



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E**  
**APLICADA**

**ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO G-CSF E DO**  
**AMD3100 NA MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO E**  
**PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CULTURA PRIMÁRIA**

**NILBERTO DIAS DE ARAÚJO**

**MANAUS - AMAZONAS**  
**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E**  
**APLICADA**

**NILBERTO DIAS DE ARAÚJO**

**ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO G-CSF E DO**  
**AMD3100 NA MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO E**  
**PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CULTURA PRIMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Adriana Malheiro Alle Marie**

**Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Elisa Brosina de Leon**

**MANAUS - AMAZONAS**  
**2014**

**NILBERTO DIAS DE ARAÚJO**

**ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO G-CSF E DO  
AMD3100 NA MOBILIZAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO E  
PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CULTURA PRIMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas como parte do pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia na área de concentração “*Imunologia Básica e Aplicada*”.

**APROVADA EM: 30/09/2014**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Elisa Brosina de Leon, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas – UFAM**

---

**Dr<sup>a</sup>. Leny Nascimento da Motta Passos, Membro Externo  
Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas - FHMOAM**

---

**Dr<sup>a</sup>. Fernanda de Freitas Anibal, Membro Externo  
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



Ata da Defesa de Dissertação de  
Mestrado do aluno **Nilberto Dias  
de Araújo** realizada em 30 de  
setembro de 2014.

Aos trinta dias do mês de setembro do ano de dois mil e quatorze, às nove horas e trinta minutos, no Auditório das Pós-Graduações do ICB/FCA, o aluno deste Programa, **Nilberto Dias de Araújo**, orientado pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Malheiro, apresentou à banca examinadora a sua Dissertação de Mestrado intitulada “*Estudo dos mecanismos de ação do G-CSF e do AMD3100 na mobilização de células-tronco e produção de citocinas em cultura primária*”. A banca examinadora composta pelos seguintes membros: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisa Brosina de Leon (Presidente), Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda de Freitas Aníbal (Membro) e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leny Nascimento da Motta Passos (Membro), após a apresentação e arguição, decidiu: Pela aprovação (X) ou não aprovação ( ) de sua dissertação.

*Elisa Brosina de Leon*

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elisa Brosina de Leon  
Presidente

*Fernanda de Freitas Aníbal*

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Fernanda de Freitas Aníbal  
Membro

*Leny Nascimento da Motta Passos*

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Leny Nascimento da Motta Passos  
Membro



*Dedico este trabalho a minha avó **Maria Araújo Sobrinho**, motivo maior da minha felicidade. Tenho certeza que não teria conseguido caminhar sozinho, sem seu amor incondicional quando em vida, sem seu apoio espiritual, que me dá estímulo para seguir em frente.*

*Com todo carinho (in memoriam) a você.*

*Dedico*

## *Agradecimentos*

Aqui, tento expressar a imensa gratidão por tudo que realizei no período de construção desse trabalho.

*Deus*, pela força e capacidade que me dá todos os dias, porque fostes testemunha das dificuldades do percurso e aliado nas superações. Obrigado por me presentear com a riqueza do saber.

Aos meus *amigos* – injusto citar nomes e esquecer alguém, afinal, mais de uma pessoa tem feito minha vida valer a pena, não quero deixar você de fora – pela amizade e carinho sinceros, pela força, conselhos e apoio nos momentos em que precisei, pelos bons momentos compartilhados em nossas saídas e encontros. Foi muito bom conviver com vocês nesses últimos anos, e talvez sem vocês não fizesse sentido.

Ao meu *Pai João Eriberto*, pelo apoio e respeito que recebi para seguir em frente em busca dos meus sonhos. A todos os familiares distantes, obrigado pelo suporte e por compreenderem minha ausência nesses últimos tempos. Cada conquista minha é um triunfo de vocês.

Ao meu *irmão João Filho*, obrigado por torcer e confiar no meu potencial. Espero que esteja presente em muitas outras que ainda virão.

A minha *Orientadora, Dr<sup>a</sup>. Adriana Malheiro*, pelo exemplo de pessoa e profissional, pela paciência, empenho e dedicação em ensinar (muito além de termos científicos), pela confiança e credibilidade depositadas em mim para realizar esse trabalho, me proporcionando oportunidades que mudaram minha vida.

A minha *Co-Orientadora, Dr<sup>a</sup>. Elisa de Leon*, pelos ensinamentos durante todo o processo de construção da dissertação.

Aos *inconfundíveis amigos* conquistados ao longo dessa caminhada: *Allyson Guimarães, Walter Neves e Diana Mota*, por toda a grande ajuda fornecida nas várias etapas e processos, desde a chegada em Manaus até a defesa do mestrado. Meu  **muito obrigado**  pelo apoio recebido na concretização desse sonho.

A todos os *colegas do Mestrado: Edalton Sanguino, William Fuzita, Cláudio Renato, Lucianna Tezza, Cacilda Mallmann, Suellen Nunes, Katiane dos Santos e Luciana Brito*, pelas cansativas, porém prazerosas, madrugadas de estudos aplicados em Imunologia. Guardarei com muito carinho, inclusive nossos momentos de descontrações entre um lanche e uma citocina.

A todos os colegas do *DEP-HEMOAM: Andréa, Iaci, Josy, Nani, Rechfy, Péricles e Wilmara*, pelo carinho, acolhida e pelos infinitos gestos de companheirismo.

A *MSc. Nadja Garcia*, pela acolhida e paciência em repassar todos os protocolos experimentais do projeto.

Ao ***MSc. João Paulo***, pelos conselhos e pela imensurável ajuda na análise da citometria de fluxo.

A ***Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM)*** por ceder os espaços e equipamentos necessários para a execução do projeto.

A ***Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)***, pela Bolsa de Mestrado e auxílio financeiro.

Ao ***Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada (PPGIBA)***, seus ***Docentes e Técnicos*** pelos valorosos ensinamentos e pela oportunidade de qualificação profissional.

A ***Universidade Federal do Amazonas (UFAM)*** pela oportunidade de cursa o mestrado em Imunologia Básica e Aplicada.

*“Não faças do amanhã o sinônimo de nunca, nem o ontem te seja o mesmo que nunca mais. Teus passos ficaram. Olhes para trás... Mas vá em frente, pois há muitos que precisam que chegues para poderem seguir-te”.*

*Charles Chaplin*

## RESUMO

A medula óssea é o principal local descrito como reserva de subpopulações de células-tronco adultas, incluindo as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco mesenquimais (CTM). Diferentes fatores estimulam potencialmente a mobilização dessas células para o sangue periférico. O G-CSF e o AMD3100 têm demonstrado agir na interrupção do eixo de retenção CXCR4/SDF-1 $\alpha$  estimulando a mobilização de CTH e CTM para a corrente sanguínea. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do G-CSF e do AMD3100 na mobilização de CTH e CTM para o sangue periférico e no perfil de citocinas produzidas *in vitro* por essas células. Foram utilizados 5 grupos com 09 camundongos machos, BALB-c. As CTH e CTM mobilizadas foram identificadas por meio de marcadores celulares específicos por citometria de fluxo. As amostras de CTH e CTM, de sangue periférico (SP) e medula óssea (MO) foram cultivadas *in vitro* e as citocinas foram dosadas nos sobrenadantes destas culturas pela técnica de citometria de fluxo CBA (*Cytometric Bead Array System*). As análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 5.0*. Os resultados demonstraram uma mobilização estatisticamente significativa de CTH nos camundongos tratados com PBS e que receberam 01 dose de AMD3100, e no grupo dos animais que foram tratados com G-CSF diariamente, por 04 dias consecutivos. Em relação às CTM, foi observada uma mobilização estatisticamente significativa apenas no grupo dos animais tratados com G-CSF. As culturas de medula óssea que receberam ou não estímulo (G-CSF) *in vitro* apresentaram células aderentes, com morfologia fibroblastóides. Nas culturas de sangue periférico, observou-se que as células apresentaram essa mesma morfologia quando foram estimuladas com G-CSF. No perfil de citocinas, houve uma maior produção de IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-10 na fase inicial do cultivo das CT que foram estimuladas com G-CSF, tanto em culturas da MO quanto do SP. As citocinas IL-2 e IL-4 encontraram-se mais elevadas em alguns grupos nas fases tardias do cultivo. IL-17A apresentou concentrações distintas, mantendo sua produção estável nos diferentes grupos e dias de cultivo. Dessa maneira, pode-se sugerir que, o AMD3100 induz uma rápida mobilização de células CD34<sup>+</sup> para a circulação e o G-CSF participa direta ou indiretamente no processo de mobilização de subpopulações de CT da medula óssea para o sangue periférico, na diferenciação de CTM, e no processo de modulação e produção de citocinas.

**Palavras-chave:** Células-tronco, citocinas, medula óssea, mobilização, AMD3100.

## ABSTRACT

The bone marrow is the main site described as reserve subpopulations of adult stem cells, including hematopoietic stem cells (HSC) and mesenchymal stem cells (MSC). Different factors potentially stimulate mobilization of these stem cells into peripheral blood. The G-CSF and AMD3100 have been shown to act by disrupting CXCR4/SDF-1 $\alpha$  retention axis, stimulating mobilization of HSC and MSC to the bloodstream. The aim of this study was to evaluate the influence of G-CSF and AMD3100 in HSC and MSC mobilization to the peripheral blood and in the cytokine profile produced by these cells *in vitro*. For this experiment, we were used 5 groups with 09 male mice, BALB-c. HSC and MSC were identified through specific cell markers by flow cytometry. The HSC and MSC samples, from peripheral blood (PB) and bone marrow (BM) were cultured *in vitro* and cytokines were measured in supernatants of these cultures by flow Cytometry CBA (Cytometric Bead Array System). Statistical analyzes were performed with the GraphPad Prism 5.0. In results we observed the statistically significant difference in HSC mobilization in mice treated with PBS that received one dose of AMD3100 and the animals treated with G-CSF over 04 successive days. Regarding the MSC, was observed a statistically significant difference in mobilization only in the group of animals treated with G-CSF. In the bone marrow cultures with or without G-CSF stimulus we observed adherent cells with fibroblastoid morphology. In the cultures of peripheral blood was observed that the cells had this same morphology when they were stimulated with G-CSF. There was an increased production of IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 in early cultivation of the SC stimulated with G-CSF, in the cultures of bone marrow cells and peripheral blood. Increased IL-2 and IL-4 cytokines was found in some groups in the late stage of the cultivation. IL-17A had different concentrations, maintaining a stable production in different groups and days of cultivation. Thus, it can be suggested that AMD3100 induces a rapid mobilization of CD34<sup>+</sup> cells into the circulation and that G-CSF is directly or indirectly involved in the mobilization of stem cells from bone marrow to peripheral blood, as is known, but also in the differentiation of MSC, modulation process and production of several other cytokines.

**Key-words:** Stem cells, cytokines, bone marrow, mobilization, AMD3100.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01:</b>	Principais características das células-tronco.....	21
<b>Figura 02:</b>	Classificação das células-tronco.....	22
<b>Figura 03:</b>	Poder de diferenciação das células-tronco.....	23
<b>Figura 04:</b>	Fatores solúveis secretados pelas CTM modulam a resposta das células do sistema imunológico.....	27
<b>Figura 05:</b>	O eixo SDF-1 $\alpha$ /CXCR4, que desempenha um papel crítico no “ <i>homing</i> ” e mobilização de células-tronco da medula óssea.....	30
<b>Figura 06:</b>	CTH e CTM de medula óssea.....	46
<b>Figura 07:</b>	CTH e CTM de sangue periférico.....	46
<b>Figura 08:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias e 24 horas após a última aplicação foi administrado PBS.....	48
<b>Figura 09:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias e 24 horas após a última aplicação foi administrado G-CSF.....	49
<b>Figura 10:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias e 24 horas após a última aplicação foi administrado AMD3100.....	50
<b>Figura 11:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias e 24 horas após a última aplicação foi administrado PBS.....	51
<b>Figura 12:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias e 24 horas após a última aplicação foi administrado AMD3100.....	52
<b>Figura 13:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco de sangue periférico de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias e 24 horas após a última aplicação foi administrado PBS.....	53
<b>Figura 14:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco de sangue periférico de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias e 24 horas após a última aplicação foi administrado G-CSF.....	54
<b>Figura 15:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco de sangue periférico de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado AMD3100.....	55
<b>Figura 16:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco de sangue periférico de camundongos tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado PBS.....	56
<b>Figura 17:</b>	Cultura Primária (P0) de células-tronco derivadas de sangue periférico de camundongos tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado AMD3100.....	57

<b>Figura 18:</b>	Imunofenotipagem por citometria de fluxo (%) de CTM após a tripsinização no último dia de cultivo celular (15º dia).	58
<b>Figura 19:</b>	Concentração da Citocina IL-2 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de medula óssea .....	60
<b>Figura 20:</b>	Concentração da Citocina IL-4 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de medula óssea .....	61
<b>Figura 21:</b>	Concentração da Citocina IL-6 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de medula óssea .....	62
<b>Figura 22:</b>	Concentração da Citocina IL-10 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de medula óssea .....	63
<b>Figura 23:</b>	Concentração da Citocina INF- $\gamma$ segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de medula óssea .....	64
<b>Figura 24:</b>	Concentração da Citocina TNF- $\alpha$ segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de medula óssea .....	65
<b>Figura 25:</b>	Concentração da Citocina IL-17A segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de medula óssea .....	66
<b>Figura 26:</b>	Concentração da Citocina IL-2 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de sangue periférico.....	67
<b>Figura 27:</b>	Concentração da Citocina IL-4 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de sangue periférico.....	68
<b>Figura 28:</b>	Concentração da Citocina IL-6 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de sangue periférico.....	69
<b>Figura 29:</b>	Concentração da Citocina IL-10 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de sangue periférico.....	70
<b>Figura 30:</b>	Concentração da Citocina INF- $\gamma$ segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de sangue periférico.....	71
<b>Figura 31:</b>	Concentração da Citocina TNF- $\alpha$ segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de sangue periférico.....	72
<b>Figura 32:</b>	Concentração da Citocina IL-17A segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de CT de sangue periférico.....	73

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01:</b> Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de sub-populações celulares através de moléculas de superfície .....	39
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AMD3100</b>	Antagonista do receptor CXCR4
<b>APC</b>	Aloficocianina
<b>CBA</b>	<i>Cytometric Bead Array</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster of Differentiation</i>
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética no Uso Animal
<b>CFU-F</b>	<i>Colony forming unit fibroblast</i>
<b>CG</b>	Catepsina-G
<b>CT</b>	Células-tronco
<b>CTA</b>	Células-tronco adultas
<b>CTC</b>	Células-tronco cardíacas
<b>CTE</b>	Células-tronco embrionárias
<b>CTH</b>	Células-tronco hematopoiéticas
<b>CTM</b>	Células-tronco mesenquimais
<b>CTPi</b>	Células-tronco pluripotentes induzidas
<b>CXCR4</b>	<i>Chemokine Receptor Type 4</i>
<b>DC</b>	<i>Dendritic cells</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence Absorbing Cell Sorting</i>
<b>FITC</b>	Isotiocianato de Fluoresceína
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte colony stimulating factor</i>
<b>HEMOAM</b>	Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas
<b>IDO</b>	Idolamina 2,3-dioxigenase
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IL</b>	Interleucina

<b>i.p.</b>	Intra-peritoneal
<b>ISCT</b>	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
<b>LH</b>	Linfoma Hodgkin
<b>LNH</b>	Linfoma não-Hodgkin
<b>MM</b>	Mieloma Múltiplo
<b>MHC</b>	Complexo Principal de Histocompatibilidade
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MO</b>	Medula Óssea
<b>NE</b>	Neutrófilo-Elastase
<b>NK</b>	Natural killer
<b>NK-T</b>	Natural killer-T
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>PBS</b>	Solução Tamponada com Fosfato
<b>PBS-P</b>	Solução Tamponada com Fosfato, Albumina e Saponina
<b>PBS-W</b>	Solução Tamponada com Fosfato e Albumina
<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PerCP</b>	Clorofilpiridina
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SBF</b>	Soro Bovino Fetal
<b>SDF-1<math>\alpha</math></b>	<i>Stromal cell-derived factor 1-alpha</i>
<b>SP</b>	Sangue Periférico
<b>SP-SE</b>	Suspensão Celular Sem Estímulo
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral-alfa
<b>T<sub>H</sub></b>	Células T Helper

**UV**

Ultravioleta

**μL**

Microlitro

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Células-tronco</b> .....	<b>20</b>
<b>2.2 Classificação das células-tronco</b> .....	<b>21</b>
2.2.1 <i>Quanto a origem</i> .....	21
2.2.1 <i>Quanto ao potencial de diferenciação</i> .....	22
<b>2.3 Fontes de obtenção de células-tronco</b> .....	<b>23</b>
<b>2.4 Células-tronco derivadas da medula óssea</b> .....	<b>24</b>
2.4.1 <i>Células-tronco hematopoiéticas (CTH)</i> .....	24
2.4.2 <i>Células-tronco mesenquimais (CTM)</i> .....	24
2.4.2.1 <i>Perfil imunológico das CTM</i> .....	26
<b>2.5 Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF)</b> .....	<b>27</b>
2.4.1 <i>Eixo SDF-1<math>\alpha</math>/CXCR4</i> .....	28
<b>2.6 AMD3100</b> .....	<b>30</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>21</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 Tipo de Estudo</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2 Informações Éticas</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3 População de estudo</b> .....	<b>35</b>
<b>4.4 Procedimentos</b> .....	<b>37</b>
4.4.1 <i>Fluxograma do protocolo experimental</i> .....	37
<b>4.5 Coleta e isolamento de células-tronco</b> .....	<b>37</b>
4.5.1 <i>Obtenção de células-tronco de medula óssea</i> .....	37
4.5.2 <i>Isolamento de células mononucleares do sangue periférico</i> .....	38
<b>4.6 Imunofenotipagem <i>ex vivo</i> das células-tronco</b> .....	<b>39</b>
<b>4.7 Cultura <i>in vitro</i> das células-tronco</b> .....	<b>40</b>
<b>4.8 Dissociação enzimática das células-tronco mesenquimais</b> .....	<b>41</b>
<b>4.9 Dosagem das citocinas do sobrenadante da cultura celular</b> .....	<b>42</b>

4.10 Análise estatística.....	42
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
5.1 Efeitos da administração do G-CSF e/ou AMD3100.....	44
5.2 Fotomicroscopia de culturas <i>in vitro</i> de células-tronco de medula óssea e sangue periférico .....	47
5.3 Caracterização das CTM.....	58
5.4 Cinética de produção de citocinas pelas células-tronco durante os dias de cultura <i>in vitro</i> .....	59
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE: Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas (CEUA-UFAM).....</b>	<b>95</b>
<b>ANEXO: Artigo .....</b>	<b>97</b>

---

# *Introdução*

## INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) tem aberto uma nova era em terapias baseadas em células. Possuem como características principais a auto-renovação (proliferação) e diferenciação em diversas linhagens celulares. Atualmente as CT podem ser classificadas em células-tronco embrionárias (CTE), que são isoladas a partir da massa celular interna de blastocistos, e células-tronco não embrionárias, que incluem as células tronco do sangue do cordão umbilical e as células-tronco adultas (CTA), encontradas em vários tecidos (ADEGANI *et al.*, 2013).

As CTA são denominadas de pluripotentes por possuírem uma capacidade mais limitada de diferenciação celular do que as CTE. Estas células residem dentro dos órgãos/tecidos adultos específicos, e desempenham um papel crucial na regeneração e auto-renovação tissular (NELSON *et al.*, 2009).

A medula óssea é a principal fonte para obtenção de células-tronco adultas. É um tecido complexo que alberga diferentes sub-populações de CT, e pelo menos duas principais e diferentes populações de CTA já foram identificadas e bem caracterizadas, as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais (CTM) (HAWKINS *et al.*, 2013).

A aplicação dessas sub-populações de CT com fins terapêuticos, seja na regeneração de tecidos, em doenças auto-imunes ou em doenças crônico-degenerativas, tem sido amplamente utilizada. No entanto, existem complicações tanto práticas quanto técnicas associadas ao isolamento, colheita e expansão *ex vivo* dessas células (REN *et al.*, 2010).

Uma estratégia alternativa para a terapia de células progenitoras da medula óssea é estimular a mobilização dessas células da medula óssea para circulação periférica, através de agentes mobilizadores, e assim, contornar esses problemas. O estabelecimento de uma metodologia de isolamento de CTH e CTM de sangue periférico é bastante atraente, por tal procedimento garantir uma fonte dessas células que não requer um método invasivo como extração de medula óssea (BREHM; ZEUS; STRAUER, 2002).

Dessa maneira, este estudo propõe avaliar a mobilização de CTH e CTM para o sangue periférico a partir de agentes mobilizantes peptídicos e não peptídicos, e o possível efeito imunomodulador do G-CSF e do AMD3100 sobre o perfil de citocinas produzidas *in vitro*.

---

*Revisão Bibliográfica*

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

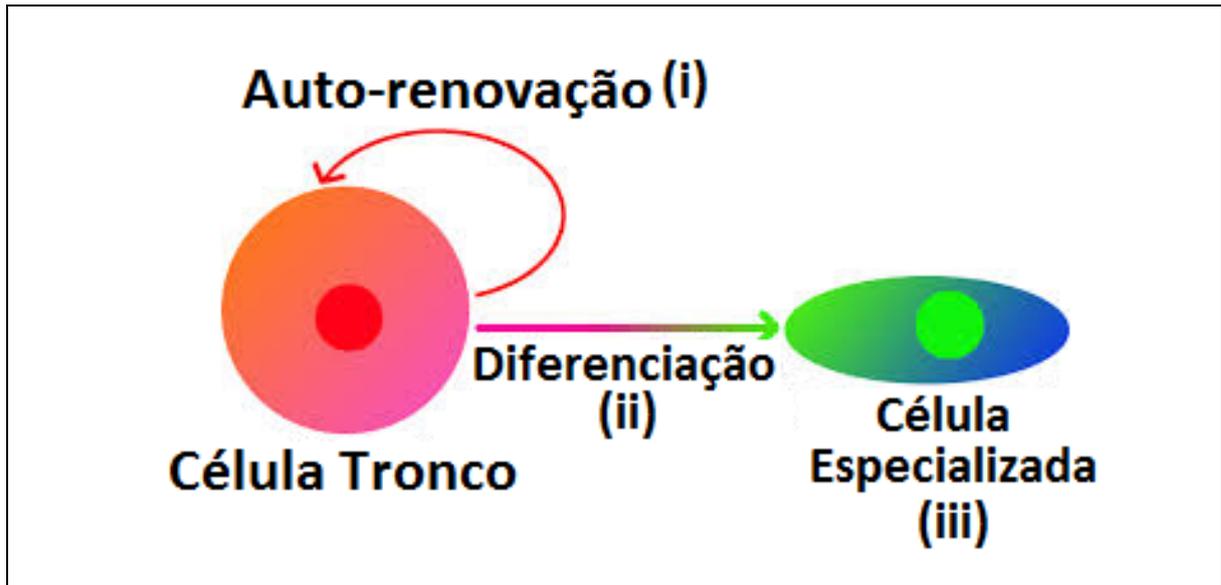
### 2.1 Células-tronco

O termo “células-tronco” surgiu na literatura científica no ano de 1868, a partir do biólogo alemão Ernst Haeckel, um grande defensor da Teoria da Evolução proposta por Darwin. Sua pesquisa foi baseada em desenhos de árvores filogenéticas para representar a evolução dos organismos por descendência de ancestrais comuns, as quais denominou de “árvores genealógicas” (*Stammbäume*, termo utilizado em alemão para *stem trees* ou *family trees*). Utilizou o termo células-tronco (em alemão, *Stammzelle*) para descrever um organismo unicelular ancestral do qual presumiu que todos os organismos multicelulares evoluíram. Posteriormente efetuou um salto da evolução (filogenia) à embriologia (ontogenia), propondo que a célula fertilizada também poderia ser chamada de célula-tronco. Dessa maneira, Haeckel utilizou a nomenclatura de células-tronco em dois sentidos: representando o ancestral unicelular comum de todos os organismos multicelulares e como o óvulo fertilizado que dá origem a todas as células do organismo (STAUFFER, 1957).

Nessa época, especificamente na área da hematopoese, surge à investigação sobre a existência de um precursor comum para os vários tipos de células sanguíneas, e a teoria proposta para o termo células-tronco se confirma, consolidando a ideia e observação de que todas as células do sangue se originam de uma única célula precursora na medula óssea (MCCULLOCH; TILL, 1963). Posteriormente, com o interesse crescente da comunidade científica pelo assunto, pesquisas evidenciaram que esse nicho de células progenitoras não é exclusivo da medula óssea, existindo células-tronco residentes em quase todos os órgãos e tecidos do corpo (ILIC; POLAK, 2011).

Essas células denominadas de tronco (CT) são definidas como indiferenciadas e não especializadas. Possuem três características principais (**Figura 01**) que as diferenciam das demais células (JACOBS *et al.*, 2013):

- i) capacidade de auto-renovação, por divisão simétrica ou assimétrica, com habilidade de gerar no mínimo uma célula-filha com características similares às da célula mãe;
- ii) capacidade de uma única célula de se diferenciar em múltiplas linhagens celulares, e;
- iii) capacidade de reconstituir funcionalmente, *in vivo*, um tecido lesado.



**Figura 01:** Ilustração das principais características das células tronco: i) Auto renovação; ii) Poder de diferenciação; iii) Comprometimento morfológico e funcional com um tecido/órgão específico.

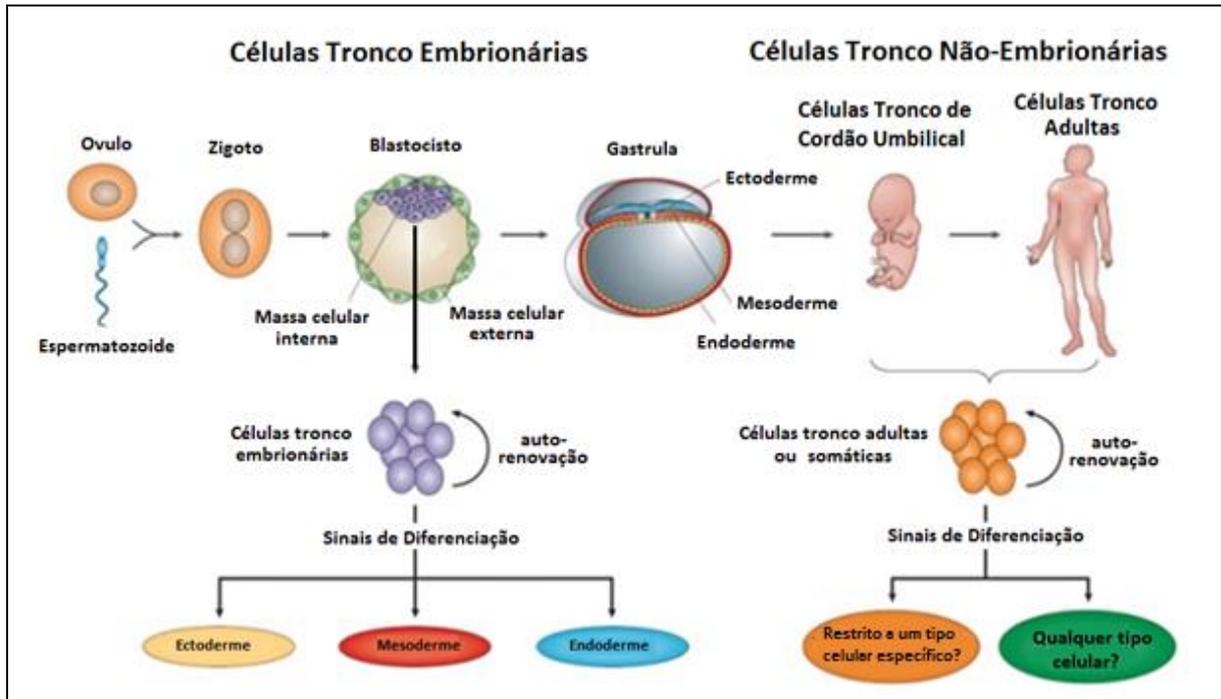
**Fonte:** Adaptado de <http://www.allthingsstemcell.com/wp-content/uploads/2009/07/StemCell.png>

Atualmente existem diversas sub-populações de células-tronco descritas, incluindo: células-tronco hematopoiéticas (CTH) (ABDELHAY *et al.*, 2009), células-tronco mesenquimais (CTM) (CHEN *et al.*, 2004), células progenitoras endoteliais (CPE) (KATRITSIS *et al.*, 2005), células-tronco embrionárias (CTE) (LAFLAMME *et al.*, 2007), e mais recentemente as células-tronco pluripotentes induzidas (iCTP) e células-tronco cardíacas (CTC) (VAN LAAKE *et al.*, 2010).

## 2.2 Classificação das células-tronco

### 2.2.1 Quanto a origem

De acordo com a origem, as CT podem ser classificadas em: células-tronco embrionárias (CTE), que são isoladas a partir da massa celular interna de blastocistos, resultante da divisão celular do ovulo fertilizado (zigoto) e que podem dar origem a qualquer tipo de célula ou de tecido que compõe o embrião (ROBEY, 2000), e células-tronco não-embrionárias (células tronco presentes no sangue de cordão umbilical e células tronco adultas ou somáticas, que residem dentro dos órgãos/tecidos adultos específicos, ambas com capacidade mais limitada de diferenciação celular do que as CTE) (**Figura 02**) (ADEGANI *et al.*, 2012).



