAPESP, no valor de R\$ 250.000,00. Após modificações o TCLE ficou adequado.

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, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluidos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

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

- 2 -

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 V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2005.

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FCM / UNICAMP
Carta ao editor submetida à revista Haematologica em 16/01/2015

Abnormal Hedgehog pathway in myelodysplastic syndrome and its impact on the outcome of patients

Juliana M. Xavier¹, Fernando Vieira Pericole¹, Paulo Latuf-Filho², Patricia Favaro^{1,3}, Adriana da Silva Santos Duarte¹, Karin Spät Albino Barcellos¹, Amanda Inácio Dias¹, Paula de Melo Campos¹, Fabiola Traina⁴, Jose Vassallo² and Sara Teresinha Olalla Saad^{1,*}

¹Hematology and Hemotherapy Center-University of Campinas/Hemocentro-UNICAMP, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas-SP, Brazil

²Laboratory of Investigative Pathology, Department of Anatomic Pathology, Hospital AC Camargo, São Paulo, Brazil Laboratory of Investigative and Molecular Pathology, Center for Investigation in Pediatrics (Ciped), São Paulo, Brazil

³Department of Biological Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema,

São Paulo, 09913-030, Brazil

*Correspondence: Sara Teresinha Olalla Saad, email: <u>sara@unicamp.br</u>

Running heads: Abnormal Hedgehog pathway in MDS outcomes

Word count: 1029 words. One figure and two tables.

Acknowledgments: The authors would like to thank Nicola Amanda Conran Zorzetto for English review and Cleide Silva and Juliana Passos for statistics support. This work received financial support from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). The Hematology and Hemotherapy Center – UNICAMP forms part of the National Institute of Blood, Brazil (INCT de Sangue–CNPq/MCT).

1