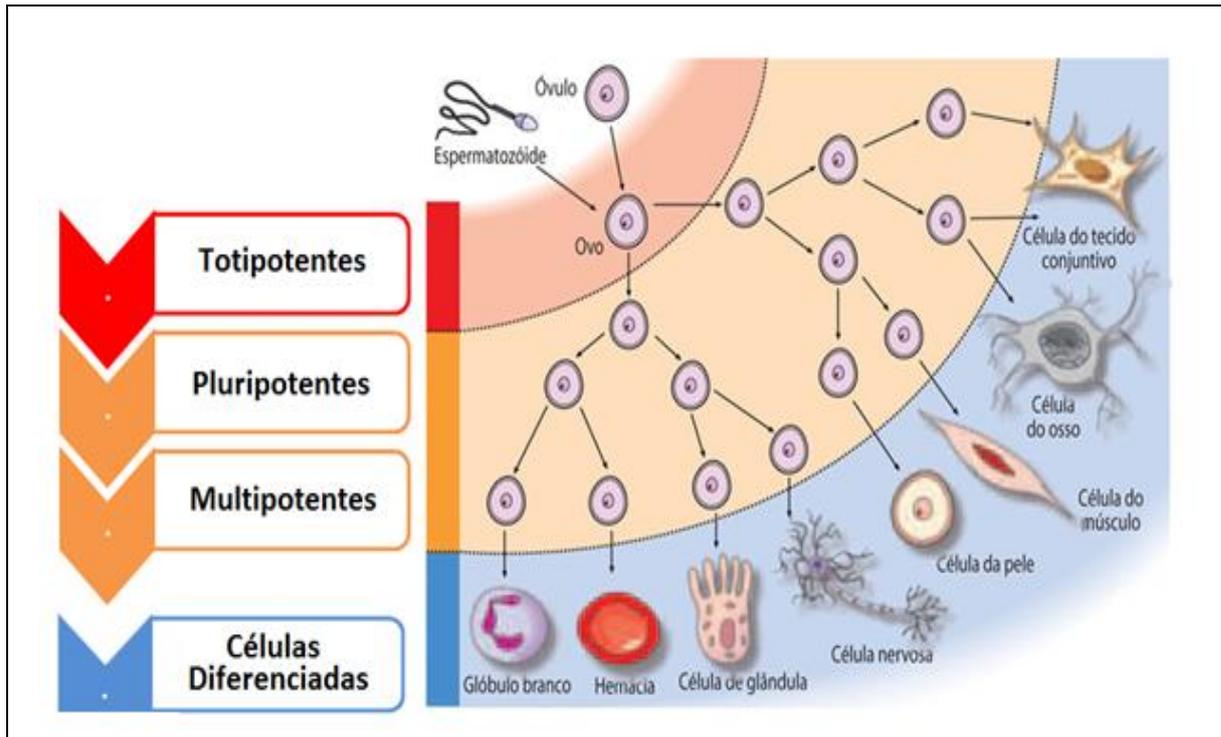
**Figura 02:** Ilustração da classificação das células-tronco em embrionárias e não-embrionárias (células-tronco de cordão umbilical e células-tronco adultas ou somáticas).

**Fonte:** Adaptado de <http://www.nature.com/scitable/content/embryonic-and-somatic-stem-cells-as-a-27447>.

### 2.2.2 Quanto ao potencial de diferenciação

Dependendo da capacidade de diferenciação, as CT podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes, multipotentes ou até mesmo unipotentes (**Figura 03**). Nos mamíferos, a totipotência (poder máximo de diferenciação) só é exibida pela massa celular interna do blastocisto durante a embriogênese, em outras palavras, uma célula que pode se desenvolver em qualquer tipo celular, sendo conhecida como células-tronco embrionárias (SZARDIEN *et al.*, 2012). As pluripotentes têm a habilidade de originar as células dos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma), ou seja, qualquer célula do organismo, mas são incapazes de gerar um novo indivíduo. As multipotentes, que podem originar quatro ou mais linhagens celulares, e por fim, as unipotentes, que são comprometidas com um tipo específico de linhagem celular (VERFAILLIE; PERA; LANSDORP, 2002).

O comando que determina com que a célula-tronco se diferencie em determinado tecido específico, como fígado, osso ou sangue por exemplo, ainda não foi elucidado. Porém, existem substâncias ou fatores de diferenciação que quando são colocadas em culturas de células tronco *in vitro*, determinam que elas se diferenciem no tecido esperado (KRAMPERA *et al.*, 2006).



**Figura 03:** Ilustração das células-tronco quanto ao poder de diferenciação em: totipotentes, pluripotentes e multipotentes.

**Fonte:** Adaptado de NERVI; LINK; DIPERSIO, 2006.

### 2.3 Fontes de obtenção de células-tronco

Considera-se como célula embrionária aquela que constitui a massa interna do blastocisto (embrioblasto) e que pode ser removida e cultivada em laboratório. Atualmente, não há estudos de terapia celular utilizando as CTE em humanos. Contudo, estas representam uma fonte extraordinária de células, com aplicação potencial em inúmeras doenças (DALEY; GOODELL; SNYDER, 2003).

Para as CTA, as três principais fontes acessíveis autólogas ou alogênicas utilizadas na clínica médica são derivadas da medula óssea e tecidos, sanguíneo e adiposo, e mais recentemente, alguns estudos têm demonstrado eficiência no isolamento de CT de sangue de cordão umbilical logo após o nascimento para fins terapêuticos (LI; CAI, 2012).

A medula óssea é a principal fonte para obtenção de células-tronco para estudos clínicos e pré-clínicos. É um tecido complexo que alberga diferentes tipos e subpopulações de CT, também conhecidas como células progenitoras. Pelo menos duas principais e diferentes populações de células-tronco adultas já têm sido amplamente estudadas e foram identificadas na medula óssea: as células-tronco hematopoiéticas (CTH) e as células-tronco mesenquimais

(CTM). No entanto, já se sabe que existem outras subpopulações de CT residentes na medula óssea, como as endoteliais e progenitoras osteogênicas (MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2010).

## 2.4 Células-tronco derivadas da medula óssea

### 2.4.1 Células-tronco hematopoiéticas (CTH)

As células-tronco hematopoiéticas são essenciais para a geração e homeostasia do sistema sanguíneo. Elas dão origem a todos os tipos de células sanguíneas, incluindo linfócitos, eritrócitos, monócitos, granulócitos e plaquetas (KONDO; WEISSMAN; AKASHI, 1997; AKASHI *et al.*, 2000). Embora recentemente tenham surgido evidências de que as CTH também têm a capacidade de se diferenciarem em outras linhagens celulares não hematopoiéticas (MENDRONE, 2009).

As CTH são de fácil obtenção, uma vez que são células residentes na medula óssea (1 em  $10^4$  à 1 em  $10^8$  de células nucleadas da medula óssea), que podem ser aspiradas diretamente ou estimuladas a mover-se para corrente do sangue periférico, onde podem ser facilmente recolhidas (LI; WU, 2011).

A identificação é possível com razoável precisão, uma população de células esperadas à serem células-tronco hematopoiéticas. Essa identificação é proporcionada pela presença de determinados marcadores de superfície e ausência de outros. Dentre os marcadores descritos, o  $CD34^+$  é o que encontra um amplo uso clínico, e é expresso nas diversas CTH provenientes da medula óssea, do sangue periférico, do sangue de cordão umbilical e do fígado fetal. Embora não seja uma molécula que defina especificamente a CTH, os dados descritos sugerem que a CTH está contida numa população de células  $CD34^+$  (ABDELHAY *et al.*, 2009).

### 2.4.2 Células-tronco mesenquimais (CTM)

A existência de células precursoras não hematopoiéticas na medula óssea foi descrita por Friedenstein, na década de 60 (FRIEDENSTEIN; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966). Desde a sua descrição original, estas células receberam diferentes nomes. Inicialmente foram chamadas de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F, do inglês *colony forming unit fibroblast*), devido à capacidade de aderir ao plástico

das garrafas de cultivo e formar colônias de células semelhantes aos fibroblastos (OWEN; FRIEDENSTEIN, 1988). Também foram denominadas células-tronco mesenquimais, pois diferenciavam-se em tipos de células não hematopoiéticas, e por fim, foram denominadas de células estromais da medula óssea, porque pareciam originar-se das estruturas de suporte da medula óssea (CAPLAN, 1991). Em 2005, a sociedade internacional para terapia celular (ISCT – do inglês, *International Society for Cellular Therapy*) sugeriu a nomenclatura de células mesenquimais estromais multipotentes.

As células-tronco mesenquimais (CTM) são multipotentes, com capacidade de auto-renovação e diferenciação. Estão distribuídas em uma ampla variedade de tecidos e podem ser isoladas a partir de tecidos adultos, incluindo a medula óssea (MO), sangue do cordão umbilical, músculo esquelético e tecido adiposo (JIN *et al.*, 2013). As CTM se diferenciam não apenas em células da linhagem mesodérmica, mas também em células das linhagens endodérmica e ectodérmica, tais como osso, gordura, cartilagem, cardiomiócitos, células endoteliais, células epiteliais do pulmão, neurônios, hepatócitos e ilhotas pancreáticas (LI; IKEHARA, 2013).

As CTM possuem as características de aderência às superfícies plásticas em cultura e de expressão ou não de antígenos específicos de superfície, como CD73+/ CD90+/ CD105+, CD34-/ CD45- (TROUNSON *et al.*, 2011). Promovem a reparação de tecidos, estimulam a proliferação e diferenciação de células progenitoras de tecidos endógenos, e diminuem as reações inflamatórias e imunológicas (REN *et al.*, 2010). Além disso, são facilmente acessíveis e não há complicações éticas quando aplicadas em terapias celulares (TAO *et al.*, 2010).

Estudos já demonstraram que as CTM são capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos, condrócitos, células musculares e células do estroma de sustentação da hematopoese em condições específicas (PITTENGER *et al.*, 1999). Posteriormente, foi demonstrado que é possível também a diferenciação de CTM em células do tecido nervoso, células musculares lisas, periócitos e cardiomiócitos (BARRY; MURPHY, 2004).

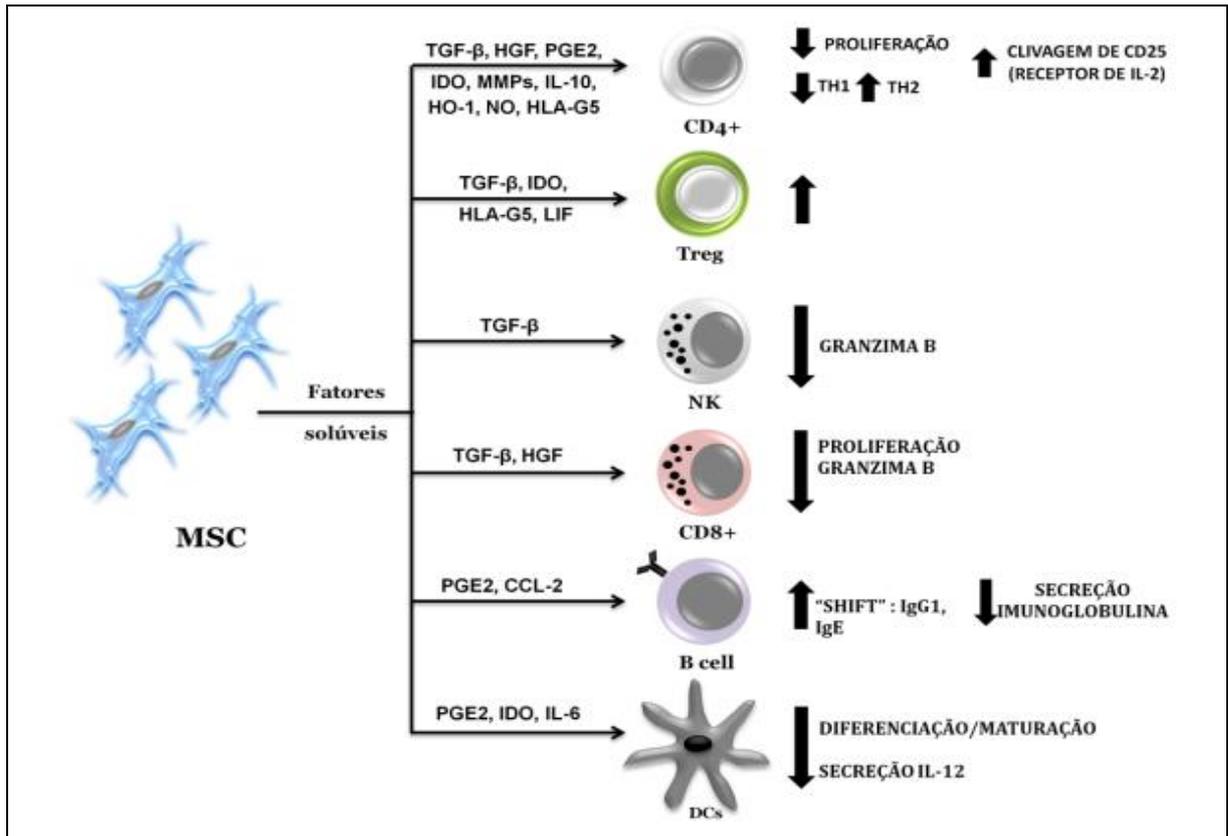
Dessa forma, o interesse no estudo das CTM vem crescendo exponencialmente nos últimos anos, devido a esse alto potencial na regeneração de tecidos e órgãos lesados e sua capacidade de auto renovação, mantendo a capacidade de diferenciação, como demonstram os estudos clínicos e pré-clínicos (CAPLAN; BRUDER, 2001).

### 2.4.2.1 Perfil imunológico das CTM

Crescentes evidências demonstram que CTM apresentam potentes propriedades imunomoduladoras. Por exemplo, na retenção de células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*) em um estado imaturo por inibição da expressão de moléculas de MHC de classe II e moléculas co-estimuladoras CD1- $\alpha$ , CD40, CD80 e CD86. Através da supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas que regulam a resposta imunológica (MA *et al.*, 2014).

Na resposta imune adaptativa, as moléculas de MHC de classe II podem ativar as células T, no entanto, na ausência ou baixa expressão de moléculas co-estimuladoras, que é o segundo sinal necessário para esta ativação, as células T entram em estado não responsivo de anergia. Desta maneira, o fenótipo observado em CTM é considerado não-imunogênico e sugere que, estas células induzem a tolerância imunológica, inibindo a ativação e a proliferação de várias células do sistema imunológico do hospedeiro (JAVAZON; BEGGS; FLAKE, 2004).

Além do contato célula-célula, outro mecanismo pelas quais as CTM exercem seus efeitos imunossupressores é pela secreção de diversos fatores solúveis (YAGI *et al.*, 2010) (**Figura 05**). As CTM influenciam a atividade imune dos linfócitos T e B, células “*natural killer*” (NK), células dendríticas (DC), macrófagos e neutrófilos, suprimindo através da secreção de fatores solúveis como TGF- $\beta$ 1, HGF, óxido nítrico (NO), idolamina 2,3-dioxigenase (IDO) e prostaglandina E2 (PGE2) ou estimulando através da secreção das citocinas IL-1 e IL-6 (NASEF *et al.*, 2007; ENGLISH *et al.*, 2007; BASSI *et al.*, 2012).



**Figura 05:** Diversos fatores solúveis secretados pelas CTM modulam a resposta das células do sistema imunológico.

**Fonte:** Adaptado de Bassi *et al.*, 2012.

## 2.5 Fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF)

O Fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF – do inglês, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*) é uma citocina hematopoiética que regula a proliferação, diferenciação e sobrevivência de células progenitoras mielóides e desempenha um importante papel na regulação e produção normal de granulócitos frente a resposta contra as infecções (SZARDIEN *et al.*, 2012).

Apenas duas em cada 100 mil células mononucleares do sangue periférico são CTH. Para se coletar um número suficiente de CT do sangue periférico que garanta enxertia medular em um transplante autogênico ou alogênico, as CT devem ser recrutadas da medula óssea para a circulação. Este processo, habitualmente denominado mobilização, pode ser induzido através da administração de fatores de crescimento hematopoiéticos, como o G-CSF, que é utilizado como tratamento-ouro (*gold-standard*) na mobilização de células-tronco derivadas da medula óssea em transplantes. No entanto, outras quimiocinas e/ou moléculas

quimioatraentes surgiram como chave para produção de agentes de mobilização de células-tronco derivadas da medula óssea, que apresentam uma rápida cinética de mobilização (BROXMEYER, 2005).

O G-CSF permanece como o agente mais comumente utilizado para mobilização de CTH na clínica, no entanto outros agentes quimiotáticos estão em desenvolvimento, pois vários estudos demonstram que o uso do G-CSF promove efeitos colaterais para pacientes. Dessa forma, mecanismos têm sido propostos para explicar como esta citocina afeta as alterações funcionais no interior da medula óssea, e novos medicamentos têm sido propostos para mobilização de células progenitoras hematopoéticas, os quais incluem a promoção da expansão de granulócitos, a atenuação de proteases e moléculas de adesão e a interrupção do eixo *SDF-1 $\alpha$ /CXCR4* (CASHEN *et al.*, 2008; ALEXANDER *et al.*, 2011).

### 2.5.1 Eixo *SDF-1 $\alpha$ /CXCR4*

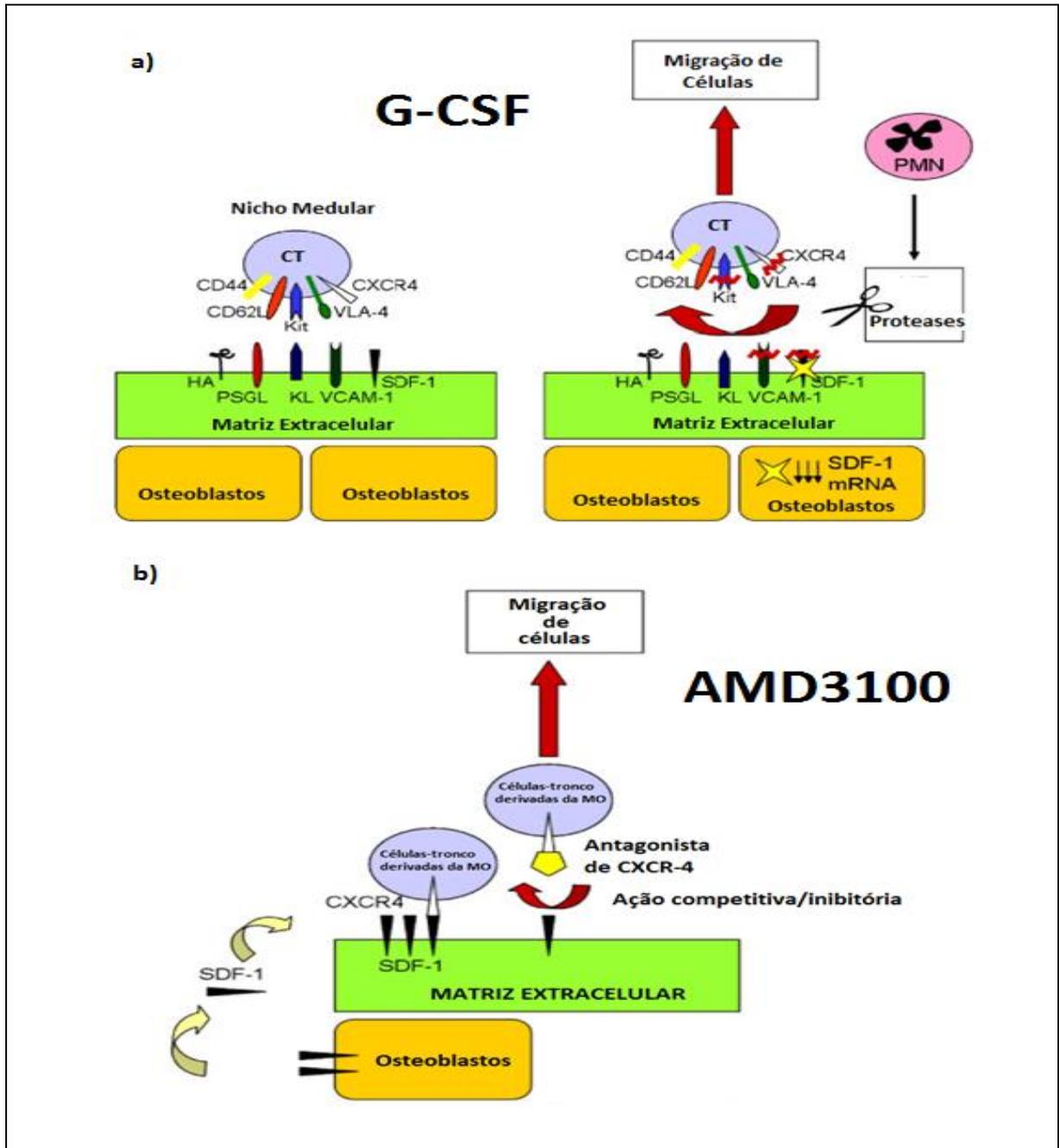
As quimiocinas são citocinas pró-inflamatórias quimiotáticas, que se ligam a receptores específicos acoplados a proteínas G, em um complexo que envolve 7 domínios glicoprotéicos transmembranares em células-alvo (RATAJCZAK *et al.*, 2012).

A quimiocina *SDF-1 $\alpha$*  (do inglês, *stromal cell-derived factor 1-alpha*) foi identificada pela primeira vez no sobrenadante de células estromais da medula óssea. Mais tarde, foi demonstrado ser expressa constitutivamente em concentrações elevadas por osteoblastos, células endoteliais e reticulares que estão espalhadas por todo o nicho medular. Essa quimiocina é produzida principalmente por células do nicho medular, incluindo osteoblastos. É um dos fatores mais importantes envolvido na proliferação e suporte estromal. A retenção das células dentro do microambiente da medula óssea depende de interações entre moléculas de adesão, como as integrinas VLA-4 e VLA-5 e o proteoglicano CD44 (RANKIN, 2012).

Em contraste com muitos receptores de quimiocina, alguns estudos sugerem que o *SDF-1 $\alpha$*  ativa somente o receptor CXCR4 (do inglês, *chemokine receptor type 4*), que é expresso não apenas por uma grande variedade de leucócitos, mas também em células fora do sistema imunológico, por exemplo, no sistema nervoso central. A interação entre o *SDF-1 $\alpha$*  com seu receptor CXCR4 parece estar diretamente envolvido no tráfego de leucócitos, “*homing*” e retenção de células-tronco hematopoiéticas (CD34<sup>+</sup>) na medula óssea e na hematopoese fetal (ROSENKILDEM *et al.*, 2004).

Alguns estudos têm demonstrado que a ligação da quimiocina com seu receptor específico (SDF-1 $\alpha$ /CXCR4) pode apresentar uma importante estratégia terapêutica na engenharia tecidual. Isso porque durante alguma dano tecidual, as células do órgão lesado apresentam uma alta expressão de SDF-1 $\alpha$ , o que provoca uma elevação nos níveis dessa quimiocina, ocasionando o recrutamento e retenção local de células CD34<sup>+</sup> através da atração quimiotática pelo gradiente de SDF-1 $\alpha$  (DONAHUE *et al.*, 2009).

Lévesque e colaboradores (2002) descreveram em um estudo murino experimental que o G-CSF induz a liberação de enzimas proteolíticas, como a neutrofilo-elastase (NE) e a catepsina-G (CG) após sua administração. Estas enzimas atuam clivando várias moléculas responsáveis pela retenção de CTH da medula óssea, incluindo a VCAM-1, SDF-1 $\alpha$ , CXCR4 e c-kit. O G-CSF também tem mostrado reduzir a expressão de RNAm do gene SDF-1 $\alpha$  e inibir a atividade dos osteoblastos, levando a uma diminuição nos níveis de SDF-1 $\alpha$ , e promovendo uma menor retenção dessas células no nicho medular. Em contra partida, o AMD3100 demonstrou agir de forma competitiva na ligação com o receptor CXCR4, inibindo a ligação do SDF-1 $\alpha$  ao seu receptor cognato CXCR4 (**Figura 05**).



**Figura 05:** a) O eixo SDF-1 $\alpha$ /CXCR4, que desempenha um papel crítico no “homing” e mobilização de células-tronco da medula óssea. A perturbação desse eixo com o inibidor competitivo AMD3100 resulta em uma rápida mobilização de células-tronco medulares para o sangue periférico.

**Fonte:** Adaptado de NERVI; LINK; DIPERSIO, 2006.

## 2.6 AMD3100

O AMD3100 (*Plerixafor*<sup>®</sup>) é um protótipo antagonista não peptídico do receptor CXCR4. O composto foi descoberto como um agente anti-HIV muito antes de se perceber que

funcionava, através do bloqueio específico que inibe a ligação do SDF-1 $\alpha$  ao seu receptor CXCR4. Durante o desenvolvimento do AMD3100, descobriu-se que o composto aumenta a contagem de glóbulos brancos no sangue e, mais importante, que o composto é capaz de mobilizar células progenitoras da medula óssea (ROSENKILDE *et al.*, 2004).

Dados posteriores revelaram que a utilização de anticorpos neutralizantes contra o CXCR4 ou SDF-1 $\alpha$  reduziu a saída de células progenitoras murinas do microambiente medular, levantando a hipótese que níveis de SDF-1 $\alpha$  produzidos e liberados para circulação a partir de células do estroma medular poderia ser um mecanismo fundamental para saída do estado estacionário e uma rápida mobilização de células progenitoras hematopoiéticas (DAR *et al.*, 2011).

A partir dessa observação estudos demonstraram que o AMD3100 bloqueia de forma reversível a interação entre o receptor de quimiocina CXCR4 com o SDF-1 $\alpha$ , levando ao desenvolvimento de novas estratégias de mobilização e de uma melhor compreensão dos processos de saída e entrada das células hematopoiéticas do microambiente da medula óssea (LAROCELLI *et. al.*, 2006).

Dessa maneira, o AMD3100 é o mais promissor agente de mobilização de CT em desenvolvimento clínico atualmente. Apresenta um pico de mobilização de células CD34<sup>+</sup> da medula óssea para a corrente sanguínea de minutos a horas após a sua administração, em contrapartida ao G-CSF, que necessita aproximadamente entre 4 a 6 dias de administração para alcançar resultados semelhantes (HONG *et al.*, 2012).

---

*Objetivos*

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência do G-CSF e do AMD3100 na mobilização de células-tronco derivadas da medula óssea de camundongos e no perfil de citocinas induzidas por estes mediadores em cultura primária.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do G-CSF e/ou AMD3100 na mobilização de células-tronco da medula óssea para o sangue periférico de camundongos previamente tratados com PBS ou G-CSF;
- Caracterizar as subpopulações de células-tronco através de marcadores de superfície em aspirado de medula óssea e sangue periférico;
- Analisar o perfil de citocinas no sobrenadante de cultura de células-tronco derivadas da medula óssea e sangue periférico, estimuladas ou não com G-CSF.

---

## *Material e Métodos*

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Tipo de Estudo

Este estudo se caracteriza por uma pesquisa com experimentação em modelo animal de laboratório, no qual foi testado o efeito do GCS-F e/ou do AMD3100 em camundongos previamente tratados com PBS ou G-CSF, para avaliar a mobilização de sub-populações de células-tronco da medula óssea para o sangue periférico e produção de citocinas em cultivo celular.

### 4.2 Informações Éticas

O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas (CEUA-UFAM) e respeitou os princípios de cuidados com animais de laboratório de acordo com a lei nº6638 da Republica Federativa do Brasil de 08 de maio de 1979, que trata de normas para as práticas didático-científico da vivisseção de animais.

### 4.3 População de Estudo

Para este estudo foram utilizados 45 camundongos machos BALB/c com 3-4 semanas de vida, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Esses camundongos foram mantidos em estantes e gaiolas apropriadas, alimentados com ração padrão e água, com controle de luz (ciclos de 12 horas), temperatura e umidade, no Biotério da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). O experimento foi constituído por 05 grupos experimentais, com 09 camundongos cada, organizados da seguinte forma:

- **Grupo PBS + PBS ( $n = 09$ ) (controle negativo)**

Neste grupo os camundongos foram tratados diariamente com PBS (160 $\mu$ l i.p.) durante 04 dias. 24 horas após a última injeção foi administrado nos camundongos o mesmo volume do tratamento diário de PBS, por via intraperitoneal. Após 60 minutos foram coletados o sangue periférico e medula óssea dos animais.

- **Grupo PBS + G-CSF + (n = 09)**

Neste grupo os camundongos foram tratados diariamente com PBS (160µl i.p.) durante 04 dias. 24 horas após a última injeção foi administrado o G-CSF (*Filgrastine*<sup>®</sup>), na dose de 200 µg/kg (VILAS-BOAS *et al.*, 2006), por via intraperitoneal. Após 60 minutos foram coletados o sangue periférico e a medula óssea dos animais.

- **Grupo PBS + AMD3100 + (n = 09)**

Neste grupo os camundongos foram tratados diariamente com PBS (160µl i.p.) durante 04 dias. 24 horas após a última injeção foi administrado o AMD3100 (*Plerixafor*<sup>®</sup>), na dose de 5 mg/kg (PITCHFORD *et al.*, 2009), por via intraperitoneal. Após 60 minutos foram coletados o sangue periférico e medula óssea dos animais.

- **Grupo G-CSF + PBS (n = 09)**

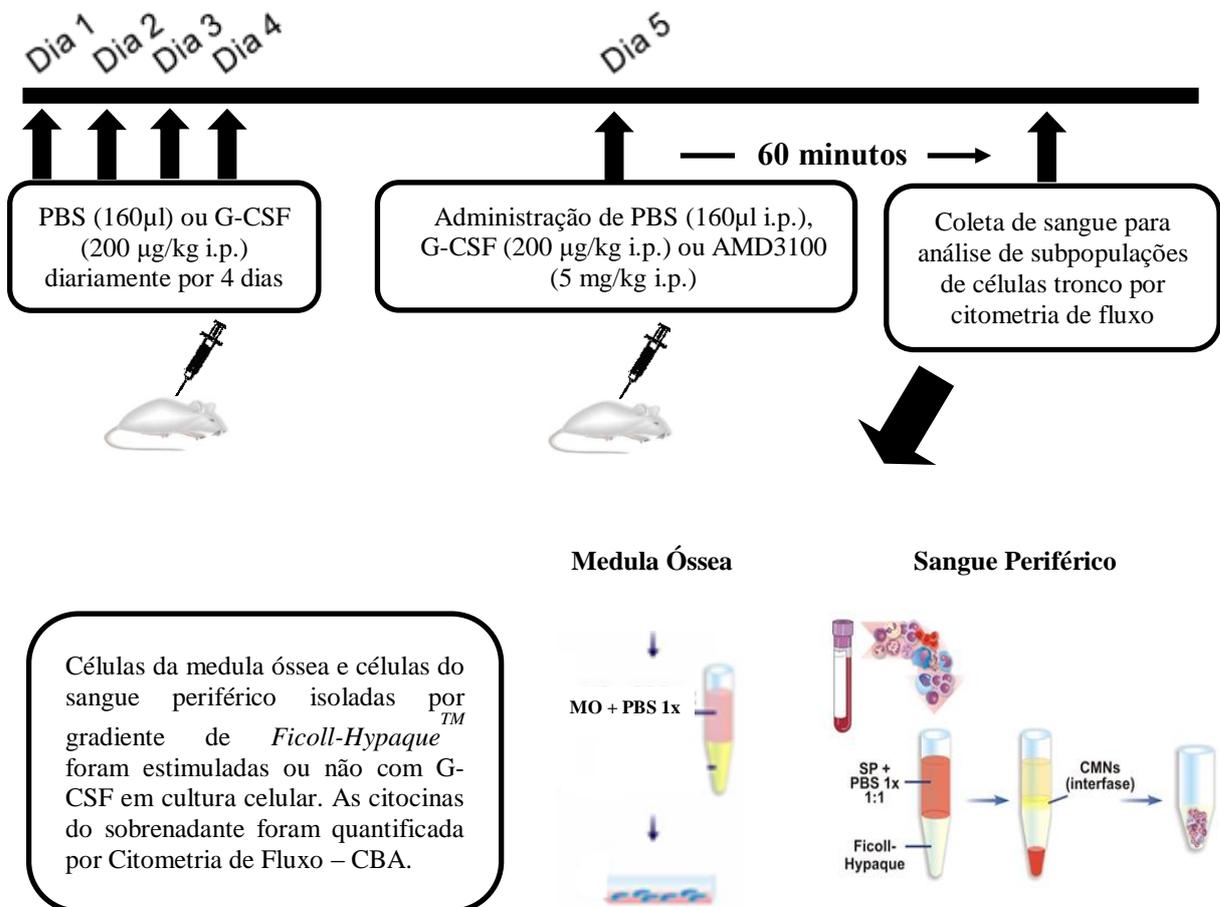
Neste grupo os camundongos foram tratados diariamente com G-CSF (200 µg/kg i.p.) durante 04 dias. 24 horas após a última injeção foi administrado 160µl de PBS, por via intraperitoneal. Após 60 minutos foram coletados o sangue periférico e medula óssea dos animais.

- **Grupo G-CSF + AMD3100 (n = 09)**

Neste grupo os camundongos foram tratados diariamente com G-CSF (200 µg/kg i.p.) durante 04 dias. 24 horas após a última injeção foi administrado nos camundongos AMD3100 (*Plerixafor*<sup>®</sup>), na dose de 5 mg/kg, por via intraperitoneal. Após 60 minutos foram coletados o sangue periférico e medula óssea dos animais.

## 4.4 Procedimentos

### 4.4.1 Fluxograma do protocolo experimental



## 4.5 Coleta e isolamento de células-tronco

### 4.5.1 – Obtenção de células-troncos de medula óssea

Os camundongos foram tratados por quatro dias consecutivos com solução tamponada com fosfato (PBS - 160µl i.p.) ou G-CSF, na dose de 200 µg/kg, por via intraperitoneal (i.p.) em intervalos de 24 horas. No quinto dia, 24 horas após a última aplicação, foi administrado nos grupos PBS (160µl i.p.), G-CSF (200 µg/kg i.p.) ou AMD3100 (5 mg/Kg i.p.). 60 minutos após a última aplicação, foram retirados 3mL de sangue periférico dos animais (*pool* de 03 animais, com n=9 por grupo) com pipeta Pasteur heparinizada através do plexo ocular

para realização da imunofenotipagem *ex vivo* das células progenitoras na circulação e para cultura celular.

Após a coleta de sangue periférico, os animais foram eutanasiados por deslocamento da coluna cervical. Para a coleta da medula óssea, o fêmur esquerdo de cada animal foi retirado por procedimento cirúrgico. O mesmo foi lavado em placa de Petri com PBS estéril e as epífises foram cortadas, possibilitando a entrada da agulha da seringa de 1mL, na cavidade medular e injeção de 1mL de PBS estéril para a retirada das células (*pool* de 03 animais, com n=9 por grupo). O lavado foi coletado em tubo de fundo cônico de 15mL estéril. Após a coleta, a medula óssea foi centrifugada a 1200 rpm por 10 minutos a 18-20°C. A medula óssea foi processada dentro da capela de fluxo laminar nível II. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuscitado em 2mL de PBS estéril. Da suspensão celular obtida, uma alíquota foi separada para a contagem através do hemocítômetro (SYSMEX, modelo XT-2000i). Diante do número de células foi feito o plaqueamento nas placas de cultivo.

#### 4.5.2 – Isolamento de células mononucleares do sangue periférico

O sangue coletado foi processado dentro da capela de fluxo laminar nível II, previamente desinfetado com álcool a 70% e depois por 15 minutos com ultravioleta (UV) ligada. Uma alíquota do sangue periférico foi separada para citometria de fluxo e o restante foi utilizado para o isolamento das células mononucleares por gradiente de *Ficoll-Hypaque*<sup>TM</sup>, volume a volume (sangue/*Ficoll*) em tubo de fundo cônico de 15mL estéril. Este foi centrifugado a 2000 rpm por 30 minutos, a 18-20°C e sem freio.

Em seguida, o anel formado de células mononucleares (“papa” de leucócitos) foi cuidadosamente coletado com micropipeta de 200µL e transferido para outro tubo de fundo cônico de 15mL. Esse anel de células foi ressuscitado em 1mL de PBS estéril e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos a 18-20°C com freio. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* de células foi ressuscitado mais uma vez em 1mL de PBS estéril para ser centrifugado a 1200rpm por 10 minutos a 18-20°C com freio. Em seguida, o *pellet* de células foi ressuscitado em 2mL de PBS estéril e homogeneizado. Uma alíquota dessa suspensão foi separada para realização da contagem de células através do hemocítômetro (*SYSMEX, modelo XT-2000i*). Diante do número de células foi feito o plaqueamento nas placas de cultivo.

#### 4.6 Imunofenotigem *ex vivo* das células-tronco

A caracterização morfométrica e imunofenotípica de subpopulações de células tronco mobilizadas para o sangue periférico e da medula óssea dos camundongos foram feitas por citometria de fluxo. A primeira etapa da citometria consistiu na marcação das células com anticorpos monoclonais que se fixaram nas moléculas de superfície das células tronco. Esses anticorpos são marcados com fluorescência e estas são captadas pelo citômetro de fluxo. Nesse estudo foi utilizado, tanto para o sangue quanto para medula, o seguinte painel de anticorpos monoclonais marcados e divididos em 03 tubos:

**Tabela 01:** Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de sub-populações celulares através de marcadores de superfície.

	Anticorpos	Fluorocromo	Fabricante	Lote
TUBO CN	-----	-----	-----	-----
TUBO CTH	Anti-CD34	PE	BD <sup>®</sup>	53197
	Anti-CD45	PercP	BD <sup>®</sup>	60517
TUBO CTM	Anti-CD14	FITC	BD <sup>®</sup>	24790
	Anti-CD73	PE	BD <sup>®</sup>	69192
	Anti-CD90	PercP	BD <sup>®</sup>	51139
	Anti-CD105	APC	BD <sup>®</sup>	5100528058

Para as CTH, foi utilizado um tubo com 10µL dos anticorpos anti-CD34 e anti-CD45 e em seguida adicionado 100µL da amostra do sangue periférico ou de medula óssea. Para as CTM, foi utilizado um segundo tubo, com 2µL dos anticorpos anti-CD14, anti-CD73, anti-CD90 e anti-CD105, e em seguida adicionado 100µL da amostra do sangue periférico ou de medula óssea. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 30 minutos, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Após essa etapa de marcação, foi adicionado, em cada tubo, 2mL da solução de lise de hemácias (*FACST<sup>™</sup> Lysing solution, BD<sup>®</sup> Biosciences San Jose, CA, USA*) diluída 10x em água destilada (1x). Os tubos foram homogeneizados e incubados por

mais 10 minutos, ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Passada essa incubação, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e acrescentado sobre as células 2mL de PBS-wash 1X (solução tamponada com fosfato com 0,5% de albumina bovina), para serem lavadas e em seguida novamente homogeneizadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Após essa centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionado 300µL de PBS-wash 1X. A leitura foi realizada no Citometro de Fluxo *FACSCalibur*<sup>®</sup> (*Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA*) da Fundação HEMOAM.

Para a identificação morfológica e imunofenotípica das células tronco hematopoiéticas e mesenquimais foi utilizado o programa *FlowJo* (versão 9.4). Foram utilizados “gates” para a seleção das populações de interesse em gráficos que combinaram características morfológicas com características imunofenotípicas das células identificadas pelo uso dos anticorpos monoclonais marcados com as fluorescências descritos acima.

Para identificação das CTM foi feito primeiramente um gráfico de SSC x CD90 e uma “gate” na região CD90<sup>+</sup> cujo marcador é expresso pelas CTM. Em seguida, foram excluídas as células CD14<sup>+</sup> e por fim foram selecionadas as células duplo marcadas com CD105<sup>+</sup> e CD73<sup>+</sup>. As CTH foram caracterizadas primeiramente pela expressão de CD45<sup>+</sup> utilizando-se gráficos de SSC x CD45<sup>+</sup>, em seguida foram selecionadas as células CD34<sup>+</sup> com pouca granulosidade em gráfico de SSC x CD34<sup>+</sup>. O passo seguinte foi identificar as células com baixa expressão de CD45<sup>+</sup> e selecionar as células com tamanho e granulosidade baixos.

Após a identificação e quantificação das CTM e CTH foram geradas tabelas com todos os percentuais e quantitativos das subpopulações de interesse para posterior análise estatística.

#### **4.7 Cultura *in vitro* das células-tronco**

O plaqueamento das células foi feito em placas de cultivo de 12 poços (*TPP - Techno Plastic Products in Trasadingen, Switzerland*), a partir das células da medula óssea e células mononucleares isoladas do sangue periférico. As células foram plaqueadas em 2mL de meio IMDM (*Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium*) (*Gibco<sup>TM</sup> Invitrogen, NY, USA*) suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF) (*Gibco<sup>TM</sup> Invitrogen, NY, USA*) e 1% de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (*Gibco<sup>TM</sup> Invitrogen, NY, USA*).

Para esse procedimento foram utilizadas 02 placas de cultivo por grupo, com 12 poços cada. Uma placa para amostra de medula óssea e outra para sangue periférico. O primeiro poço contendo meio IMDM e suspensão celular (sem estímulo), e o segundo poço com meio IMDM, suspensão celular e G-CSF (estímulo), realizado em triplicata. Em seguida, as placas de cultivo foram colocadas em estufa a 37° C com 5% CO<sub>2</sub>.

Cerca de 72h após o plaqueamento, foi realizada a primeira troca de meio de cultivo, desprezando-se as células que não aderiram a superfície plástica das placas de cultura. Essa troca foi feita continuamente a cada 3 dias até completar um período de 15 dias de cultura primária (P0). Antes de cada troca de meio, as placas de cultivos foram levadas ao microscópio invertido (*NIKON, modelo Eclipse TS100*) para observação da população celular e registro através da câmera fotográfica (*MOTIC, modelo moticam 2300*) acoplada ao microscópio. Após cada troca de meio, uma alíquota de 1mL do sobrenadante de cada poço foi separada em tubos criogênicos estéreis e congeladas em freezer -80°C, para posterior dosagem de citocinas. As CT mesenquimais têm grande capacidade de aderência à superfície de crescimento da placa de cultivo, desta forma, as células das linhagens hematopoiéticas e progenitoras foram descartadas por aspiração do sobrenadante das placas de cultivo.

#### **4.8 Dissociação enzimática das células-tronco mesenquimais**

A dissociação enzimática, também conhecida por “tripsinização”, tem por objetivo recuperar as células que estiverem aderidas às paredes de crescimento da placa de cultivo. A técnica consiste na utilização de uma enzima tripsina, a qual lisa o citoesqueleto que fornece sustentação às células para se aderirem à superfície plástica das placas.

Esse processo se dá pela retirada do meio de cultura utilizado e lavagem das placas de cultivo, duas vezes, com 3mL de PBS. Posteriormente será retirado o PBS e adicionado 2mL de solução de tripsina 0,2%. A placa será incubada durante cinco minutos, no máximo, na estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C e depois agitadas para as células da superfície de crescimento das placas soltarem completamente. Logo após, foi adicionado meio DMEM suplementado com 15% de Soro Bovino Fetal (SBF) para que seja bloqueada a ação da tripsina (BROFMAN et al; 2004). Após a quinta passagem, as células foram coletadas e caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo.

#### 4.9 Dosagem de citocinas do sobrenadante da cultura celular

Para a dosagem de citocinas as amostras de sobrenadante foram descongeladas e homogeneizadas. A dosagem foi realizada pela técnica de Citometria de Fluxo CBA (*Cytometric Bead Array System*) com o Kit BD<sup>TM</sup> Mouse T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2/T<sub>H</sub>17 Cytokine (DB<sup>®</sup> Biosciences, San Diego, CA, USA), seguindo as orientações descritas pelo fabricante. Através desse kit foram quantificadas as citocinas: IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-17.

Esse método consiste na utilização de uma série de partículas (microesferas ou *beads*) de tamanho conhecido e com intensidade de fluorescência distinta para detectar simultaneamente através de uma superfície de captura as várias citocinas solúveis. Cada *bead* de captura está conjugada com um anticorpo específico para cada citocina. A detecção das citocinas presentes na amostra é realizada através do fluorocromo ficoeritrina (PE)-conjugado a anticorpos que fornece um sinal fluorescente em proporção a quantidade de citocina da amostra ligada a *bead*. Os complexos formados de *bead* de captura com a citocina da amostra e o reagente de detecção foram mensurados através da citometria de fluxo. A intensidade da fluorescência PE de cada complexo revela a concentração em pg/mL de cada citocina. Para a aquisição das amostras foi utilizado o citômetro de fluxo *FACSCanto II* (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, USA) do Instituto Leônidas e Maria Deane (ILMD) – Fiocruz Amazônia.

Para o cálculo das concentrações e intensidade média de fluorescência de cada citocina foi utilizado o software *FCAP array<sup>TM</sup>* (v3.0.1).

#### 4.10 Análise estatística

A análise estatística dos resultados das variáveis (quantificação de células e concentração de citocinas por tempo de cultura) foram realizadas utilizando o software *GraphPadPrism<sup>®</sup> 5.0* (San Diego, CA, USA).

Para estas análises foram utilizados o teste de análise de variância *ANOVA One-way*, com pós-teste para a análise das correlações de comparação múltipla *Tukey's*. Foi utilizado intervalo de confiança de 95% e os dados considerados com significância estatística foram aqueles que apresentaram p valor < 0,05.

---

*Resultados*

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Efeitos da administração do G-CSF e/ou AMD3100

O primeiro passo neste estudo foi avaliar a influência do G-CSF e/ou AMD3100 na obtenção de CTH e CTM, nos diferentes compartimentos, medula óssea e sangue periférico. O número de CTH e CTM foi determinado 60 minutos após a administração de PBS, G-CSF ou AMD3100 em camundongos pré-tratados durante 04 dias com PBS ou G-CSF.

No compartimento medular, como demonstra a **Figura 06**, nos animais tratados diariamente com PBS durante 04 dias e 24 horas após administrado uma 5ª dose de AMD3100, a quantidade de CTH é elevada, com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0006$ ), quando comparado com os animais que receberam as mesmas 04 doses de PBS mais uma 5ª dose de PBS (grupo controle) ou de G-CSF. O mesmo efeito foi encontrado no grupo dos animais tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias e 24 horas após administrado PBS, com aumento expressivo e de forma significativa do número de CTH, quando comparado com os animais que receberam as mesmas 04 doses de G-CSF mais uma 5ª dose de AMD3100 ou aos grupos tratados apenas com PBS. Por outro lado, quando avaliou-se o número de CTM na medula óssea, observou-se que não houve diferença estatística significativa entre os grupos estudados ( $p=0,1522$ ).

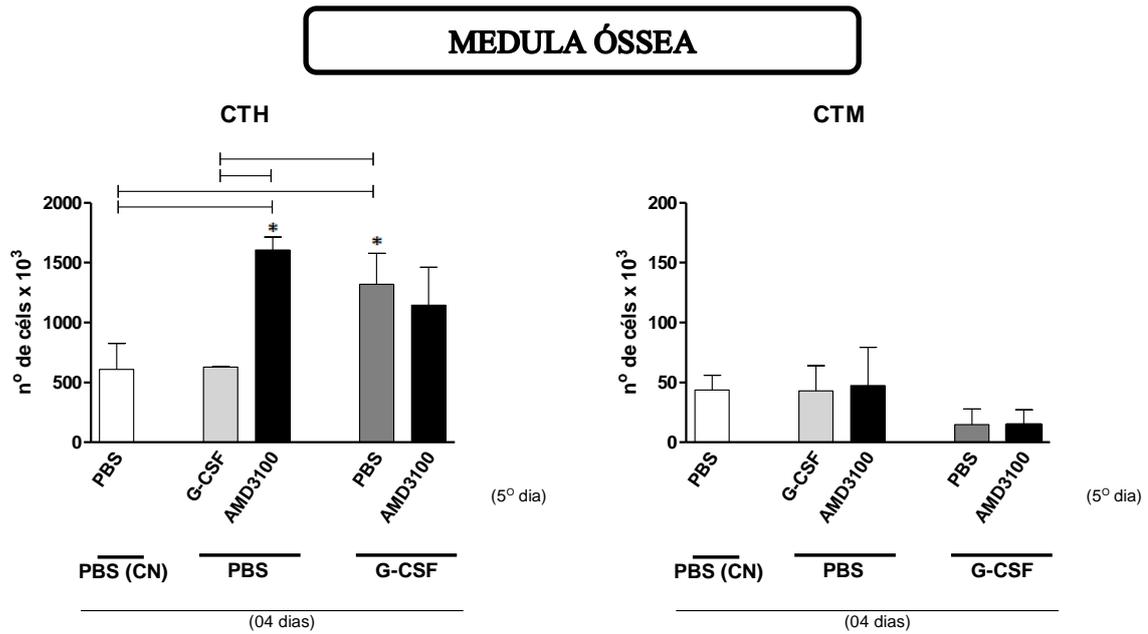
No sangue periférico, pode-se observar como demonstrado na **Figura 07**, que os animais tratados diariamente com PBS durante 04 dias e 24 horas após administrado uma 5ª dose de AMD3100, apresentaram uma alta mobilização de CTH para o sangue periférico. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,0002$ ), quando comparado com os animais que receberam as mesmas 04 doses de PBS mais uma 5ª dose de PBS (grupo controle) ou de G-CSF. Nos animais tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias e 24 horas após administrado uma 5ª dose de PBS ou AMD3100, também percebe-se um aumento significativo no número de CTH circulantes, quando comparado com os grupos de animais que receberam administrações diárias de PBS mais uma 5ª dose de PBS (grupo controle) ou de G-CSF.

A associação do tratamento diário dos animais com G-CSF durante 04 dias e estimulados 24 horas após com uma 5ª dose de AMD3100 parece aumentar o número de CTH no sangue periférico, porém não houve diferença estatística significativa quando comparado ao grupo que recebeu o mesmo tratamento com G-CSF mais uma 5ª dose de PBS, ou ao grupo

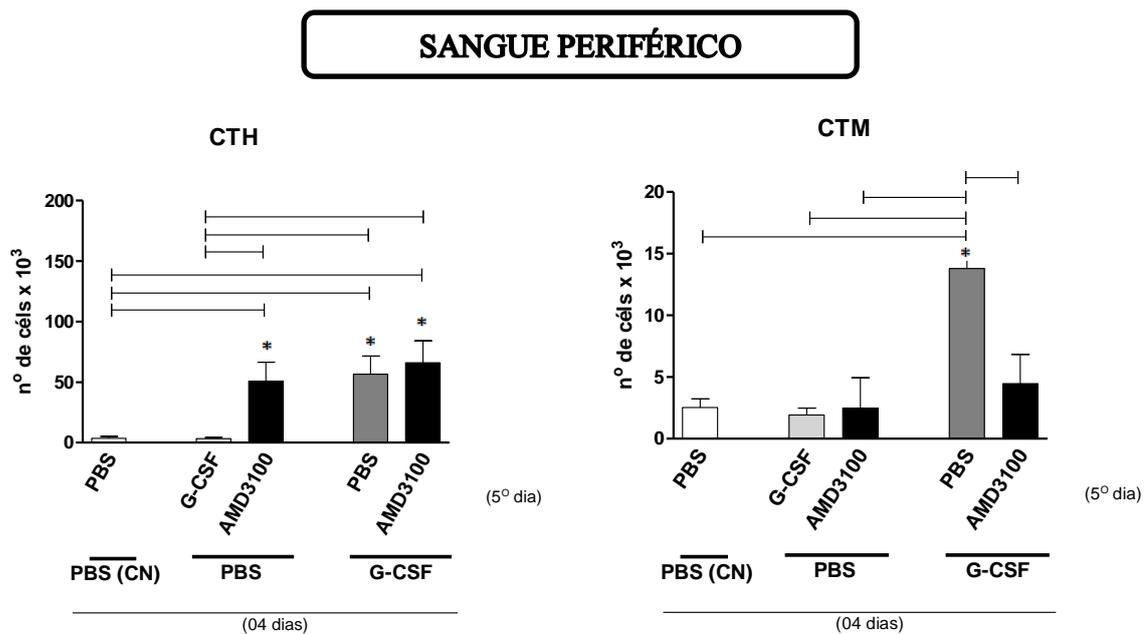
---

dos animais tratados diariamente com PBS e estimulados 24 horas após com uma 5ª dose de AMD3100.

Em relação às CTM, pode-se observar (**Figura 07**) que os animais tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias e 24 horas após administrado uma 5ª dose de PBS, acontece uma mobilização estatisticamente significativa ( $p < 0,0001$ ) dessas células para o sangue periférico, quando comparado a todos os demais grupos estudados.



**Figura 06.** Protocolo experimental: os camundongos foram tratados com PBS (Controle Negativo – CN) ou G-CSF diariamente por 4 dias. 24 horas após a última injeção, foi administrado nos camundongos PBS, G-CSF ou AMD3100. 60 minutos após foi coletado o fêmur esquerdo dos animais para análise das células por citometria de fluxo. n=9 camundongos por grupo em triplicata. Para esta análise, foi utilizado o teste de análise de variância *ANOVA One-way*, com pós-teste de comparação múltipla de *Tukey's*. Os dados foram considerados significativos  $p < 0.05$ , representado “—” (CTH \* $p=0,0006$ ; CTM  $p=0,1522$ ).



**Figura 07.** Protocolo experimental: os camundongos foram tratados com PBS (Controle Negativo – CN) ou G-CSF diariamente por 4 dias. 24 horas após a última injeção, foi administrado nos camundongos PBS, G-CSF ou AMD3100. 60 minutos após foi coletado sangue periférico através do plexo ocular dos animais para análise das células por citometria de fluxo. n=9 camundongos por grupo em triplicata. Para esta análise, foi utilizando o teste de análise de variância *ANOVA One-way*, com pós-teste de comparação múltipla de *Tukey's*. Os dados foram considerados significativos  $p < 0.05$ , representado “—” (CTH \* $p=0,0002$ ; CTM \* $p<0,0001$ ).

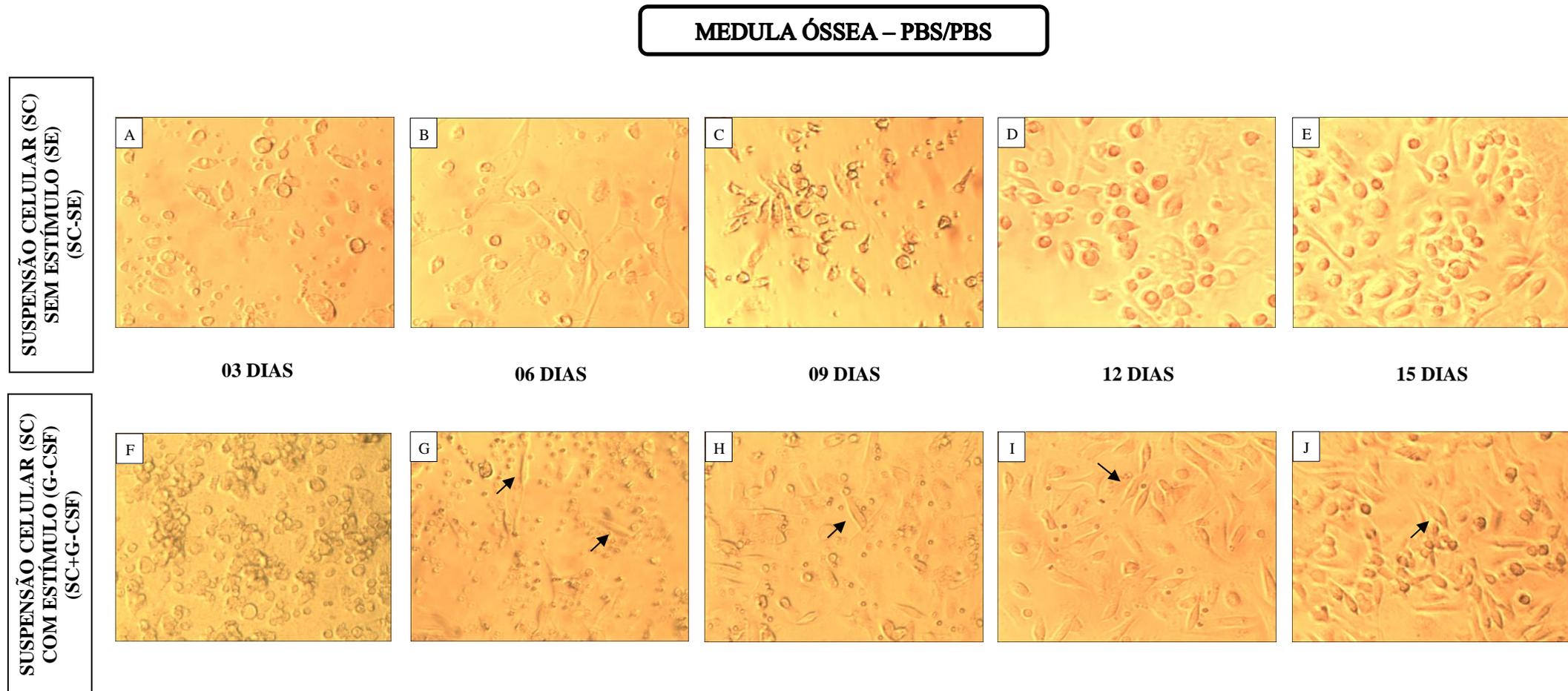
## 5.2 Fotomicroscopia de culturas *in vitro* de células-tronco de medula óssea e sangue periférico

Após a obtenção de diferentes subpopulações de CT por meio de agentes mobilizadores, as células isoladas foram colocadas em cultura para análise do efeito que esses agentes exercem na expansão, diferenciação e perfil de citocinas produzidas e secretadas no meio de cultivo.

Nas culturas primárias (P0) de medula óssea, foi observado uma população heterogênea de CT no início do período de cultivo (3º dia) (**Figuras 8A, 9A, 10A, 11A e 12A**), independente do estímulo (G-CSF) *in vitro*. Entretanto, a partir do 6º dia de cultura, já pode-se observar células com morfologia fibroblastóide (fusiforme), nas culturas que foram estimuladas *in vitro* com G-CSF (**Figuras 8G, 9G, 11G e 12G**).

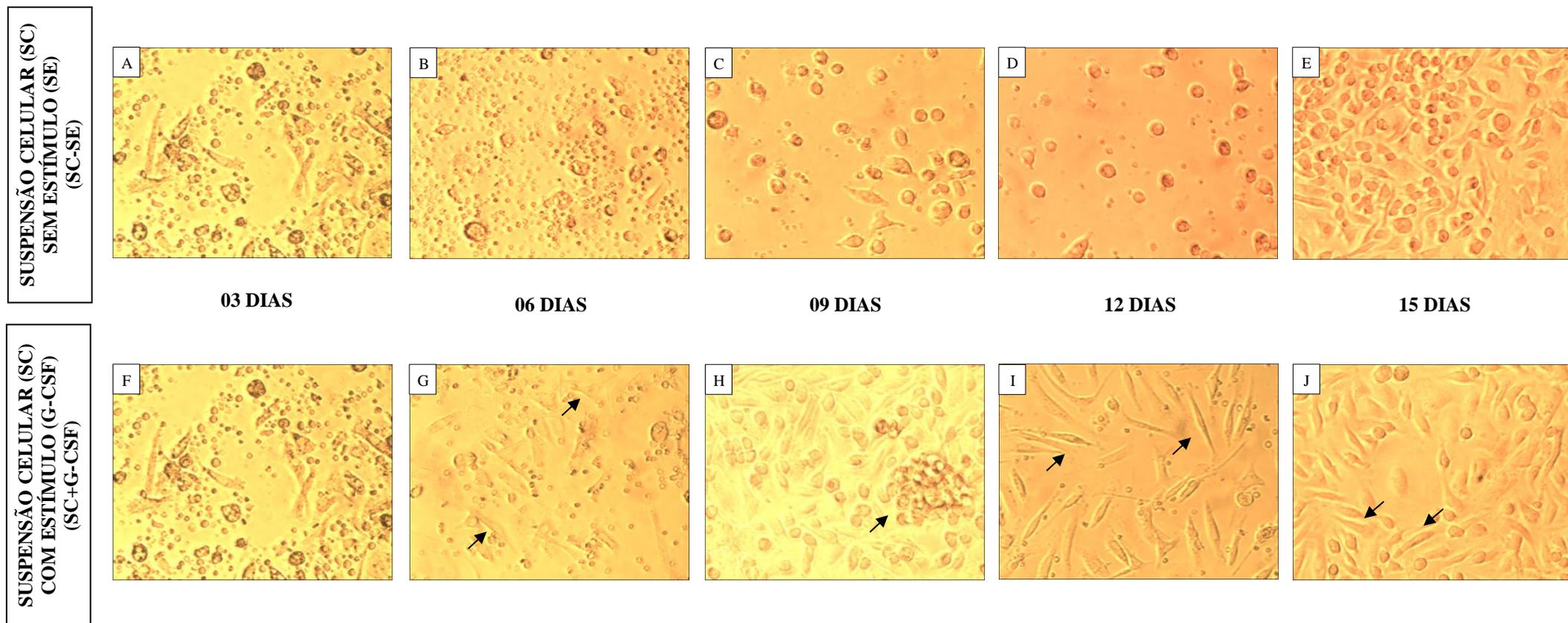
Essas populações celulares se tornam mais homogêneas a partir do 9º dia de cultivo, apresentando morfologia fibroblastóide (fusiforme) alongadas e aderentes (**Figuras 8G, 9G, 10G, 11G e 12G**), progressivamente e de forma mais expressiva, até o 15º dia de cultivo, nas culturas de células que foram estimuladas com G-CSF. Ainda pode-se observar que, nas células cultivadas e estimuladas com G-CSF, existe a formação de pequenas colônias (agregados celulares) (**Figura 9H**).

Nas culturas primárias (P0) de sangue periférico, a presença de células com morfologia fibroblastóide (fusiforme) alongadas foi observada a partir do 6º dia, apenas nas cultura de células estimuladas *in vitro* com G-CSF (**Figuras 13G, 14G e 17G**), de forma progressiva até o último dia de cultivo (15º dia). Também foi observado a formação de colônias celulares (**Figura 13J**). Nas culturas que não receberam G-CSF como estímulo em cada troca de meio, foi observado uma maior frequência destas células de morfologia fibroblastóide a partir do 9º até o 15º dia de cultivo (**Figuras 13, 14, 16 e 17**).



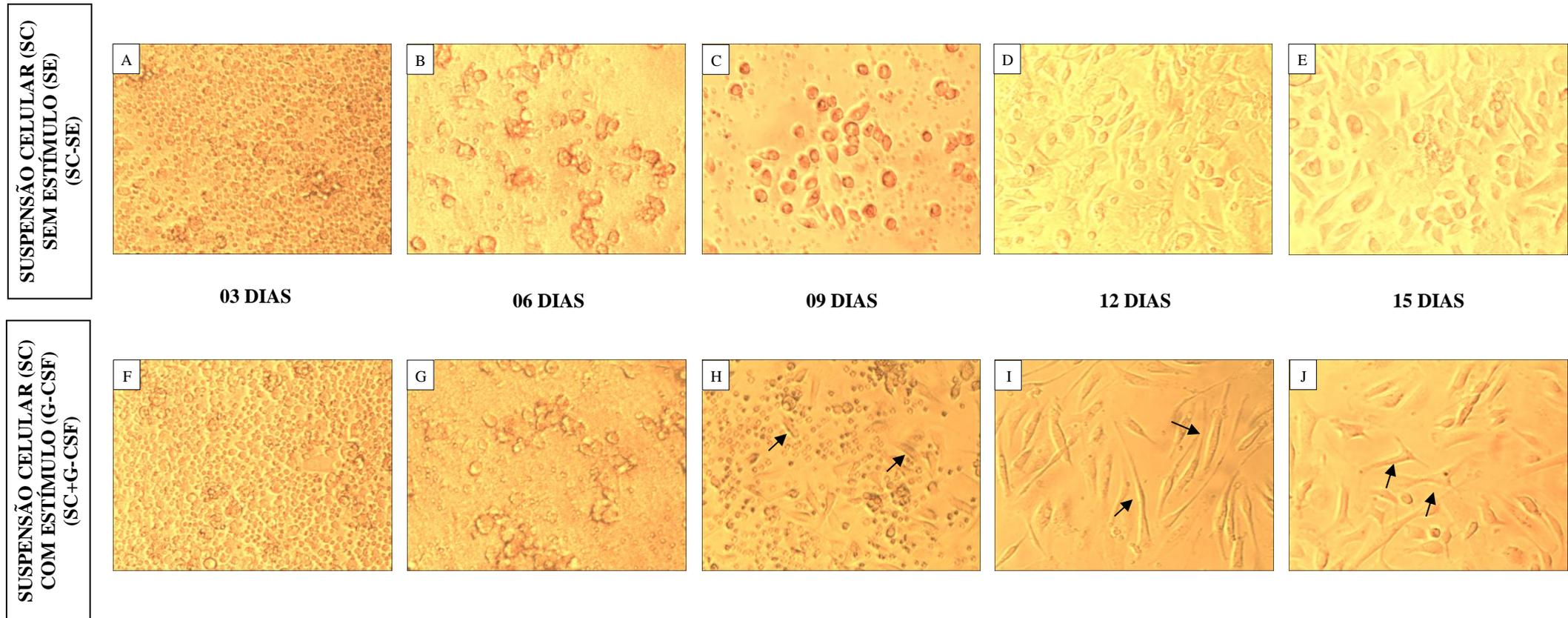
**Figura 08.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado PBS, 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido. Seta indica a presença de células com morfologia fibroblastóide no 6º(G), 9º(H), 12º(I) e 15º(J) dia de cultivo.

## MEDULA ÓSSEA – PBS/G-CSF



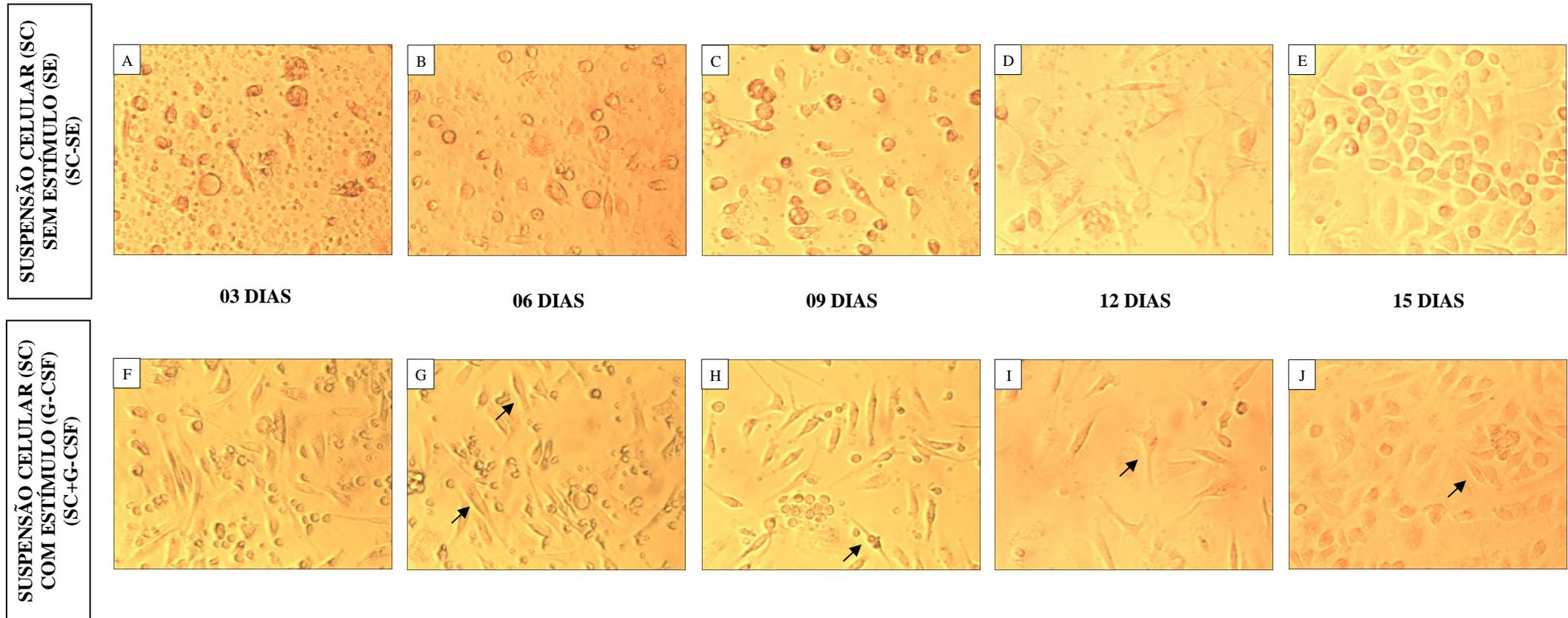
**Figura 09.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado G-CSF, 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido. Seta indica a presença de células com morfologia fibroblastóide no 6º(G), 9º(H), 12º(I) e 15º(J) dia de cultivo, e formação de colônias no 9º(H) dia cultivo.

## MEDULA ÓSSEA – PBS/AMD3100



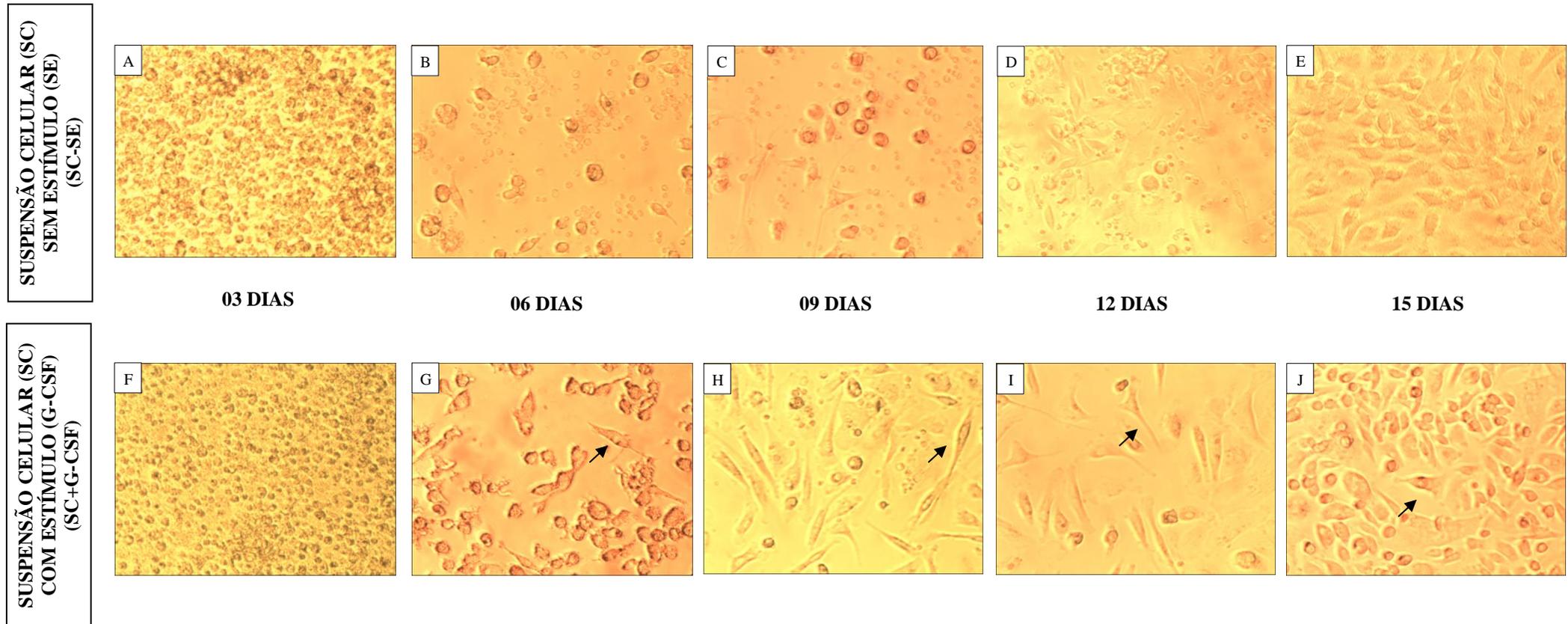
**Figura 10.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado AMD3100, 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido. Seta indica a presença de células com morfologia fibroblastóide a parti do 9º(H), 12º(I) e 15º(J) dia de cultivo.

## MEDULA ÓSSEA – G-CSF/PBS

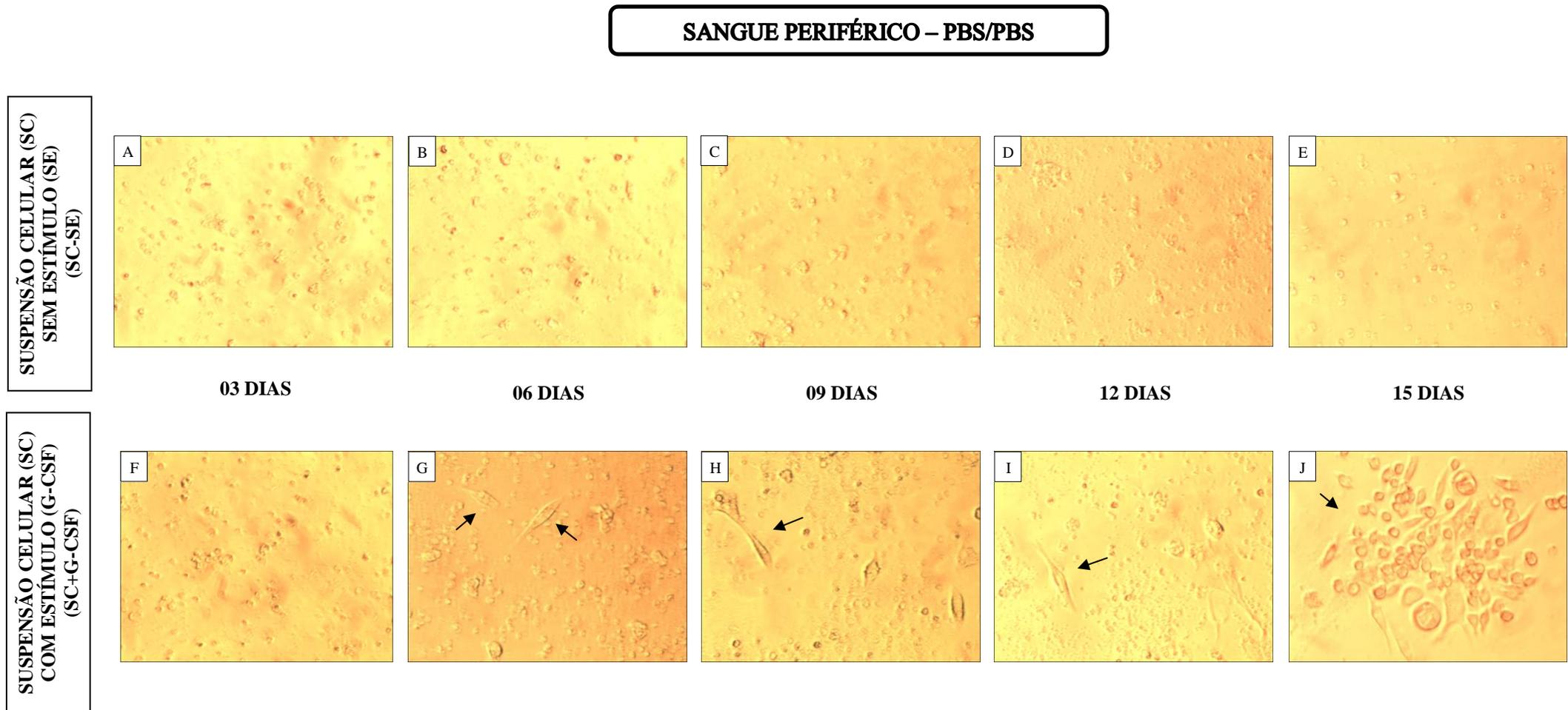


**Figura 11.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado PBS. 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido. Seta indica a presença de células com morfologia fibroblastóide a parti do 6º(G), 9º(H), 12º(I) e 15º(J) dia de cultivo.

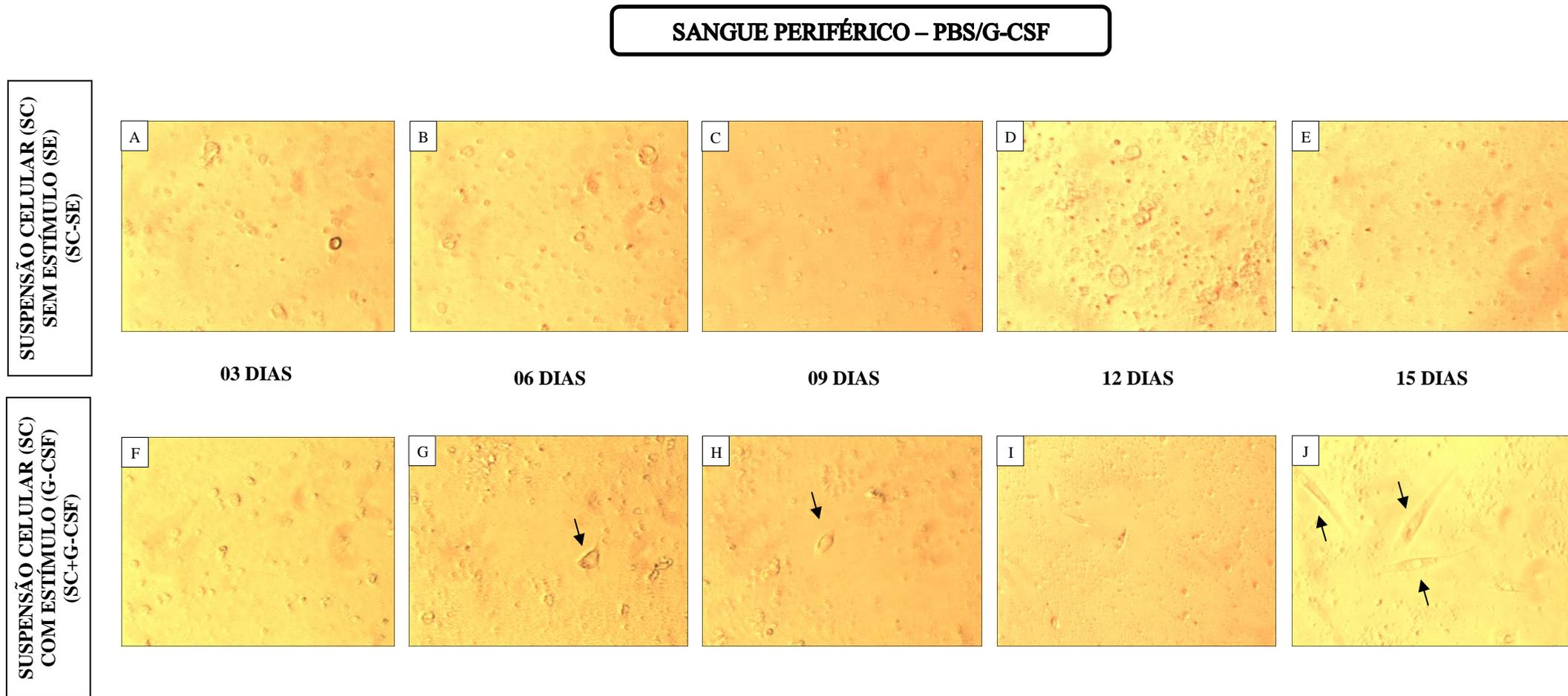
## MEDULA ÓSSEA – G-CSF/AMD3100



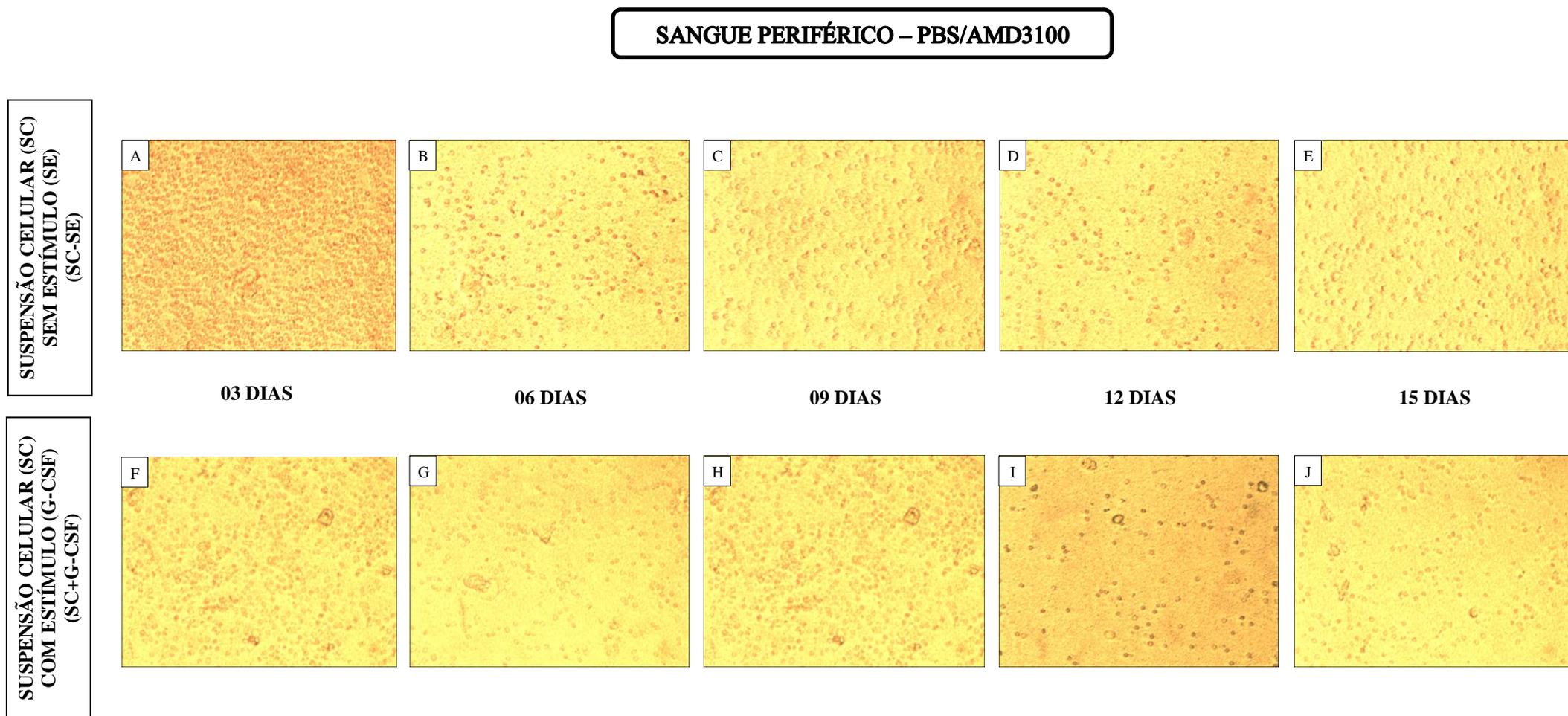
**Figura 12.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado AMD3100, 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido. Seta indica a presença de células com morfologia fibroblastóide a parti do 6º(G), 9º(H), 12º(I) e 15º(J) dia de cultivo.



**Figura 13.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado PBS, 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido. Seta indica a presença de células com morfologia fibroblastóide a parti do 6º(G), 9º(H), 12º(I) dia de cultivo e formação de colônias no 15º(J) dia de cultivo.

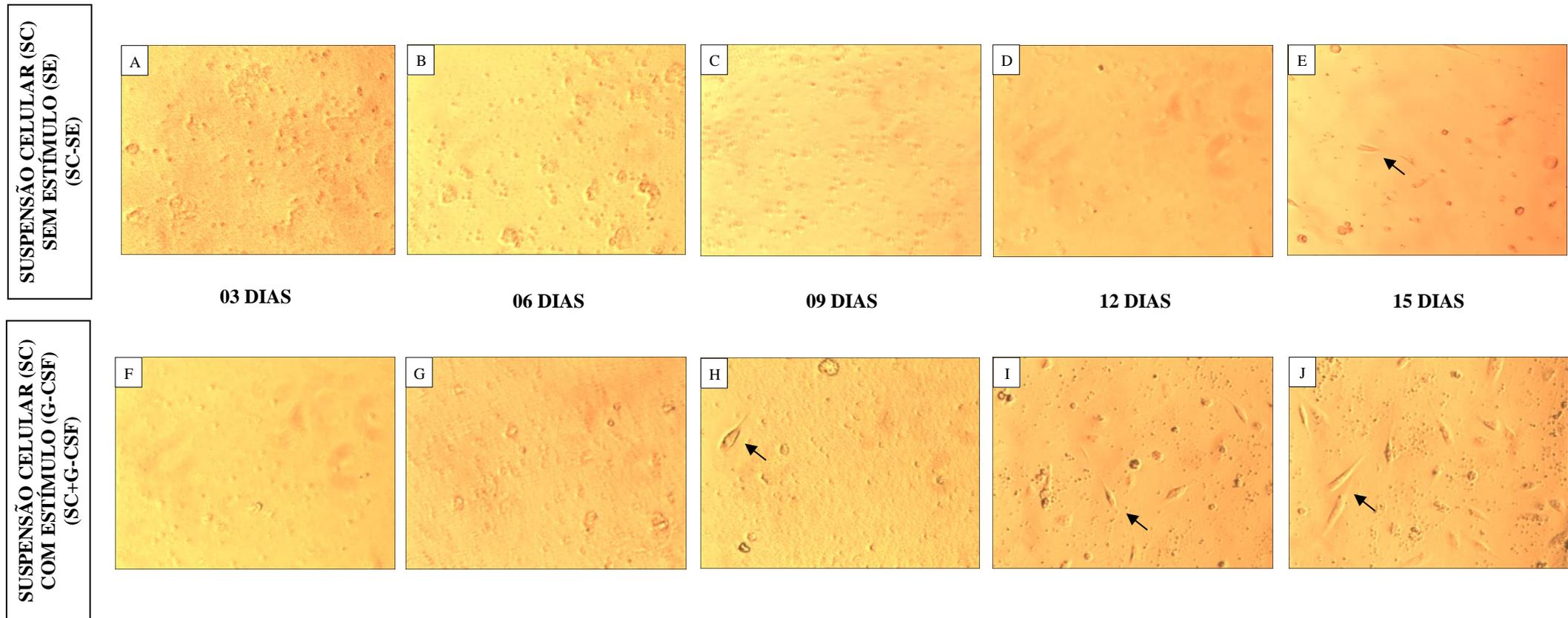


**Figura 14.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado G-CSF, 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido. Seta indica presença de células com morfologia fibroblastóide a parti do 6º(G), 9º(H) e 15º(J) dia de cultivo.

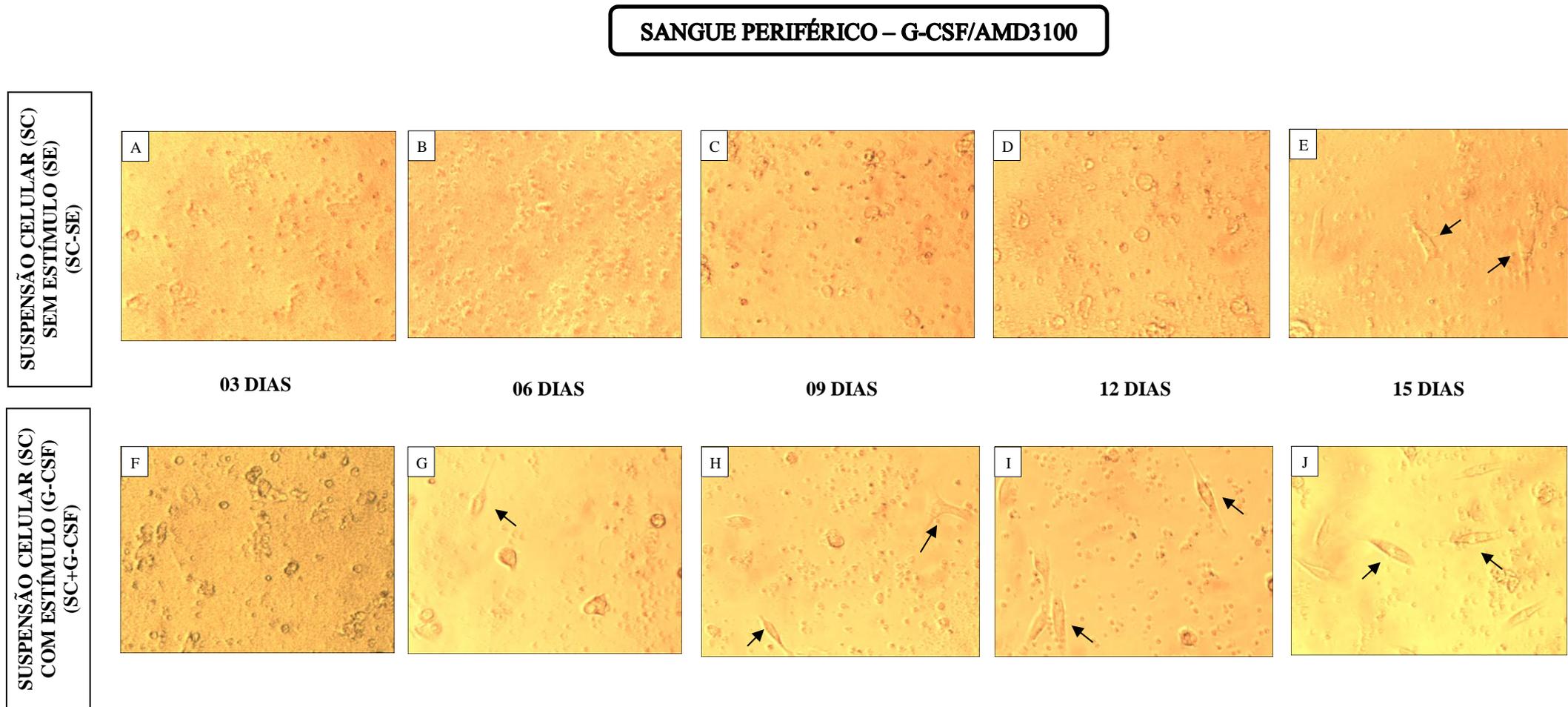


**Figura 15.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com PBS durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado AMD3100, 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido.

## SANGUE PERIFÉRICO – G-CSF/PBS



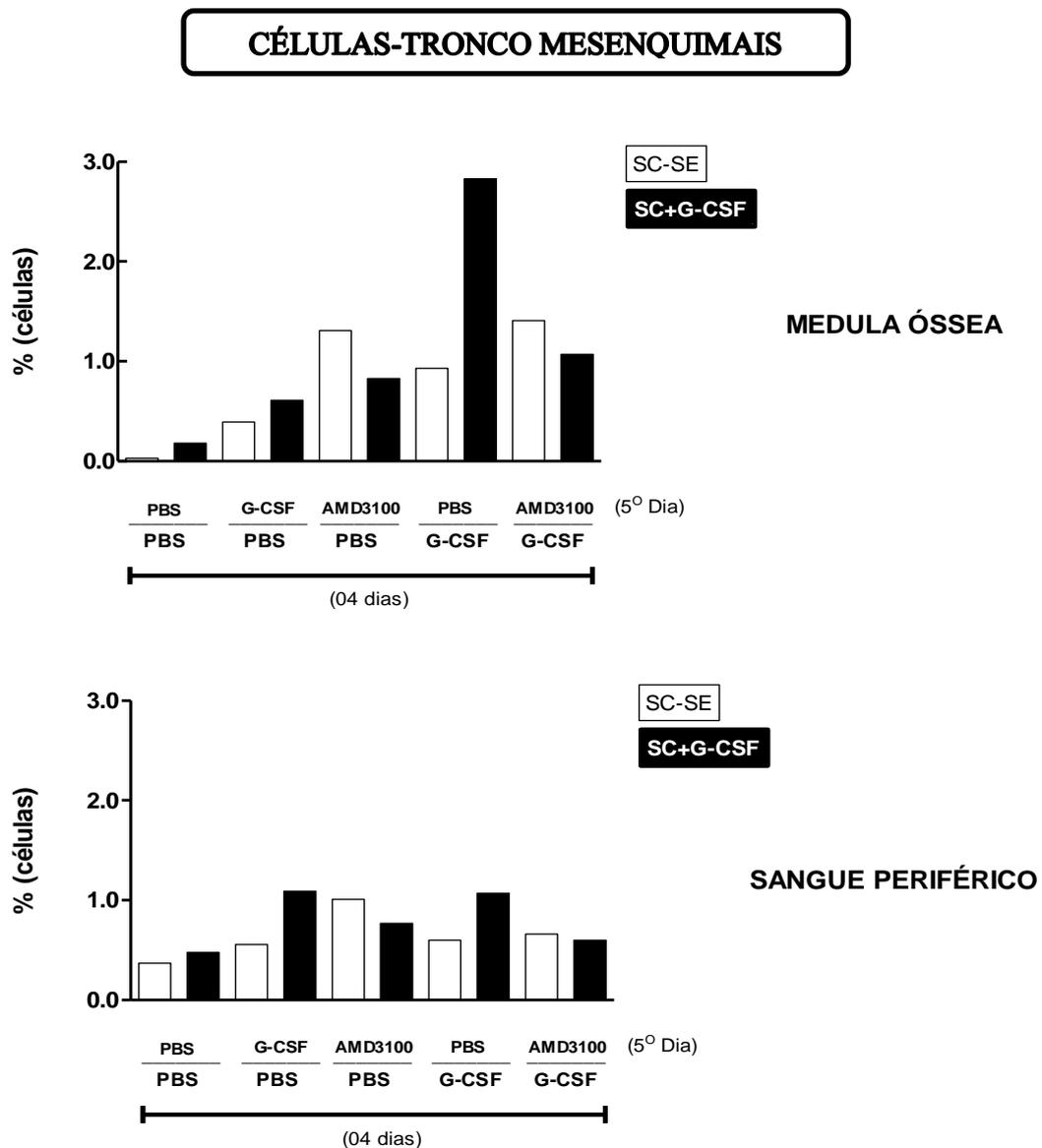
**Figura 16.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado G-CSF, 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido. Seta indica a presença de células com morfologia fibroblastóide no 15º(E) dia de cultivo e a partir do 9º(H), 12º(I) e 15º(J) dia de cultivo.



**Figura 17.** Cultura Primária (P0) de células tronco derivadas da medula óssea de camundongos tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias, e 24 horas após a última aplicação foi administrado AMD3100, 60 minutos após, as células foram cultivadas e estimuladas ou não com G-CSF (A, B, C, D e E – sem estímulo; F, G, H, I e J – estimuladas com G-CSF). Aumento 400X, MO invertido. Seta indica a presença de células com morfologia fibroblastóide no 15º(E) dia de cultivo e a partir do 6º(G), 9º(H), 12º(I) e 15º(J) dia de cultivo.

### 5.3 Caracterização das CTM

No último dia de cultivo celular (15º dia) foi realizada a dissociação enzimática, também conhecida por “tripsinização”, para recuperar as células (CTM) que estavam aderidas à superfície plástica das placas de cultura. As suspensões celulares sem estímulo (SC-SE) ou estimuladas com G-CSF (SC+G-CSF), foram coletadas dos diferentes grupos estudados, tanto da medula óssea quanto do sangue periférico, e caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo, como demonstrado na **Figura 18**.



**Figura 18.** Imunofenotipagem por citometria de fluxo (%) de CTM ( $CD14^-/CD73^+/CD90^+/CD105^+$ ) após a tripsinização no último dia de cultivo celular (15º dia). Total de 05 grupos com  $n=9$  camundongos por grupo. Foi realizado *pool* das amostras em triplicata dos mesmos grupos, tanto de medula óssea quanto de sangue periférico.

#### 5.4 Cinética de produção de citocinas pelas células-tronco durante os dias de cultura *in vitro*

Após caracterizar-se a influência exercida por agentes mobilizadores para obtenção de CTM e CTH, na medula e sangue periférico, o próximo passo foi caracterizar o perfil de citocinas produzidas por estas células *in vitro*.

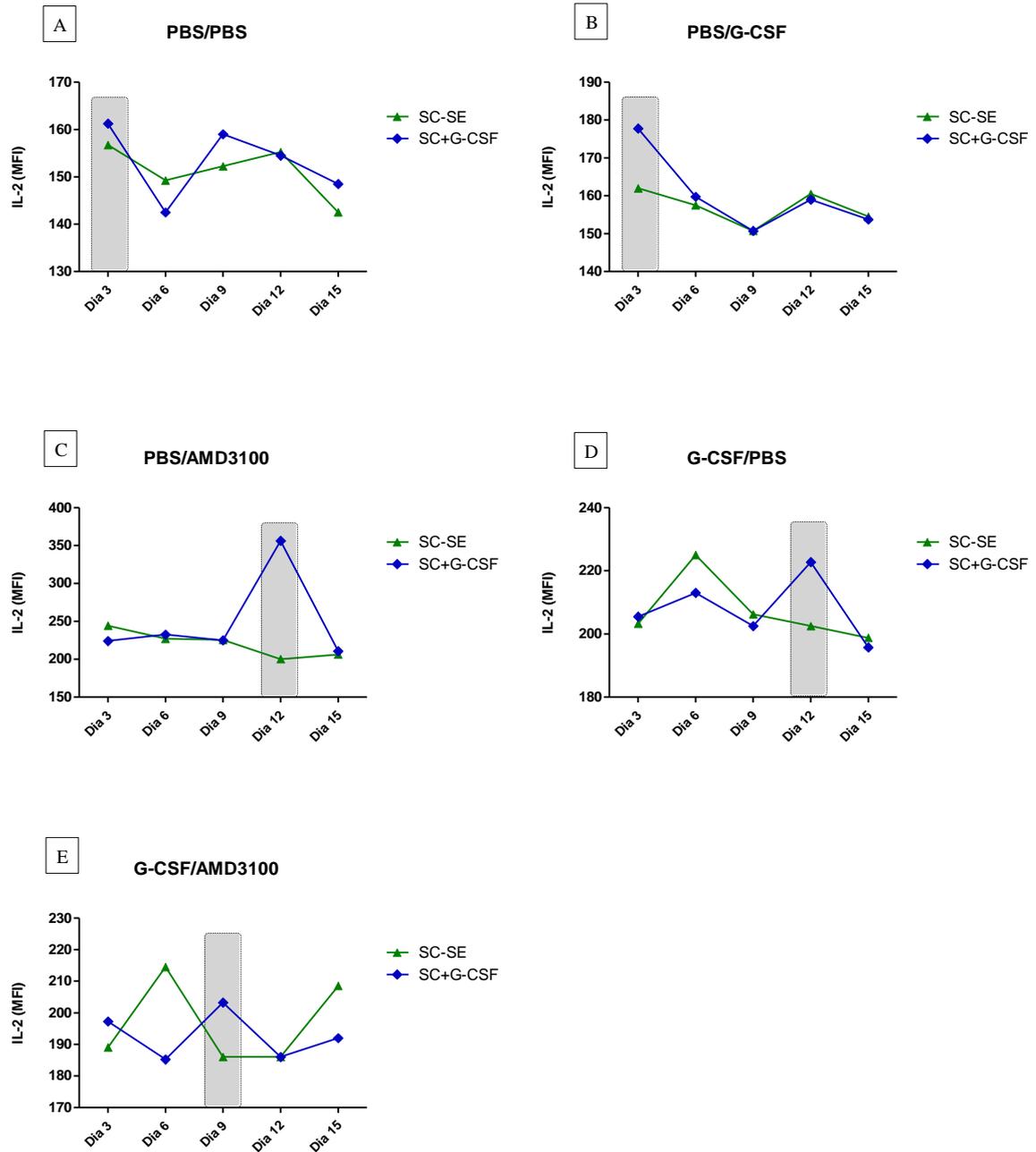
Os dados demonstram que houve um aumento de IL-2 e IL-4 entre o 9º e 12º dias de cultivo de células de medula óssea, nos grupos estimulados *in vitro* com G-CSF (**Figuras 19C, D, E e 20C, D, E**). Na cultura de células do sangue periférico, o aumento observado de IL-2 e IL-4 ocorreu entre o 3º e 9º dias (**Figuras 26C, D e 27C, D e E**) nas culturas estimuladas com G-CSF.

As **Figuras 21 e 28** demonstram que a produção de IL-6 ocorreu entre o 3º e 9º dias de cultivo, tanto nas culturas de células da medula óssea (**Figura 21A, B, C, D e E**), quanto de sangue periférico (**Figuras 28C e E**), e reduz de forma progressiva até o último dia de cultivo (15º dia). Nas culturas de medula óssea que não foram estimuladas com G-CSF, os níveis de IL-6 encontram-se aumentados em relação às culturas que receberam G-CSF como estímulo, nos dias 6º (**Figura 21C e E**) e 9º (**Figura 21A**).

A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, apresentou aumento expressivo em culturas de células de medula óssea estimuladas *in vitro* com G-CSF no 3º dia de cultivo (**Figura 22C, D e E**) e no sangue periférico (**Figura 29D e E**), reduzindo sua concentração de forma contínua até o 15º dia de cultivo (**Figura 22C, D e E**). O mesmo efeito pode ser observado nas culturas de medula óssea para as citocinas INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  respectivamente, que assim como a IL-10, apresentaram-se elevadas nas culturas de medula óssea (**Figura 23 e 24C, D e E**). No sangue periférico, observa-se uma alta concentração de TNF- $\alpha$  no 3º dia (**Figura 31D, E**), reduzindo de forma progressiva até o último dia de cultivo.

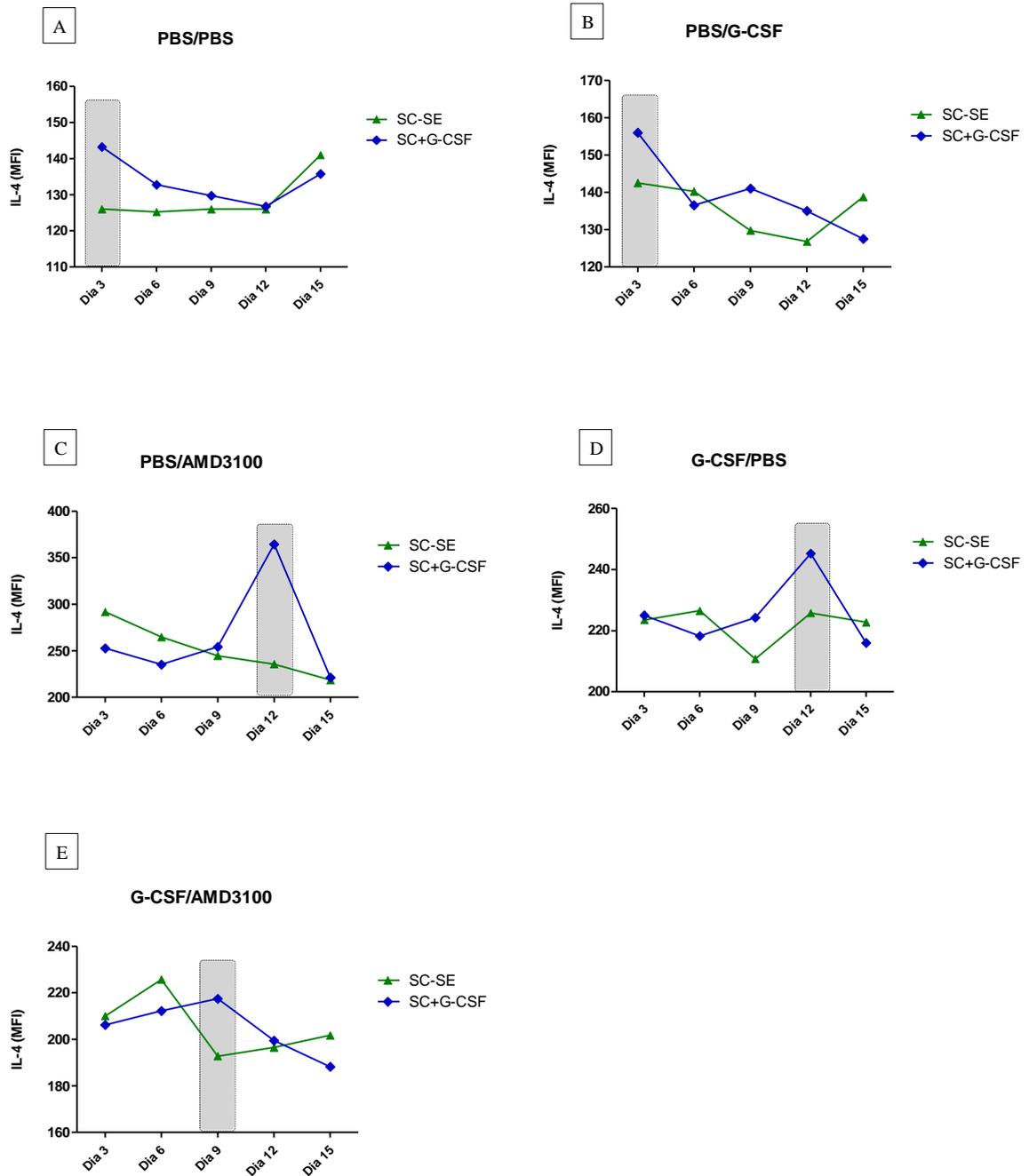
Em relação a IL-17A, observa-se um aumento no 12º dia de cultura de células de medula óssea (**Figura 25C**), mantendo-se estáveis nos diferentes dias de cultivo tanto de medula óssea quanto de sangue periférico (**Figura 32**).

## MEDULA ÓSSEA



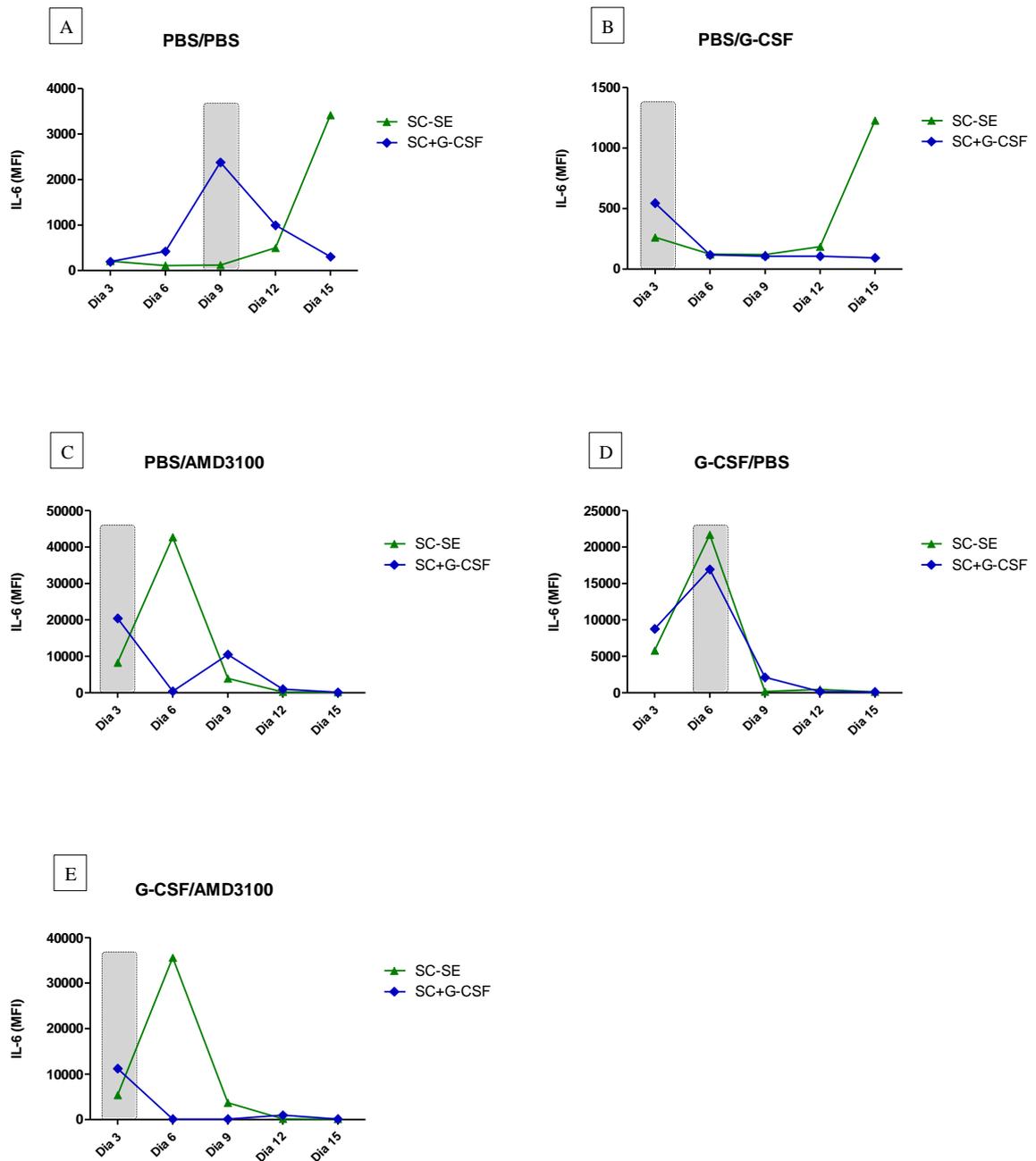
**Figura 19:** Concentração da Citocina IL-2 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de medula óssea nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-2 em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$  desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-2 nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## MEDULA ÓSSEA



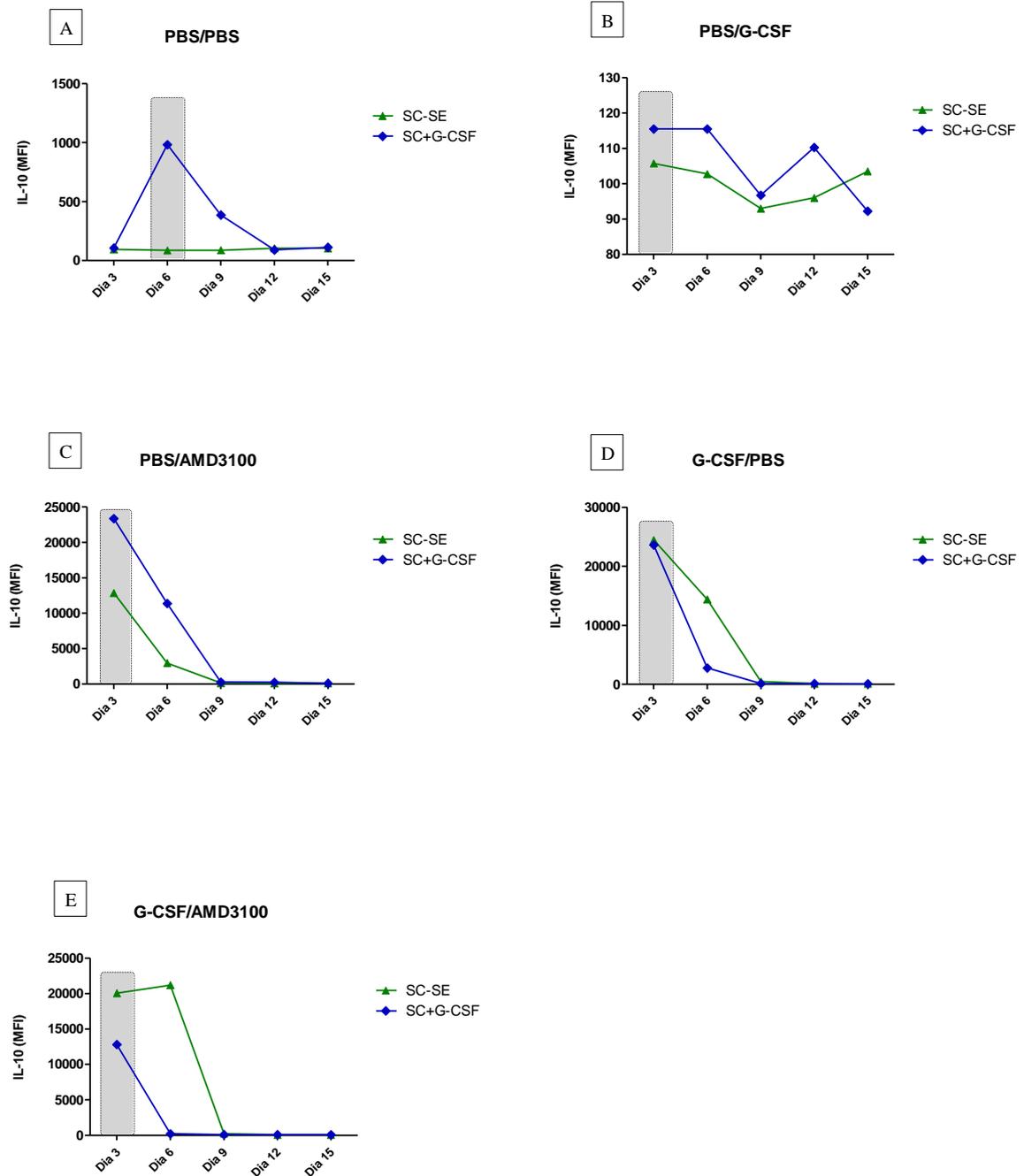
**Figura 20:** Concentração da Citocina IL-4 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de medula óssea nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE= ▲), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF= ◆), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-4 em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$  desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “■” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-4 nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## MEDULA ÓSSEA



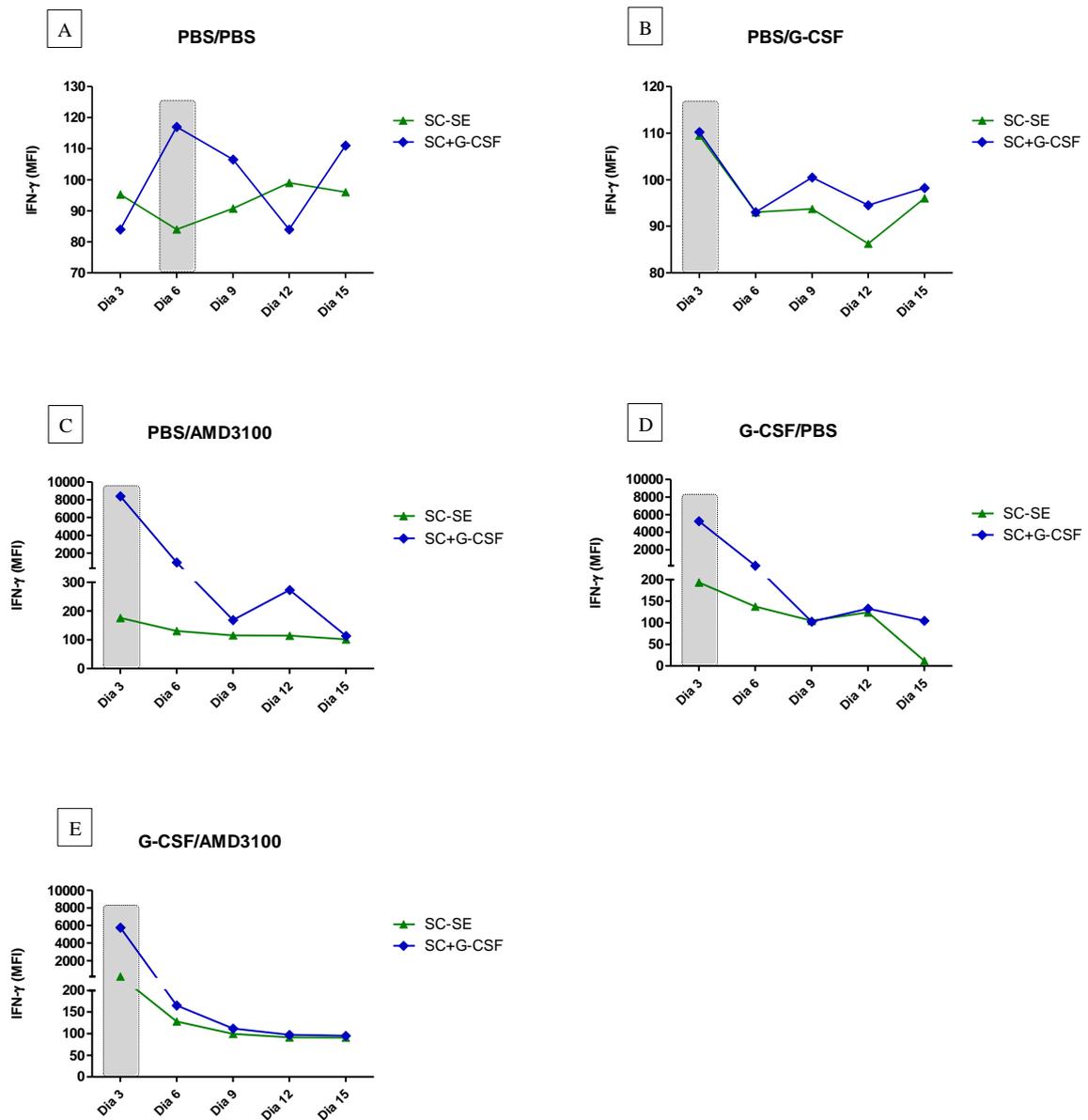
**Figura 21:** Concentração da Citocina IL-6 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de medula óssea nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE= ▲), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF= ◆), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-6 em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$  desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “■” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-6 nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## MEDULA ÓSSEA



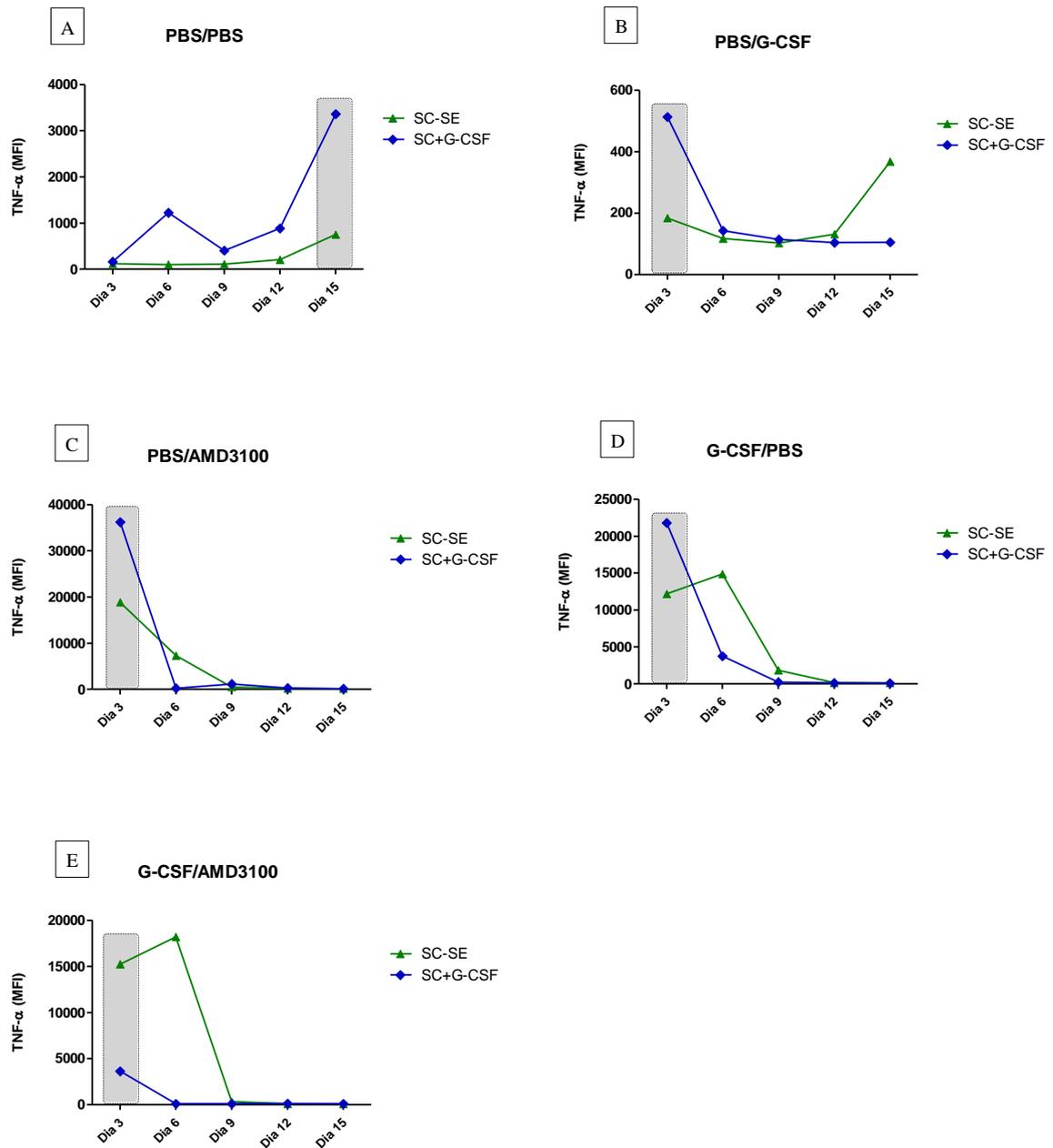
**Figura 22:** Concentração da Citocina IL-10 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de medula óssea nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-10 em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-10 nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## MEDULA ÓSSEA



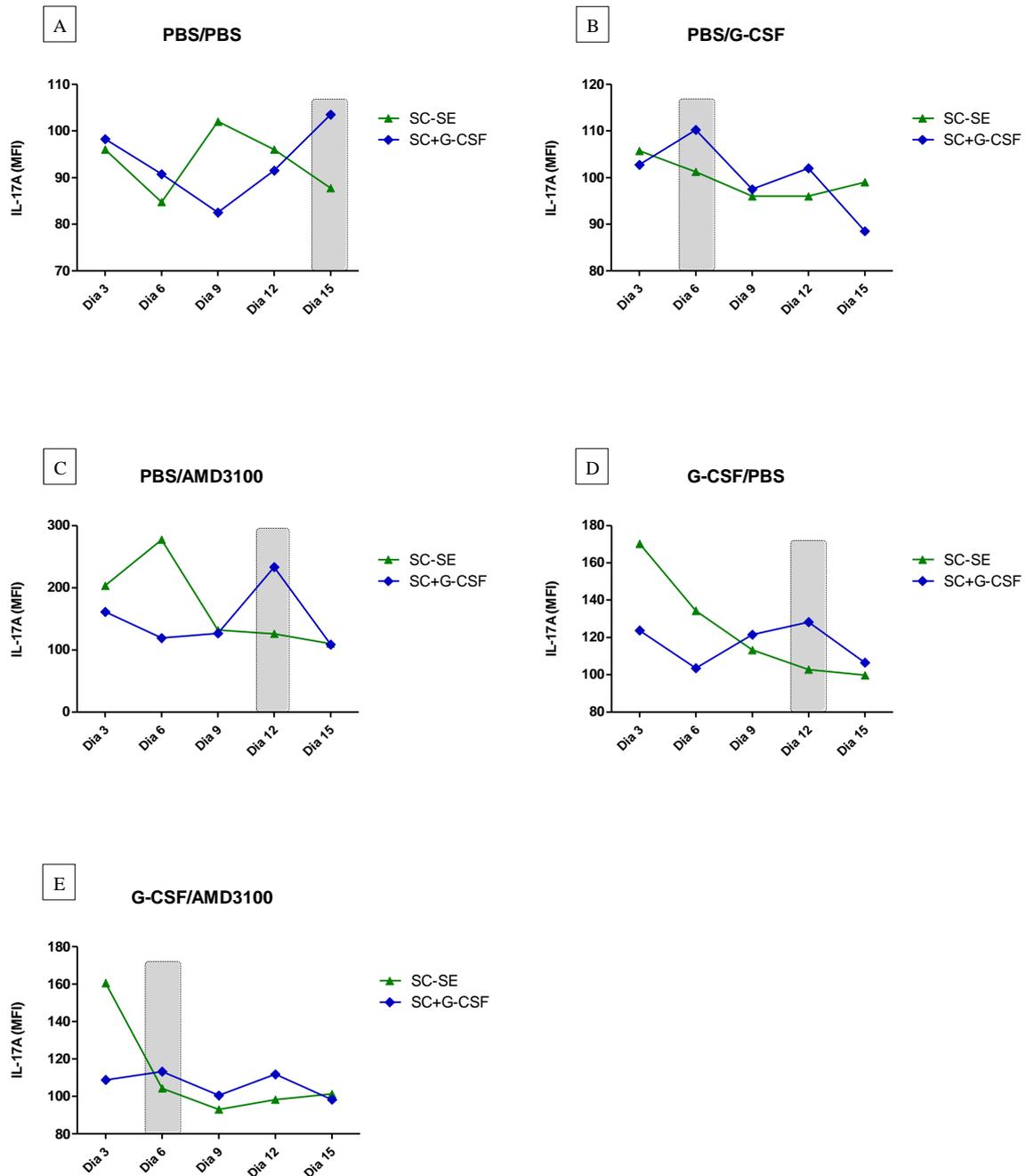
**Figura 23:** Concentração da Citocina IFN- $\gamma$  segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de medula óssea nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IFN- $\gamma$  em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IFN- $\gamma$  nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## MEDULA ÓSSEA



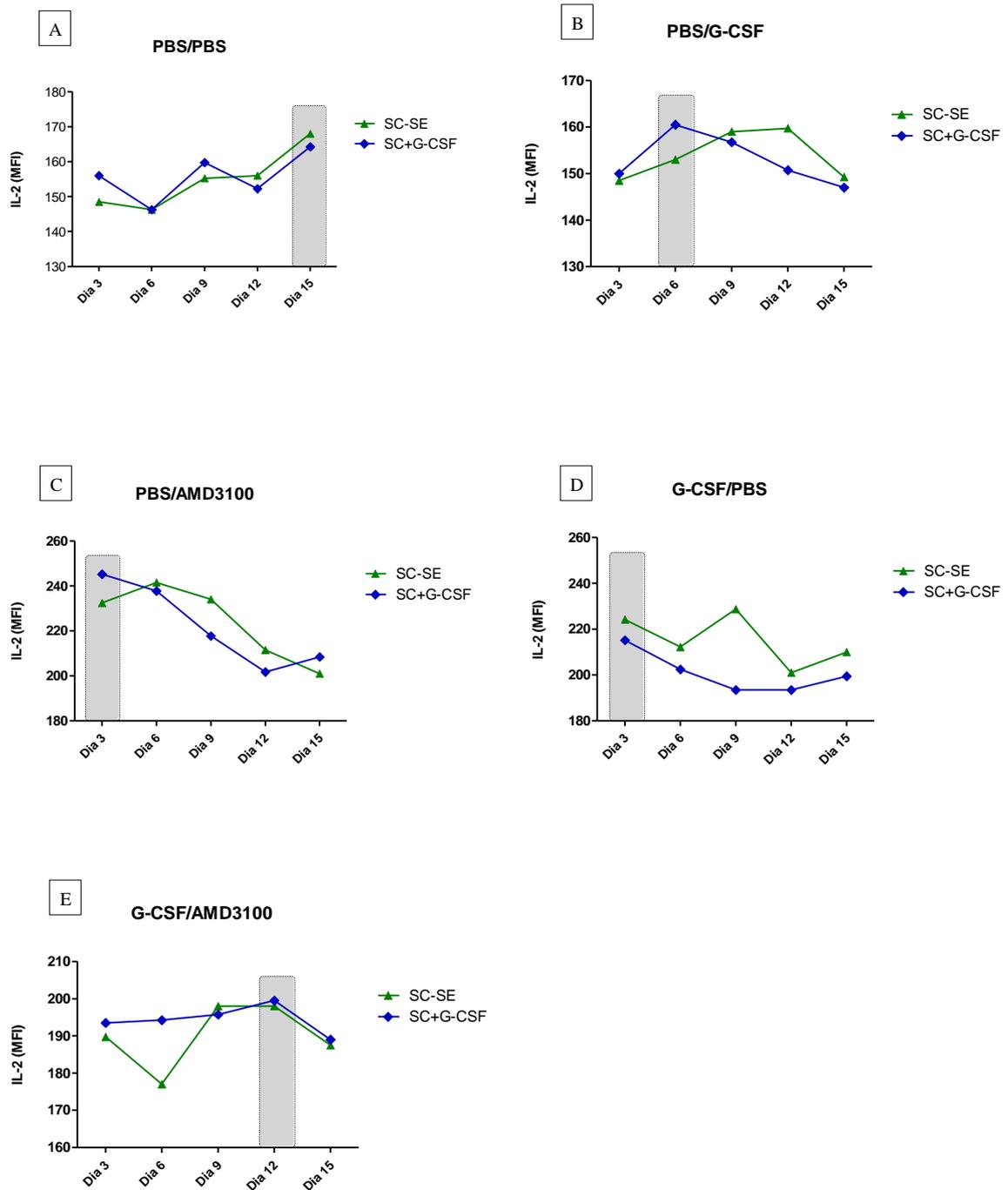
**Figura 24:** Concentração da Citocina TNF- $\alpha$  segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de medula óssea nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina TNF- $\alpha$  em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina TNF- $\alpha$  nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## MEDULA ÓSSEA



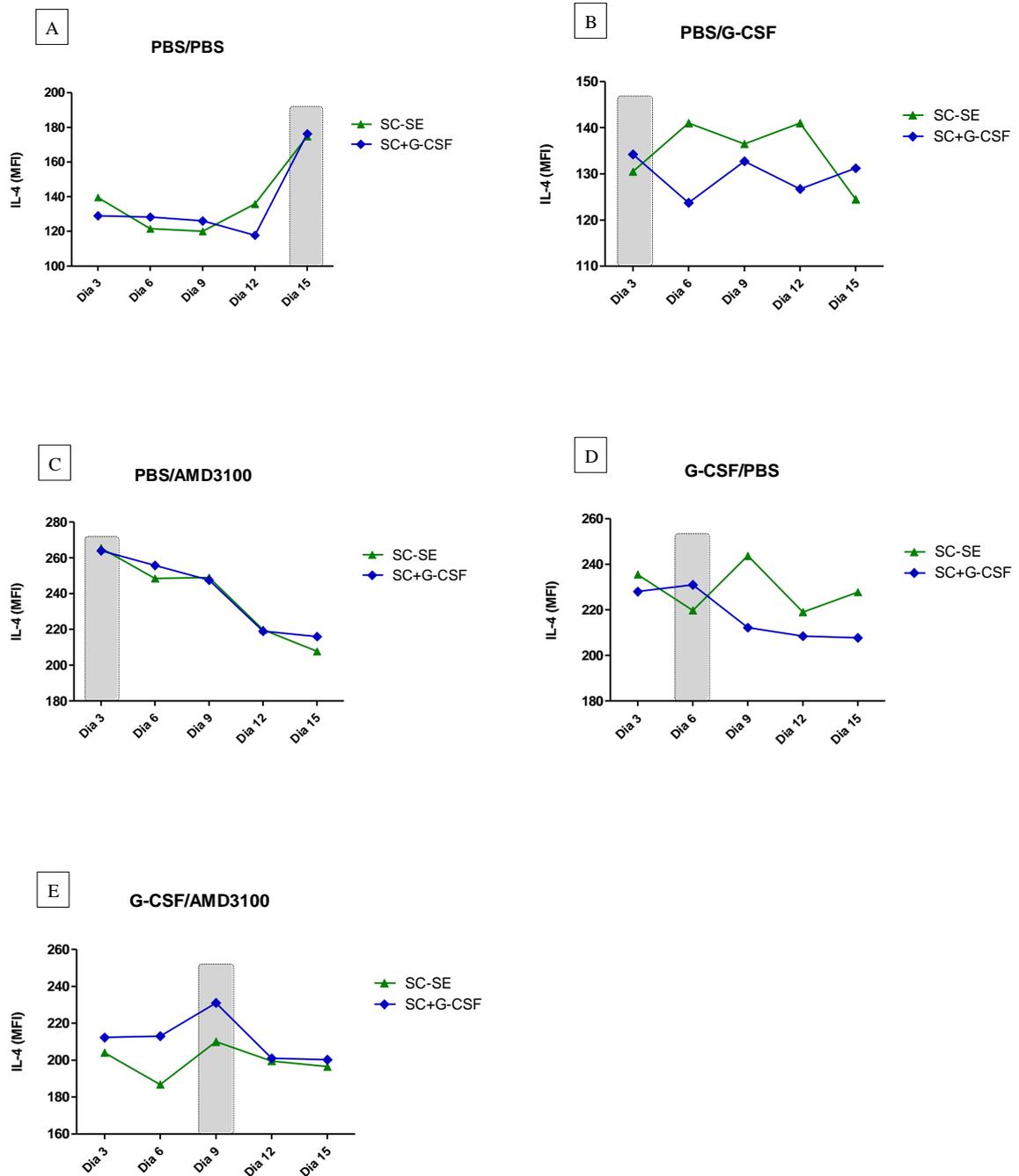
**Figura 25:** Concentração da Citocina IL-17A segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de medula óssea nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-17A em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-17A nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## SANGUE PERIFÉRICO



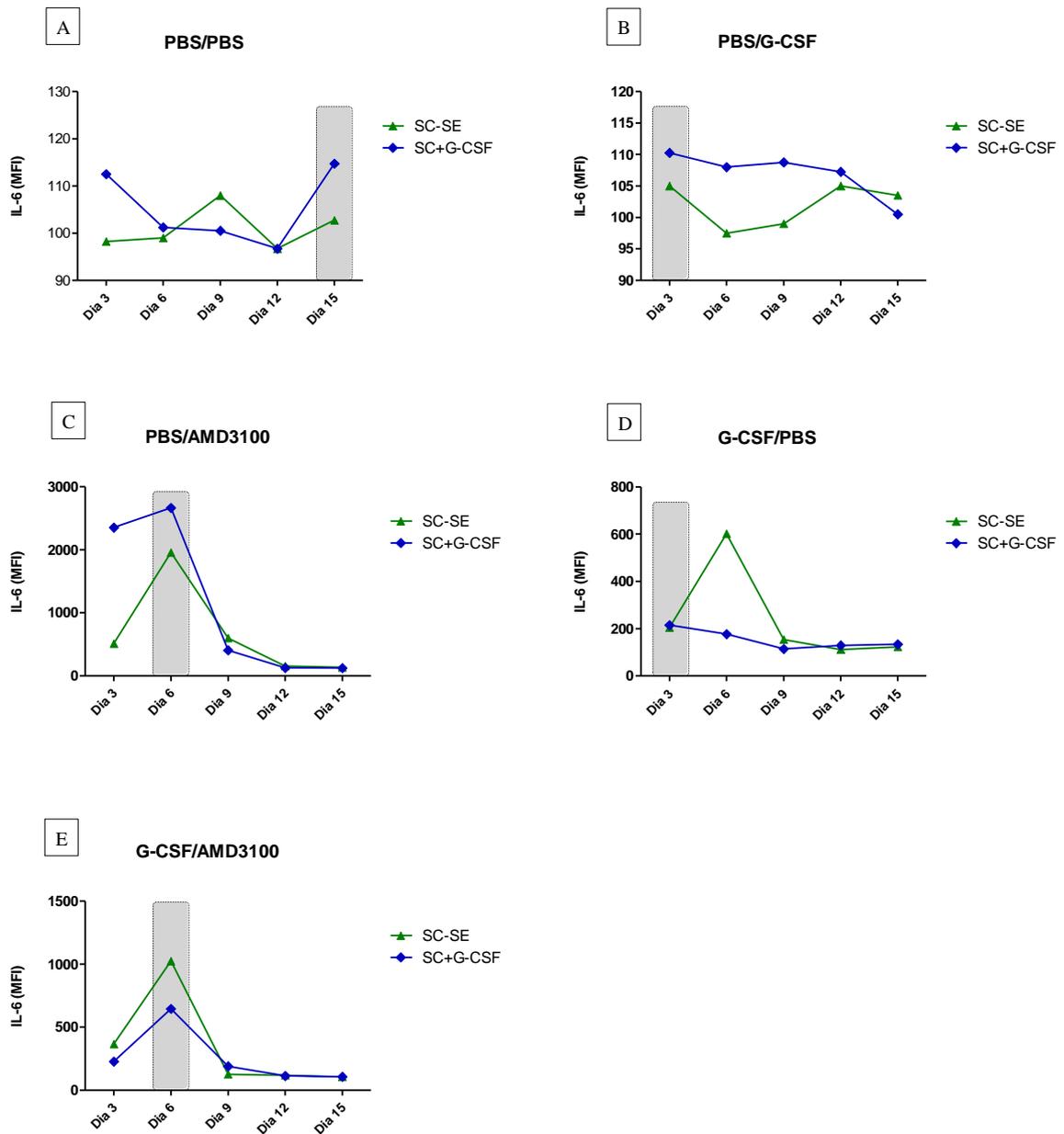
**Figura 26:** Concentração da Citocina IL-2 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de sangue periférico nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-2 em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-2 nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## SANGUE PERIFÉRICO



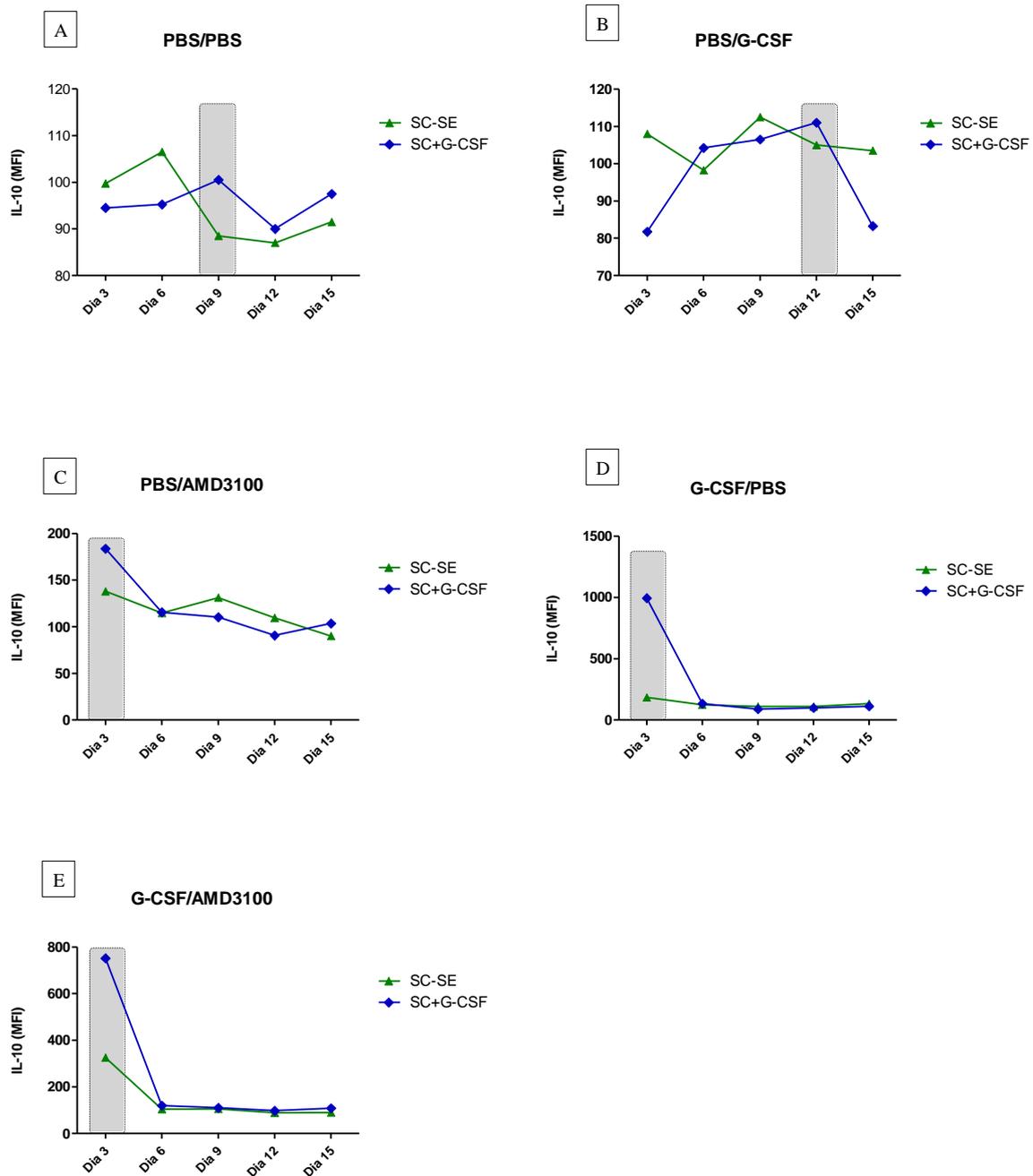
**Figura 27:** Concentração da Citocina IL-4 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de sangue periférico nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-4 em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-4 nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## SANGUE PERIFÉRICO



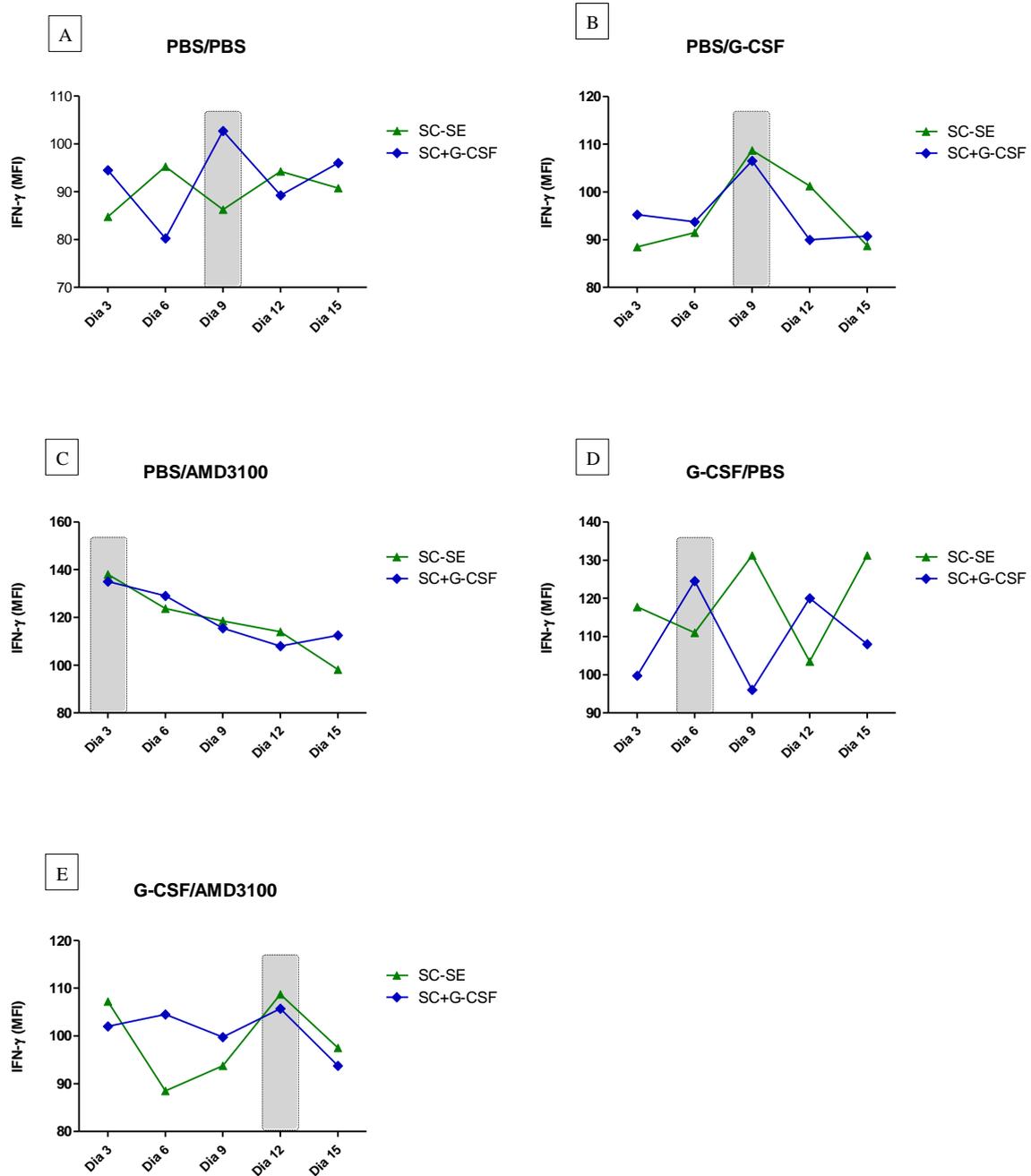
**Figura 28:** Concentração da Citocina IL-6 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de sangue periférico nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-6 em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-6 nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## SANGUE PERIFÉRICO



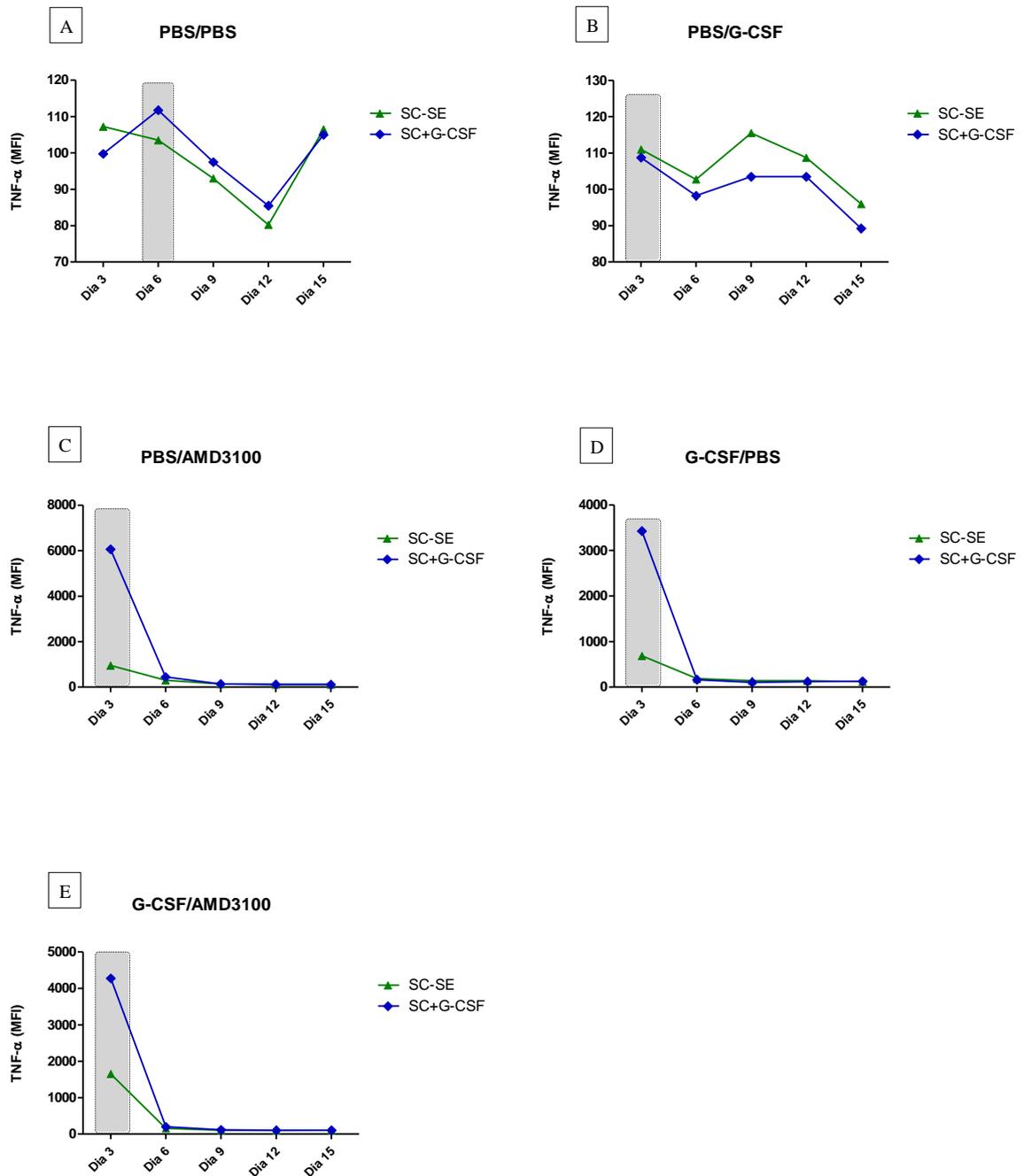
**Figura 29:** Concentração da Citocina IL-10 segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de sangue periférico nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=▲), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=◆), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-10 em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “■” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-10 nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## SANGUE PERIFÉRICO



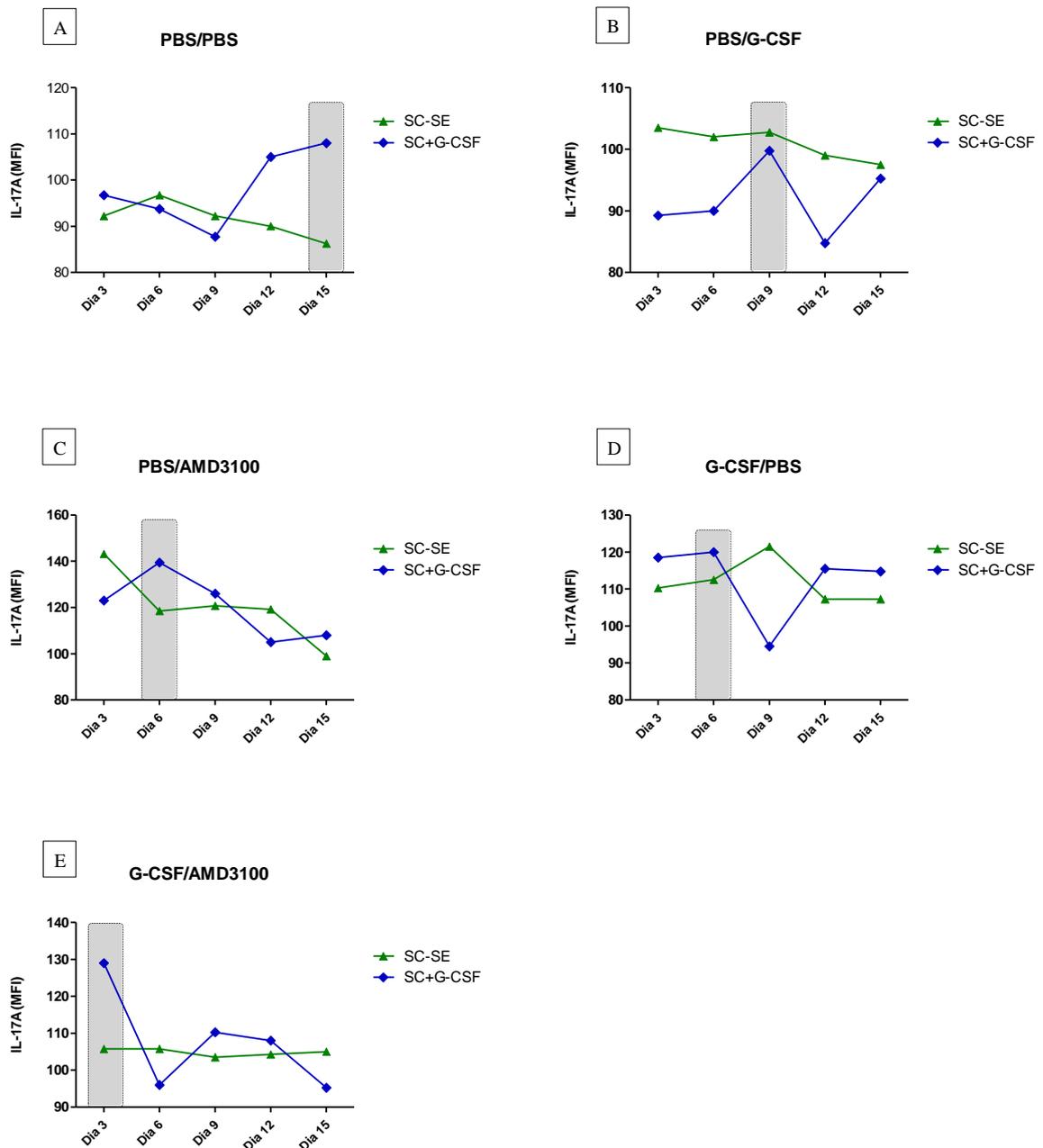
**Figura 30:** Concentração da Citocina IFN- $\gamma$  segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de sangue periférico nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IFN- $\gamma$  em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IFN- $\gamma$  nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## SANGUE PERIFÉRICO



**Figura 31:** Concentração da Citocina TNF- $\alpha$  segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de sangue periférico nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=  $\blacktriangle$ ), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=  $\blacklozenge$ ), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina TNF- $\alpha$  em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “ $\square$ ” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina TNF- $\alpha$  nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

## SANGUE PERIFÉRICO



**Figura 32:** Concentração da Citocina IL-17A segregada de acordo com o dia de Troca de Meio do sobrenadante da cultura de células-tronco de sangue periférico nos diferentes grupos. Suspensão Celular sem Estímulo (SC-SE=▲), Suspensão Celular Estimulada com G-CSF (SC+G-CSF=◆), nos grupos estudados. O teste *Cytometric beads array* (CBA) foi usado para quantificar as concentrações da citocina IL-17A em cultura primária e os resultados foram expressos em valores de médias  $\pm$ desvio padrão da Intensidade Média de Fluorescência (MFI). “■” Ao fundo foi utilizado para identificar o dia da troca de meio com maior concentração da Citocina IL-17A nas culturas estimuladas com G-CSF dos diferentes grupos.

---

*Discussão*

## 6. DISCUSSÃO

A mobilização de sub-populações de células tronco derivadas da medula óssea é diferencialmente regulado por fatores de crescimento que afetam a sua retenção no nicho medular (PITCHFORD *et al.*, 2009).

O G-CSF é uma potente citocina produzida por vários tipos celulares da linhagem hematopoiética como os monócitos, células progenitoras endoteliais, fibroblastos, células precursoras mesenquimais e cardiomiócitos (FIBBE *et al.*, 1988). A ação do G-CSF consiste na liberação de enzimas proteases no microambiente medular, as quais irão clivar importantes proteínas de ancoragem e ligações entre moléculas de adesão (MENDEZ-FERRER; FRENETTE, 2007).

Desta maneira, a mobilização e a subsequente saída de CT derivadas da medula óssea para o sangue periférico é potencialmente mediada pela ação regulatória do G-CSF (MÖHLE *et al.*, 1995). Estudos demonstram que após a administração de G-CSF, ocorre a proliferação e ativação de neutrófilos, e que de forma indireta, desempenham um papel crucial na migração de células tronco da medula óssea. As enzimas secretadas por neutrófilos são capazes de clivar diferentes moléculas que participam da retenção de células CD34<sup>+</sup> no nicho medular, como VCAM-1 (LEVESQUE *et al.*, 2001), c-Kit (LEVESQUE *et al.*, 2003), SFC (HEISSIG *et al.*, 2002), SDF-1 $\alpha$  (PETIT *et al.*, 2002).

Outras evidências apontam que a interação entre o Fator Derivado de Células Estromais Alfa-1 (SDF-1 $\alpha$ ) e seu receptor cognato, o CXCR4, gera sinais que regulam o tráfico de CTH na medula óssea (PELUS *et al.*, 2002). O SDF-1 $\alpha$  é uma quimiocina produzida constitutivamente pelas células estromais da medula óssea e tem demonstrado regular a adesão destas células, sua sobrevivência e estado do ciclo celular (KAWABATA *et al.*, 1999; QING; JONES; SPRINGER, 1999).

Lapidot; Petit (2002), propõem um modelo no qual o G-CSF induz a baixa regulação do gene SDF-1 $\alpha$  pelas células estromais, e de maneira oposta, uma super regulação na expressão dos genes das enzimas Metaloproteinase-9, Neutrófilo-elastase (NE) e Catepsina-G (CG), que atuam na clivagem da ligação do SDF-1 $\alpha$  ao seu receptor CXCR4, resultando na mobilização de células CD34<sup>+</sup> da medula óssea para o sangue periférico.

No entanto, embora o G-CSF seja atualmente o agente mais comumente utilizado para a mobilização de células-tronco hematopoiéticas, por causa da sua potência e relativa segurança, uma minoria de pacientes não conseguem mobilizar um número adequado de CTH

com o uso do G-CSF, muitas vezes resultante de idade avançada ou extensa quimioterapia (MORRIS *et al.*, 2003; PEREA *et al.*, 2001).

Em consistência com dados encontrados na literatura, no presente estudo demonstrou-se que o G-CSF foi capaz eficientemente de mobilizar as células CD34<sup>+</sup>. Nos grupos dos animais que foram tratados diariamente com PBS durante 04 dias, e administrados no 5º dia uma dose de G-CSF, não foi observado um valor estatístico significativo em relação à quantidade de CTH no sangue periférico. Entretanto, nos animais que receberam esse mesmo tratamento diário com G-CSF, percebeu-se um aumento estatisticamente significativo nessas células (**Figura 07**). Dessa forma, evidencia-se que o G-CSF parece agir de forma dose-dependente, sendo necessárias no mínimo 04 doses diárias, para obtenção do número suficiente dessas células para a circulação em modelo experimental.

Em contraste ao mecanismo de ação do G-CSF, Levesque *et al.*, (2004), sugerem um modo alternativo de mobilização em que ocorre uma inibição direta e reversível, sem clivagem proteolítica, de forma competitiva, pelo receptor CXCR4, ocasionando também uma rápida mobilização de células CD34<sup>+</sup> para a circulação, como no caso do agente não-peptídico AMD3100 (Plerixafor®).

O AMD3100 é um agente mobilizante promissor que tem demonstrado eficácia na mobilização de células-tronco hematopoiéticas autólogas em pacientes com Linfoma não-Hodgkin (LNH) e Mieloma Múltiplo (MM). Em Fase III de estudo com 13 pacientes com LNH e MM, observou-se um aumento em média de 06 vezes na contagem de células CD34<sup>+</sup> no sangue periférico desses pacientes, 06 horas após a administração do AMD3100 (240 µg/kg) (DEVINE *et al.*, 2004). Em nossos estudos, pode-se observar uma alta quantidade de células CD34<sup>+</sup> na circulação, 60 minutos após a administração de uma única dose (5 mg/kg) de AMD3100 em camundongos pré-tratados com PBS durante 04 dias.

Donahue *et al.*, (2009), demonstraram que apesar do G-CSF e o AMD3100 promoverem a migração de células CD34<sup>+</sup> da medula óssea para o sangue periférico, a expressão de um grande número de genes é diferente entre essas células mobilizadas por esses dois agentes. Os resultados demonstraram que nas células CD34<sup>+</sup> mobilizadas por G-CSF há uma expressão de genes de neutrófilos e fagócitos mononucleares, além de níveis elevados de *miR-155*, que é expresso durante o amadurecimento de células dendríticas. Em contraste com as células CD34<sup>+</sup> mobilizadas pelo AMD3100, que foram propensas na expressão de genes de células B, T e mastócitos. Estes dados sugerem que o G-CSF mobiliza em maior proporção

células CD34<sup>+</sup> que estão comprometidas com diferenciação na linhagem mielóide, enquanto aquelas mobilizadas pelo AMD3100 são mais susceptíveis à linhagem linfóide e mastócitos.

Embora a administração do AMD3100 tenha se demonstrado eficiente na migração de células CD34<sup>+</sup> para a circulação, curiosamente o mesmo resultado não foi observado no presente estudo para a migração de células-tronco mesenquimais. Estes resultados corroboram aos observados nas pesquisas de Pitchford *et al.*, (2009), que demonstram uma baixa mobilização dessa sub-população celular a partir do uso do AMD3100. Dessa maneira, pode-se sugerir que o mecanismo de ação do AMD3100 não é eficiente para mobilização de sub-populações de células tronco não-hematopoiéticas da medula óssea para a circulação. Como demonstrado na **Figura 07**, as CTM estão significativamente aumentadas no sangue periférico apenas no grupo dos animais que receberam tratamento diário (04 dias) de G-CSF, sugerindo que primariamente as CTM se diferenciam e expandem na medula óssea para depois serem mobilizadas para o sangue periférico.

Atualmente, células-tronco (CD34<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico são coletadas, de forma autóloga, após mobilização com G-CSF ou em combinação com quimioterapia. No entanto, uma proporção significativa de pacientes não conseguem mobilizar estas células de maneira suficiente para coleta por aférese. Pusic *et al.*, 2008, demonstraram em estudos que cerca de 26% de pacientes com linfoma não-Hodgkin (NHL) e Linfoma Hodgkin (LH), e cerca de 6% de pacientes com Mieloma Múltiplo (MM), que fizeram uso do G-CSF, obtiveram insucesso na quantidade de células CD34<sup>+</sup> na circulação.

Alguns trabalhos têm sugerido que a utilização do G-CSF associado ao AMD3100 é eficaz em relação à mobilização de células CD34<sup>+</sup> (FLOMENBERG *et al.*, 2005; FRUEHAUF *et al.*, 2009). Em nossos resultados não se percebeu de forma significativa um aumento na quantidade de CTH no sangue periférico dos animais que fizeram uso da associação do G-CSF com o AMD3100, em relação aos animais tratados com PBS e administrados uma única dose de AMD3100, ou nos animais que receberam doses diárias (04 dias) de G-CSF (**Figura 07**).

Em relação às CTM, em nossos resultados pode-se observar que a associação do G-CSF com o AMD3100 diminuiu a mobilização dessas células para o sangue periférico, de forma significativa, quando comparado aos animais que receberam apenas G-CSF diariamente (04 dias). Para tal fato, pode-se sugerir que a associação desses agentes seja eficaz na mobilização de células CD34<sup>+</sup>, mas não para mobilização de CTM (**Figura 07**). Entretanto, foi observado que nos animais que receberam tratamento apenas com G-CSF durante 04 dias,

houve um aumento significativo do número de CTM no sangue periférico, em relação aos demais grupos.

Kanellakis *et al.*, (2006), Kawada *et al.*, (2004) também observaram que ocorre mobilização de CTM para a circulação sistêmica a partir do tratamento com G-CSF de pacientes com infarto do miocárdio. E ainda segundo Rochefort *et al.*, (2006), CTM são mobilizadas para o sangue periférico por hipóxia através de uma série de mecanismos, incluindo a modificação de fatores locais envolvidos na manutenção de CTM no nicho medular ou em outros tecidos, aumento da concentração de substâncias quimiotáticas para CTM e/ou aumento da permeabilidade vascular. Estes dados demonstram que as CTM podem ser mobilizadas para o sangue periférico via estímulos distintos daqueles envolvidos na mobilização de CTH.

Os mecanismos de mobilização de CTM para a corrente sanguínea são pouco descritos na literatura. Provavelmente esses mecanismos são diferentes dos envolvidos na mobilização de CTH, embora existam alguns relatos que indicam que CTM são detectadas no sangue periférico após o procedimento para mobilização de células CD34<sup>+</sup> (TONDREAU *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2003).

O G-CSF é uma citocina importante na modulação da produção de outras citocinas (SANGANALMATH *et al.*, 2011). Baseado nesse dado, o próximo passo no presente estudo foi avaliar a produção de citocinas em culturas de células-tronco derivadas da medula óssea e sangue periférico, que foram estimuladas ou não, com G-CSF.

IL-2 e IL-4 têm sido descritas como citocinas importantes na proliferação e diferenciação de células CD34<sup>+</sup> (BYKOVSKAJA *et al.*, 1998). As principais atividades descritas para a IL-4 estão relacionadas na determinação do perfil da resposta imune em T<sub>H</sub>2 e na proliferação e diferenciação de células B (LE *et al.*, 1988). Dados da literatura descrevem a tendência das CTM em favorecerem uma resposta T<sub>H</sub>2 (LU *et al.*, 2009). Neste estudo, pode-se observar o aumento de IL-2 e IL-4 na fase final das culturas de células derivadas da medula óssea (**Figuras 19C, D e 20C, D**), o que pode estar relacionado com o fato das CTM estarem aumentadas na fase mais tardia do cultivo (9<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia), portanto, liberando essa citocina no meio. No entanto, nas culturas de sangue periférico, essas citocinas apresentaram-se elevadas durante os diferentes tempos de cultivo (3<sup>o</sup> ao 15<sup>o</sup> dia).

De acordo com Haser; Kajkenova; Lipschitz (1997), a IL-6 apresenta características inflamatórias, participam da proliferação e crescimento de CTH e CTM, bem como na diferenciação de linfócitos B e T e na regulação de respostas inflamatórias. E ainda segundo

Chu (2013), o TNF- $\alpha$  é uma citocina pleiotrópica que tem a capacidade de alterar a produção de outras citocinas e um importante denominador comum de muitas condições inflamatórias. Ao contrário do observado para as citocinas citadas anteriormente, em nosso estudo pode-se observar que a IL-6 e o TNF- $\alpha$  estão aumentados nos primeiros dias de cultura, tanto das células derivadas da medula óssea quanto do sangue periférico, e diminuem a partir do 6<sup>o</sup> dia de forma progressiva até o final do cultivo (**Figuras 21, 24, 28 e 31**). Esse achado pode estar relacionado à alta proliferação celular, característico dessas células nos primeiros dias de cultivo.

Interessantemente observou-se que no 6<sup>o</sup> dia, as culturas que não foram estimuladas com G-CSF apresentaram no sobrenadante uma alta concentração de IL-6 comparada as culturas que recebiam G-CSF, sugerindo que em exposições repetidas a esse fator, ocorre uma diminuição e/ou inibição gradativa na produção desta citocina (**Figura 21C,E**), em concordância com o observado nos trabalhos de Heard; Fink (1999), que demonstraram que o G-CSF diminui os níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 em várias condições.

O IFN- $\gamma$  é uma citocina produzida principalmente por células T<sub>H1</sub>, mas também é produzida pelas células TCD8<sup>+</sup>, T $\gamma\delta$ , NKT e NK e desempenha um papel central na regulação de respostas imunes tumorais (ALSHAKER; MATAŁKA, 2011). Maitra *et al.*, (2004), demonstram que quando o IFN- $\gamma$  está presente em altas concentrações, as CTM suprimem a produção de IFN- $\gamma$  pelas células T e diminuem os efeitos da Doença do Enxerto contra o Hospedeiro (GvDH - do inglês, *Graft-versus-host disease*) (DI NICOLA *et al.*, 2002). Kang *et al.*, (2005) também observaram que CTM humanas reduzem a resposta lítica de linfócitos T citotóxicos (LTC) contra células mononucleares derivadas da medula óssea infectadas por vírus.

Em nossos resultados, foi observado que nas culturas de CT de medula óssea e estimuladas com G-CSF, ocorre uma alta secreção de IFN- $\gamma$  no meio, quando comparado as culturas que não receberam nenhum estímulo, com redução progressiva até os últimos dias de cultivo, como demonstrado na **Figura 23C, D e E**. Para o sangue periférico não se observou esse mesmo efeito, ocorrendo uma produção variável dessa citocina nos diferentes dias de cultivo, independente do estímulo dado ou não (**Figura 30**).

As CTM desempenham uma potente atividade imunorreguladora, independentemente do seu tecido de origem, através da secreção de citocinas, como a IL-10 (BURDON *et al.*, 2011). Os resultados apresentados em nosso estudo demonstram que há uma elevação de IL-10, uma citocina anti-inflamatória, no início do período de cultivo (3<sup>o</sup> dia), reduzindo a partir

do 6º dia de forma contínua até o tempo final do cultivo. Esses achados podem ser explicados pela ação do G-CSF que apresenta características de estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10 (**Figuras 22C, D, E; 29D, E**) (CUERQUIS *et al.*, 2014).

A interleucina-17A é uma citocina secretada principalmente por células T<sub>H</sub>-17. Apesar de IL-17 estar associada principalmente com a indução de inflamação do tecido, alguns estudos têm mostrado uma relação desta citocina na proliferação e diferenciação de CTM humanas, e um aumento na formação de unidades formadoras de colônias de fibroblastos em cultura a partir de células derivadas da medula óssea (HUANG *et al.*, 2009).

Neste estudo, a produção de IL-17A foi diferente da observada para as outras citocinas inflamatórias anteriormente citadas, tanto nas culturas de medula quanto de sangue periférico, em todos os tempos de cultivo, independente do estímulo com G-CSF (**Figuras 25 e 32**).

Diante do exposto em relação as citocinas no presente estudo, podemos sugerir que o G-CSF parece modular ou induzir a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias *in vitro*, e também contribui para diferenciação das CTM, promovendo um ambiente favorável para sua manutenção.

---

*Conclusão*

## CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que:

- O G-CSF estimula a mobilização de CTH e CTM da medula para o sangue periférico de forma dose-dependente;
- O AMD3100 mobiliza CTH para a circulação de forma rápida (uma hora após sua administração);
- A associação do G-CSF com o AMD3100 não apresenta um efeito sinérgico para a mobilização de CTH da MO para o SP;
- O mecanismo de ação do AMD3100 não demonstra ser eficiente para mobilização de CTM para o SP;
- A diferenciação de CTM parece estar relacionada com o G-CSF e outras citocinas anti-inflamatórias e pró-inflamatórias;
- O G-CSF parece modular ou induzir a produção de diferentes citocinas.

---

## *Referências*

## REFERÊNCIAS

- Abdelhay, ESWF; Paraguacu-braga, FH; Binato, R; Bouzas, LFS. **Hematopoietic stem cells: expansion and perspectives for therapeutic use.** *Rev Bras de Hematologia e Hemoterapia.* 31:2–8, 2009.
- Adegani, FJ; Langroudi, L; Arefian, E; Shafiee, A; Dinarvand, P; Soleimani, M. **A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells.** *Mol Biol Rep.* 40(5):3693–703, 2013.
- Akashi, K; Traver, D; Miyamoto, T; Weissman, IL. **A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.** *Nature.* 404:193–7, 2000.
- Alexander, ET; Towery, J; Miller, AN; Kramer, C; Hogan, KR; Squires, JE. **Beyond CD34+ cell dose: impact of method of peripheral blood hematopoietic stem cell mobilization (granulocyte-colony-stimulating factor [G-CSF], G-CSF plus plerixafor, or cyclophosphamide G-CSF/granulocyte-macrophage [GM]-CSF) on number of colony-forming.** *Transfusion.* 51(9):1995–2000, 2011.
- Alshaker, HA; Matalka, KZ. **IFN- $\gamma$ , IL-17 and TGF- $\beta$  involvement in shaping the tumor microenvironment: The significance of modulating such cytokines in treating malignant solid tumors.** *Cancer Cell International.* 11(33):1-11, 2011.
- Barry, FP; Murphy, JM. **Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization.** *Int J Biochem Cell Biol.* 36:568–84, 2004.
- Bassi, ÊJ; De Almeida, DC; Moraes-Vieira, PMM; Câmara, NOS. **Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells.** *Stem Cell Rev.* 8:329–42, 2012.
- Brehm, M; Zeus, T; Strauer BE. **Stem cells - clinical application and perspectives.** *Herz.* 27:611–20, 2002.
- Broxmeyer, HE; Orschell, CM; Clapp, DW; Hangoc, G; Cooper, S; Plett, PA. **Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist.** *J Exp Med.* 201(8):1307–18, 2005.

- Burdon, TJ; Paul, A; Noiseux, N; Prakash, S; Shum-Tim, D. **Bone Marrow Stem Cell Derived Paracrine Factors for Regenerative Medicine: Current Perspectives and Therapeutic Potential.** *Bone Marrow Research.* 2011:1-14, 2011.
- Bykovskaja, SN; Buffo, MJ; Bunker, M; Zhang, H; Majors, A; Herbert, M. **Interleukin-2-induces development of dendritic cells from cord blood CD34+ cells.** *J Leukoc Biol.* 63(5):620–30, 1998.
- Caplan, AI. **Mesenchymal stem cells.** *J. Orthop. Res.* 9(5):641-650, 1991.
- Caplan, AI; Bruder, SP. **Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century.** *Trends Mol Med.* 7:259–64, 2001.
- Cashen, A; Lopez, S; Gao, F; Calandra, G; MacFarland, R; Badel, K. **A phase II study of plerixafor (AMD3100) plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization in patients with Hodgkin lymphoma.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 14(11):1253–61, 2008.
- Chen, S; Fang, W; Ye, F; Liu, Y-H; Qian, J; Shan, S. **Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction.** *The American journal of cardiology.* 94:92–5, 2004.
- Chu, W-M. **Tumor necrosis factor.** *Cancer Lett.* 328:222–5, 2013.
- Cuerquis, J; Romieu-Mourez, R; François, M; Routy, JP; Young, YK; Zhao, J; Eliopoulos, N. **Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulation.** *Cytotherapy.* 16(2):191-202, 2014.
- Dar, A; Schajnovitz, A; Lapid, K; Kalinkovich, A; Itkin, T; Ludin, A. **Rapid mobilization of hematopoietic progenitors by AMD3100 and catecholamines is mediated by CXCR4-dependent SDF-1 release from bone marrow stromal cells.** *Leukemia.* 25(8):1286–96, 2011.
- Devine, SM; Flomenberg, N; Vesole, DH; Liesveld, J; Weisdorf, D; Badel, K. **Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma.**

*Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 22(6):1095–102, 2004.

- Di Nicola, M; Carlo-Stella, C; Magni, M; Milanese, M; Longoni, PD; Matteucci, P. **Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli.** *Blood.* 99(10):3838–43, 2002.
- Donahue, RE; Jin, P; Bonifacino, AC; Metzger, ME; Ren, J; Wang, E. **Plerixafor (AMD3100) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilize different CD34+ cell populations based on global gene and microRNA expression signatures.** *Blood.* 114(12):2530–41, 2009.
- English, K; Barry, FP; Field-Corbett, CP; Mahon, BP. **IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells.** *Immunol Lett.* 110:91–100, 2007.
- Fibbe, WE; Van Damme, J; Billiau, A; Duinkerken, N; Lurvonnk, E; Ralph, P; Altrock, BW, Kaushansky, K; Willemze, R; Falkenburg, JH. **Human fibroblasts produce granulocyte-CSF, macrophage-CSF, and granulocyte-macrophage-CSF following stimulation by interleukin-1 and poly(rI).poly(rC).** *Blood.* 72(3):860-866, 1988.
- Flomenberg, N; Devine, SM; DiPersio, JF; Liesveld, JL; McCarty, JM; Rowley, SD. **The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone.** *Blood.* 106(5):1867–74, 2005.
- Friedenstein, AJ; Piatetzky-shapiro, II; Petrakova, KV. **Osteogenesis in transplants of bone marrow cells.** *J. Embryol. Exp. Morphol.* 16(3):381-390, 1966.
- Fruehauf, S; Veldwijk, MR; Seeger, T; Schubert, M; Laufs, S; Topaly, J; Wuchter, P; Dillmann, F; Eckstein, V; Wenz, F; Goldschmidt, H; Ho, AD; Calandra, G. **A combination of granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) and plerixafor mobilizes more primitive peripheral blood progenitor cells than G-CSF alone: results of a European phase II study.** *Cytotherapy.* 11(8):992-1001, 2009.
- Hauser, SP; Kajkenova, O; Lipschitz, DA. **The pivotal role of interleukin 6 in formation and function of hematopoietically active murine long-term bone marrow cultures.** *Stem Cells.* 15(2):125–32, 1997.

- Hawkins, ED; Lo Celso, C. **Subdivision of bone marrow microenvironments: purpose built homes for haematopoietic stem cells.** *EMBO J.* 32(2):176–7, 2013.
- Heard, SO; Fink, MP. Counterregulatory control of the acute inflammatory response: granulocyte colony-stimulating factor has anti-inflammatory properties. *Crit Care Med.* 27(5):1019-21, 1999.
- Heissig, B; Hattori, K; Dias, S; Friedrich, M; Ferris, B; Hackett, NR. **Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand.** *Cell.* 109(5):625–37, 2002.
- Hong, KT; Kang, HJ; Kim, NH; Kim, MS; Lee, JW; Kim, H. **Successful mobilization using a combination of plerixafor and G-CSF in pediatric patients who failed previous chemomobilization with G-CSF alone and possible complications of the treatment.** *J Hematol Oncol.* 5(1):14, 2012.
- Hwang, WS; Ryu, YJ; Park, JH; Park, ES; Lee, EG; Koo, JM. **Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst.** *Science.* 303:1669–74, 2004.
- Ilic, D; Polak, JM. **Stem cells in regenerative medicine: introduction.** *Br Med Bull.* 98:117–26, 2011.
- Jacobs, S; Roobrouck, VD; Verfaillie, CM; Van Gool, SW. **Immunological characteristics of human mesenchymal stem cells and multipotent adult progenitor cells.** *Immunol Cell Biol.* 91(1):32–9, 2013.
- Javazon, EH; Beggs, KJ; Flake, AW. **Mesenchymal stem cells: Paradoxes of passaging.** *Experimental Hematology.* 414–25, 2004.
- Jin, H; Bae, Y; Kim, M; Kwon, S-J; Jeon, H; Choi, S. **Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy.** *Int J Mol Sci.* 14(9):17986–8001, 2013.
- Kang, HS; Habib, M; Chan, J; Abavana, C; Potian, JA; Ponzio, NM. **A paradoxical role for IFN- $\gamma$  in the immune properties of mesenchymal stem cells during viral challenge.** *Exp Hematol.* 33(7):796–803, 2005.

- Katritsis, DG; Sotiropoulou, PA; Karvouni, E; Karabinos, I; Korovesis, S; Perez, SA. **Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium.** *Cardiovasc Interv.* 65:321–9, 2005.
- Kawabata, K; Ujikawa, M; Egawa, T; Kawamoto, H; Tachibana, K; Iizasa, H. **A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(10):5663–7, 1999.
- Kawada, H; Fujita, J; Kinjo, K; Matsuzaki, Y; Tsuma, M; Miyatake, H. **Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction.** *Blood.* 104(12):3581–7, 2004.
- Kondo, M; Weissman, IL; Akashi, K. **Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.** *Cell.* 91:661–72, 1997.
- Krampera, M; Pizzolo, G; Aprili, G; Franchini, M. **Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair.** *Bone.* 39:678–683, 2006.
- Laflamme, MA; Chen, KY; Naumova, AV; Muskheli, V; Fugate, JA; Dupras, SK. **Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts.** *Nat Biotechnol.* 25:1015–24, 2007.
- Lapidot, T; Petit, I. **Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.** *Exp Hematol.* 30(9):973–81, 2002.
- Larochelle, A; Krouse, A; Metzger, M; Orlic, D; Donahue, RE; Fricker, S. **AMD3100 mobilizes hematopoietic stem cells with long-term repopulating capacity in nonhuman primates.** *Blood.* 107(9):3772–8, 2006.
- Le, HV, Ramanathan, L; Labdon, JE; Mays-Ichinco, CA; Syto, R; Arai, N. **Isolation and characterization of multiple variants of recombinant human interleukin 4 expressed in mammalian cells.** *J Biol Chem.* 263(22):10817–23, 1988.
- Lévesque, JP; Takamatsu, Y; Nilsson, SK; Haylock, DN; Simmons, PJ. **Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor.** *Blood.* 98(5):1289–97, 2001.

- Lévesque, JP; Hendy, J; Takamatsu, Y; Simmons, PJ; Bendall, LJ. **Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide.** *J Clin Invest.* 111(2):187-96, 2003.
- Lévesque, JP; Liu, F; Simmons, PJ; Betsuyaku, T; Senior, RM; Pham, C. **Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice.** *Blood.* 104(1):65–72, 2004.
- Lévesque, JP; Hendy, J; Takamatsu, Y; Williams, B; Winkler, IG; Simmons, PJ. **Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment.** *Exp Hematol.* 30:440–9, 2002.
- Li, DR; Cai, JH. **Methods of isolation, expansion, differentiating induction and preservation of human umbilical cord mesenchymal stem cells.** *Chin Med J.* 125:4504–10, 2012.
- Li, M; Ikehara, S. **Bone-marrow-derived mesenchymal stem cells for organ repair.** *Stem Cells Int.* 2013:132642, 2013.
- Li, T; Wu, Y. **Paracrine Molecules of Mesenchymal Stem Cells for Hematopoietic Stem Cell Niche.** *Bone Marrow Research.* 2011:1–8, 2011.
- Lu, X; Liu, T; Gu, L; Huang, C; Zhu, H; Meng, W. **Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells involved in favoring type 2 T cell subsets.** *Transpl Immunol.* 22(1-2):55–61, 2009.
- Ma, S; Xie, N; Li, W; Yuan, B; Shi, Y; Wang, Y. **Immunobiology of mesenchymal stem cells.** *Cell Death Differ.* 21(2):216–25, 2014.
- Maitra, B; Szekely, E; Gjini, K; Laughlin, MJ; Dennis, J; Haynesworth, SE. **Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation.** *Bone Marrow Transplant.* 33(6):597–604, 2004.
- McCulloch, EA; Till, JE. **Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells.** *Reprinted for Nature.* 197(4886):452–454, 1963.

- Méndez-Ferrer, S; Frenette, PS. **Hematopoietic stem cell trafficking: Regulated adhesion and attraction to bone marrow microenvironment.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1116:392–413, 2007.
- Méndez-Ferrer, S; Michurina, TV; Ferraro, F; Mazloom, AR; Macarthur, BD; Lira, SA. **Mesenchymal and hematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche.** *Nature.* 466:829–34, 2010.
- Mendrone, AJ. **Sangue periférico como fonte de células para terapia celular.** *Rev. Bras de Hematologia e Hemoterapia.* 31:19-24, 2009.
- Möhle, R; Murea, S; Kirsch, M; Haas, R. **Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery.** *Exp Hematol.* 23(14):1535–42, 1995.
- Morris, CL; Siegel, E; Barlogie, B; Cottler-Fox, M; Lin, P; Fassas A. **Mobilization of CD34+ cells in elderly patients ( $\geq 70$  years) with multiple myeloma: Influence of age, prior therapy, platelet count and mobilization regimen.** *Br J Haematol.* 120(3):413–23, 2003.
- Murry, CE; Soonpaa, MH; Reinecke, H; Nakajima, H; Nakajima, HO; Rubart, M. **Hematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarcts.** *Nature.* 428:664–668, 2004.
- Nasef, A; Chapel, A; Mazurier, C; Bouchet, S; Lopez, M; Mathieu, N. **Identification of IL-10 and TGF-beta transcripts involved in the inhibition of T-lymphocyte proliferation during cell contact with human mesenchymal stem cells.** *Gene Expr.* 13:217–26, 2007.
- Nelson, TJ; Behfar, A; Yamada, S; Martinez-Fernandez, A; Terzic, A. **Stem cell platforms for regenerative medicine.** *Clinical and Translational Science.* 2(3):222–227, 2009.
- Nervi, B; Link, DC; DiPersio, JF. **Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization.** *J Cell Biochem.* 99(3):690–705, 2006.
- Owen, M; Friedenstein, AJ. **Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors.** *Ciba Found Symp.* 136:42–60, 1988.

- Pelus, LM; Horowitz, D; Cooper, SC; King, AG. **Peripheral blood stem cell mobilization - A role for CXC chemokines.** *Crit Rev Oncol Hematol.* 43(3):257–75, 2002.
- Perea, G; Sureda, A; Martino, R; Altés, A; Martínez, C; Cabezudo, E. **Predictive factors for a successful mobilization of peripheral blood CD34+ cells in multiple myeloma.** *Ann Hematol.* 80(10):592–7, 2001.
- Petit, I; Szyper-Kravitz, M; Nagler, A; Lahav, M; Peled, A; Habler, L. **G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4.** *Nat Immunol.* 3(7):687–94, 2002.
- Pitchford, SC; Furze, RC; Jones, CP; Wengner, AM; Rankin, SM. **Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow.** *Cell Stem Cell.* 4(1):62–72, 2009.
- Pusic, I; Jiang, SY; Landua, S; Uy, GL; Rettig, MP; Cashen, AF. **Impact of Mobilization and Remobilization Strategies on Achieving Sufficient Stem Cell Yields for Autologous Transplantation.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 14(9):1045–56, 2008.
- Qing, M; Jones, D; Springer, TA. **The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment.** *Immunity.* 10(4):463–71, 1999.
- Rankin, SM. **Chemokines and adult bone marrow stem cells.** *Immunol Lett.* 145(1-2):47–54, 2012.
- Ratajczak, MZ; Kim, C; Janowska-Wieczorek, A; Ratajczak, J. **The expanding family of bone marrow homing factors for hematopoietic stem cells: stromal derived factor 1 is not the only player in the game.** *ScientificWorldJournal.* 2012:758512, 2012.
- Ren, G; Zhao, X; Zhang, L; Zhang, J; L’Huillier, A; Ling, W. **Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression.** *J Immunol.* 184:2321–2328, 2010.
- Robey, PG. **Stem cells near the century mark.** *J Clin Invest.* 105(11):1489-91, 2000.

- Sanganalmath, SK; Abdel-Latif, A; Bolli, R; Xuan, YT; Dawn, B. **Hematopoietic cytokines for cardiac repair: Mobilization of bone marrow cells and beyond.** *Basic Research in Cardiology.* 106(5):709–33, 2011.
- Stauffer, RC. **Haeckel, Darwin, and Ecology.** *The Quarterly Review of Biology.* 138, 1957.
- Szardien, S; Nef, HM; Voss, S; Troidl, C; Liebetrau, C; Hoffmann, J. **Regression of cardiac hypertrophy by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated interleukin-1 $\beta$  synthesis.** *Eur Heart J.* 33:595–605, 2012.
- Rosenkilde, MM; Gerlach, LO; Jakobsen, JS; Skerlj, RT; Bridger, GJ; Schwartz, TW. **Molecular mechanism of AMD3100 antagonism in the CXCR4 receptor: transfer of binding site to the CXCR3 receptor.** *J Biol Chem.* 279(4):3033–41, 2004.
- Tao, Z; Li, L; Geng, Z; Dang, T; Zhu, S. **Growth factors induce the improved cardiac remodeling in autologous mesenchymal stem cell-implanted failing rat hearts.** *J Zhejiang Univ Sci B.* 11:238–48, 2010.
- Tondreau, T; Meuleman, N; Delforge, A; Dejeneffe, M; Leroy, R; Massy, M. **Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity.** *Stem Cells.* 23(8):1105–12, 2005.
- Trounson, A; Thakar, RG; Lomax, G; Gibbons, D. **Clinical trials for stem cell therapies.** *BMC Med.* 9:52, 2011.
- Van Laake, LW; Qian, L; Cheng, P; Huang, Y; Hsiao, EC; Conklin, BR. **Reporter-based isolation of induced pluripotent stem cell and embryonic stem cell-derived cardiac progenitors reveals limited gene expression variance.** *Circ Res.* 107:340–7, 2010.
- Verfaillie, CM; Pera, MF; Lansdorp, PM. **Stem cells: hype and reality.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 369–91, 2002.
- Vilas-Boas, F; Feitosa, GS; Soares, MPB; Mota, A; Pinho-filho, JA; Almeida, AJG; Andrade, MV; Carvalho, HG; Dourado-oliveira, A; Ribeiro dos Santos, R. **Resultados Iniciais do Transplante de Células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com Insuficiência cardíaca de Etiologia Chagásica.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia.* 87(2): 159-166, 2006.

- 
- Wu, GD; Nolta, JA; Jin, Y-S; Barr, ML; Yu, H; Starnes, VA. **Migration of mesenchymal stem cells to heart allografts during chronic rejection.** *Transplantation.* 75(5):679–85, 2003.
  - Yagi, H; Soto-Gutierrez, A; Parekkadan, B; Kitagawa, Y; Tompkins, RG; Kobayashi, N. **Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing.** *Cell Transplant.* 19:667–79, 2010.

---

*Apêndice*

**APÊNDICE: Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas (CEUA-UFAM).**



UFAM

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)



## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 017/2010-CEEA, sobre “Estudo pré-clínico de implante de células tronco hematopoéticas e mesenquimais em camundongos com cardiopatia isquêmica induzida tratados com fator de crescimento celular” sob responsabilidade de **ADRIANA MALHEIRO, ELISA DE LEON, LIZIARA FRAPORTI, NADJA GARCIA**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em reunião de **07/05/2010**.

Manaus, 12 de maio de 2010

Prof. Dr. Fábio Tonissi Moroni  
Presidente do CEEA-UFAM

---

*Anexo*

**ANEXO: Artigo****Rápida mobilização de células-tronco hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> com o AMD3100****Rapid mobilization of murine bone marrow-derived CD34(+) hematopoietic stem cells with AMD3100**

Nilberto Dias de Araújo<sup>1,2</sup>; Allyson Guimarães da Costa<sup>1,2</sup>; Walter Luiz Lima Neves<sup>1,2</sup>; João Paulo Diniz Pimentel<sup>2,3</sup>; Elisa Brosina de Leon<sup>1</sup>; Adriana Malheiro<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Programa de Pós Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus-AM, Brasil;

<sup>2</sup> Departamento de Ensino e Pesquisa, Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas, FHMOAM, Manaus, AM, Brasil;

<sup>3</sup> Instituto Leônidas e Maria Deane, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Manaus, AM, Brasil;

**Key-words:** Stem cells, cytokines, bone marrow, mobilization, AMD3100.

**Endereço para correspondência:** Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas – HEMOAM. Av. Constantino Nery, N<sup>o</sup> 4.397, CEP: 69050-000, Chapada, Manaus, Amazonas, Brasil;

**Telefones:** 55 92 3655 0013 / 55 92 9114 9478

**E-mail:** [malheiroadriana@yahoo.com.br](mailto:malheiroadriana@yahoo.com.br)

## RESUMO

A medula óssea é o principal local descrito como reserva de sub-populações de células-tronco (CT), incluindo as células-tronco hematopoiéticas (CTH). Diferentes fatores estimulam potencialmente a mobilização dessas células para o sangue periférico. O AMD3100 tem demonstrado agir na interrupção do eixo de retenção CXCR4/SDF-1 $\alpha$  estimulando a mobilização de células hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> para a corrente sanguínea. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do AMD3100 na mobilização de CTH para o sangue periférico. Foram utilizados 05 grupos com 09 camundongos machos, BALB-c, tratados diariamente com PBS ou G-CSF durante 04 dias e estimulados 24 horas após a última administração com PBS ou AMD3100. As CTH mobilizadas foram identificadas por meio de marcadores celulares específicos por citometria de fluxo. As análises estatísticas foram realizadas com o programa *GraphPad Prism 5.0*. Os resultados demonstraram uma mobilização estatisticamente significativa de CTH nos camundongos tratados com PBS e que receberam uma 5<sup>a</sup> dose de AMD3100 e no grupo dos animais que foram tratados com G-CSF diariamente, por 04 dias consecutivos. Dessa maneira, pode-se concluir que o AMD3100 induz uma rápida mobilização de células CD34<sup>+</sup> para a circulação, diferentemente do G-CSF, que age de forma dose-dependente.

**Palavras-chave:** Células-tronco, citocinas, medula óssea, mobilização, AMD3100.

## INTRODUÇÃO

As células-tronco (CT) são definidas como células indiferenciadas e não especializadas, com propriedades de auto-renovação (proliferação) e diferenciação em diversas linhagens celulares (ADEGANI *et al.*, 2013). A medula óssea um tecido complexo que alberga diferentes sub-populações de CT, entre elas estão incluídas as células-tronco hematopoiéticas (CTH) (HAWKINS *et al.*, 2013).

As CTH originam todos os tipos de células sanguíneas, incluindo linfócitos, eritrócitos, monócitos, granulócitos e plaquetas (KONDO; WEISSMAN; AKASHI, 1997; AKASHI *et al.*, 2000). Embora recentemente tenham surgido evidências de que as CTH também têm a capacidade de se diferenciarem em outras linhagens celulares não hematopoiéticas (MENDRONE, 2009).

As CTH são de fácil obtenção, uma vez que são células residentes na medula óssea (1 em  $10^4$  à 1 em  $10^8$  de células nucleadas da medula óssea), que podem ser aspiradas diretamente ou estimuladas a mover-se para corrente do sangue periférico, onde podem ser facilmente recolhidas (LI; WU, 2011).

A identificação de CTH é proporcionada pela presença de determinados marcadores de superfície e ausência de outros. Dentre os marcadores descritos, o CD34<sup>+</sup> é o que encontra um amplo uso clínico, e é expresso nas diversas CTH provenientes da medula óssea. Embora não seja uma molécula que defina especificamente a CTH, os dados descritos sugerem que a CTH está contida numa população de células CD34<sup>+</sup> (ABDELHAY *et al.*, 2009).

A aplicação dessas sub-populações de CT com fins terapêuticos, seja na regeneração de tecidos, em doenças auto-imunes ou em doenças crônico-degenerativas, tem sido amplamente utilizada (REN *et al.*, 2010). Uma estratégia para a obtenção de células CD34<sup>+</sup> é estimular a mobilização dessas células da medula óssea para circulação periférica, através de agentes mobilizadores. O estabelecimento de uma metodologia de isolamento de CTH de sangue periférico é bastante atraente, por tal procedimento garantir uma fonte dessas células que não requer um método invasivo como extração de medula óssea (BREHM; ZEUS; STRAUER, 2002). Dessa maneira, este estudo propõe avaliar a mobilização de CTH para o sangue periférico a partir de agentes mobilizantes peptídicos e não peptídicos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Tipo de Estudo:** Este estudo se caracteriza por uma pesquisa com experimentação em modelo animal de laboratório, no qual foi testado o efeito do GCS-F e/ou do AMD3100 em camundongos previamente tratados com PBS ou G-CSF, para avaliar a mobilização de subpopulações de células-tronco hematopoiéticas da medula óssea para o sangue periférico.

**Informações Éticas:** O presente estudo foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas (CEUA-UFAM) e respeitou os princípios de cuidados com animais de laboratório de acordo com a lei nº6638 da Republica Federativa do Brasil de 08 de maio de 1979, que trata de normas para as práticas didático-científico da vivisseccção de animais.

**População de Estudo:** Para este estudo foram utilizados 45 camundongos machos BALB/c com 3-4 semanas de vida, provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP. Esses camundongos foram mantidos em estantes e gaiolas apropriadas, alimentados com ração padrão e água, com controle de luz (ciclos de 12 horas), temperatura e umidade, no Biotério da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). O experimento foi constituído por 05 grupos experimentais, com 09 camundongos cada, tratados diariamente com PBS (160µl i.p.) ou G-CSF (200µg/kg i.p.) (VILAS-BOAS *et al.*, 2006) durante 04 dias. 24 horas após a última injeção foi administrado nos camundongos PBS ou AMD3100 (5 mg/kg i.p.) (PITCHFORD *et al.*, 2009). 60 minutos após foi coletado o sangue periférico com pipeta Pasteur heparinizada através do plexo ocular para realização da imunofenotigem *ex vivo* das células CD34<sup>+</sup> circulantes por citometria de fluxo.

**Análise estatística:** Para as análises estatísticas foi utilizando o software *GraphPadPrism*<sup>®</sup> 5.0. Os resultados foram analisados a partir do teste de análise de variância *ANOVA One-way*, com pós-teste para a análise das correlações de comparação múltipla *Tukey's*. Foi utilizado intervalo de confiança de 95% e os dados considerados com significância estatística foram aqueles que apresentaram p valor < 0,05.

## RESULTADOS

O presente estudo avaliou a influência do G-CSF e/ou AMD3100 na mobilização de CTH da medula óssea para o sangue periférico. O número de CTH e CTM foi determinado 60 minutos após a administração de PBS, G-CSF ou AMD3100 em camundongos pré-tratados durante 04 dias com PBS ou G-CSF.

No sangue periférico, pode-se observar que os animais tratados diariamente com PBS durante 04 dias e 24 horas após administrado uma 5ª dose de AMD3100, acontece uma alta mobilização de CTH para o sangue periférico. Esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,0002$ ), quando comparado com os animais que receberam as mesmas 04 doses de PBS mais uma 5ª dose de PBS (grupo controle) ou de G-CSF. Nos animais tratados diariamente com G-CSF durante 04 dias e 24 horas após administrado uma 5ª dose de PBS ou AMD3100, também percebe-se um aumento significativo no número de CTH circulantes, quando comparado com os grupos de animais que receberam administrações diárias de PBS mais uma 5ª dose de PBS (grupo controle) ou de G-CSF.

A associação do tratamento diário dos animais com G-CSF durante 04 dias e estimulados 24 horas após com uma 5ª dose de AMD3100 parece aumentar o número de CTH no sangue periférico, porém não houve diferença estatística significativa quando comparado ao grupo que recebeu o mesmo tratamento com G-CSF mais uma 5ª dose de PBS, ou ao grupo dos animais tratados diariamente com PBS e estimulados 24 horas após com uma 5ª dose de AMD3100 (**Figura 01**).

## DISCUSSÃO

A mobilização de sub-populações de células tronco hematopoiéticas derivadas da medula óssea é diferencialmente regulada por fatores de crescimento que afetam a sua retenção no nicho medular (PITCHFORD *et al.*, 2009).

O G-CSF é uma potente citocina produzida por vários tipos celulares da linhagem hematopoiética como os monócitos, células progenitoras endoteliais, fibroblastos, células precursoras mesenquimais e cardiomiócitos (FIBBE *et al.*, 1988). A ação do G-CSF consiste na liberação de enzimas proteases no microambiente medular, as quais irão clivar importantes proteínas de ancoragem e ligações entre moléculas de adesão (MENDEZ-FERRER; FRENETTE, 2007).

Desta maneira, a mobilização e a subsequente saída de CT derivadas da medula óssea para o sangue periférico é potencialmente mediada pela ação regulatória do G-CSF (MÖHLE *et al.*, 1995). Estudos demonstram que após a administração de G-CSF, ocorre a proliferação e ativação de neutrófilos, e que de forma indireta, desempenham um papel crucial na migração de células tronco da medula óssea. As enzimas secretadas por neutrófilos são capazes de clivar diferentes moléculas que participam da retenção de células CD34<sup>+</sup> no nicho medular, como VCAM-1 (LEVESQUE *et al.*, 2001), c-Kit (LEVESQUE *et al.*, 2003), SFC (HEISSIG *et al.*, 2002), SDF-1 $\alpha$  (PETIT *et al.*, 2002).

Outras evidências apontam que a interação entre o Fator Derivado de Células Estromais Alfa-1 (SDF-1 $\alpha$ ) e seu receptor cognato, o CXCR4, gera sinais que regulam o tráfico de CTH na medula óssea (PELUS *et al.*, 2002). O SDF-1 $\alpha$  é uma quimiocina produzida constitutivamente pelas células estromais da medula óssea e tem demonstrado regular a adesão destas células, sua sobrevivência e estado do ciclo celular (KAWABATA *et al.*, 1999; QING; JONES; SPRINGER, 1999).

Lapidot; Petit (2002), propõem um modelo no qual o G-CSF induz a baixa regulação do gene SDF-1 $\alpha$  pelas células estromais, e de maneira oposta, uma super regulação na expressão dos genes das enzimas Metaloproteinase-9, Neutrófilo-elastase (NE) e Catepsina G, que atuam na clivagem da ligação do SDF-1 $\alpha$  ao seu receptor CXCR4, resultando na mobilização de células CD34<sup>+</sup> da medula óssea para o sangue periférico.

No entanto, embora o G-CSF seja atualmente o agente mais comumente utilizado para a mobilização de células-tronco hematopoiéticas, por causa da sua potência e relativa segurança, uma minoria de pacientes não conseguem mobilizar um número adequado de CTH

com o uso do G-CSF, muitas vezes resultante de idade avançada ou extensa quimioterapia (MORRIS *et al.*, 2003; PEREA *et al.*, 2001).

Em consistência com dados encontrados na literatura, no presente estudo demonstrou-se que o G-CSF foi capaz eficientemente de mobilizar as células CD34<sup>+</sup>. Nos grupos dos animais que foram tratados diariamente com PBS durante 04 dias, e administrados no 5º dia uma dose de G-CSF, não foi observado um valor estatístico significativo em relação à quantidade de CTH no sangue periférico. Entretanto, nos animais que receberam esse mesmo tratamento diário com G-CSF, percebeu-se um aumento estatisticamente significativo nessas células. Dessa forma, evidencia-se que o G-CSF parece agir de forma dose-dependente, sendo necessárias no mínimo 04 doses diárias, para obtenção do número suficiente dessas células para a circulação em modelo experimental.

Em contraste ao mecanismo de ação do G-CSF, Levesque *et al.*, (2004), sugerem um modo alternativo de mobilização em que ocorre uma inibição direta e reversível, sem clivagem proteolítica, de forma competitiva, pelo receptor CXCR4, ocasionando também uma rápida mobilização de células CD34<sup>+</sup> para a circulação, como no caso do agente não-peptídico AMD3100 (Plerixafor®).

O AMD3100 é um agente mobilizante promissor que tem demonstrado eficácia na mobilização de células-tronco hematopoiéticas autólogas em pacientes com Linfoma não-Hodgkin (LNH) e Mieloma Múltiplo (MM). Em Fase III de estudo com 13 pacientes com LNH e MM, observou-se um aumento em média de 06 vezes na contagem de células CD34<sup>+</sup> no sangue periférico desses pacientes, 06 horas após a administração do AMD3100 (240 µg/kg) (DEVINE *et al.*, 2004). Em nossos estudos, pode-se observar uma alta quantidade de células CD34<sup>+</sup> na circulação, 60 minutos após a administração de uma única dose (5 mg/kg) de AMD3100 em camundongos pré-tratados com PBS durante 04 dias.

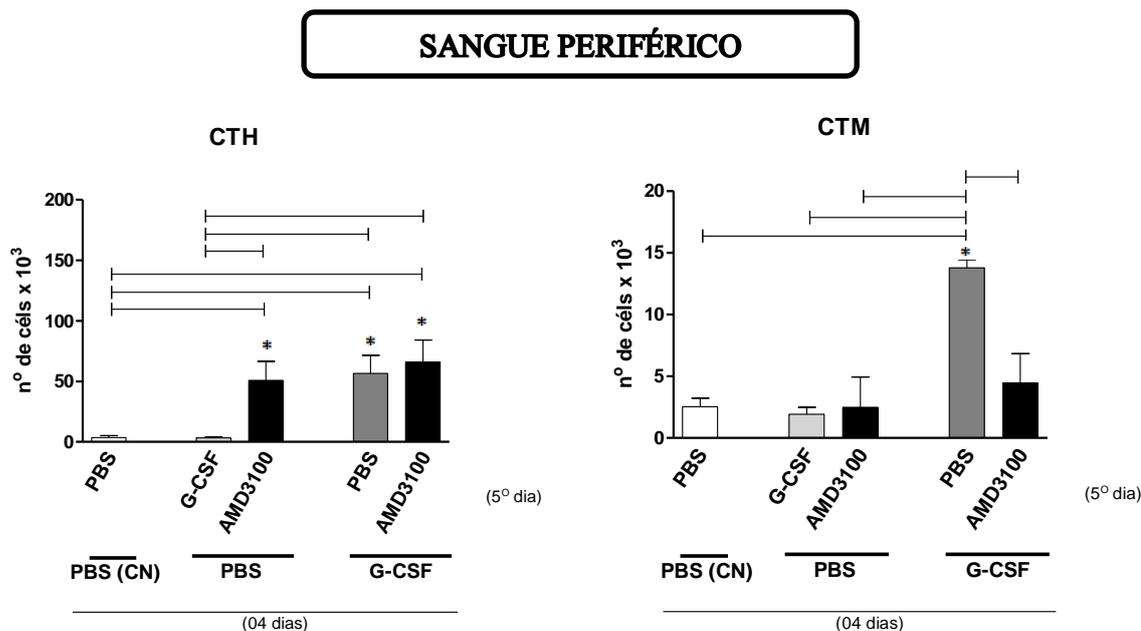
Donahue *et al.*, (2009), demonstraram que apesar do G-CSF e o AMD3100 promoverem a migração de células CD34<sup>+</sup> da medula óssea para o sangue periférico, a expressão de um grande número de genes é diferente entre essas células mobilizadas por esses dois agentes. Os resultados demonstraram que nas células CD34<sup>+</sup> mobilizadas por G-CSF há uma expressão de genes de neutrófilos e fagócitos mononucleares, além de níveis elevados de *miR-155*, que é expresso durante o amadurecimento de células dendríticas. Em contraste com as células CD34<sup>+</sup> mobilizadas pelo AMD3100, que foram propensas na expressão de genes de células B, T e mastócitos. Estes dados sugerem que o G-CSF mobiliza em maior proporção

células CD34<sup>+</sup> que estão comprometidas com diferenciação na linhagem mielóide, enquanto aquelas mobilizadas pelo AMD3100 são mais susceptíveis à linhagem linfóide e mastócitos.

Atualmente, células-tronco (CD34<sup>+</sup>) presentes no sangue periférico são coletadas, de forma autóloga, após mobilização com G-CSF ou em combinação com quimioterapia. No entanto, uma proporção significativa de pacientes não conseguem mobilizar estas células de maneira suficiente para coleta por aférese. Pusic *et al.*, 2008, demonstraram em estudos que cerca de 26% de pacientes com linfoma não-Hodgkin (NHL) e Linfoma Hodgkin (LH), e cerca de 6% de pacientes com Mieloma Múltiplo (MM), que fizeram uso do G-CSF, obtiveram insucesso na quantidade de células CD34<sup>+</sup> na circulação.

Alguns trabalhos têm sugerido que a utilização do G-CSF associado ao AMD3100 é eficaz em relação à mobilização de células CD34<sup>+</sup> (FLOMENBERG *et al.*, 2005; FRUEHAUF *et al.*, 2009). Em nossos resultados não se percebeu de forma significativa um aumento na quantidade de CTH no sangue periférico dos animais que fizeram uso da associação do G-CSF com o AMD3100, em relação aos animais tratados com PBS e administrados uma única dose de AMD3100, ou nos animais que receberam doses diárias (04 dias) de G-CSF (**Figura 01**).

FIGURA 01.



**Figura 01.** Protocolo experimental: os camundongos foram tratados com PBS (Controle Negativo – CN) ou G-CSF diariamente por 4 dias. 24 horas após a última injeção, foi administrado nos camundongos PBS, G-CSF ou AMD3100. 60 minutos após foi coletado sangue periférico através do plexo ocular dos animais para análise das células por citometria de fluxo. n=9 camundongos por grupo em triplicata. Para esta análise, foi utilizando o teste de análise de variância *ANOVA One-way*, com pós-teste de comparação múltipla de *Tukey's*. Os dados foram considerados significativos  $p < 0.05$ , representado “—” (CTH \* $p=0,0002$ ; CTM \* $p<0,0001$ ).

## REFERÊNCIAS

1. Abdelhay, ESWF; Paraguacu-braga, FH; Binato, R; Bouzas, LFS. **Hematopoietic stem cells: expansion and perspectives for therapeutic use.** *Rev Bras de Hematologia e Hemoterapia.* 31:2–8, 2009.
2. Adegani, FJ; Langroudi, L; Arefian, E; Shafiee, A; Dinarvand, P; Soleimani, M. **A comparison of pluripotency and differentiation status of four mesenchymal adult stem cells.** *Mol Biol Rep.* 40(5):3693–703, 2013.
3. Akashi, K; Traver, D; Miyamoto, T; Weissman, IL. **A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.** *Nature.* 404:193–7, 2000.
4. Brehm, M; Zeus, T; Strauer BE. **Stem cells - clinical application and perspectives.** *Herz.* 27:611–20, 2002.
5. Devine, SM; Flomenberg, N; Vesole, DH; Liesveld, J; Weisdorf, D; Badel, K. **Rapid mobilization of CD34+ cells following administration of the CXCR4 antagonist AMD3100 to patients with multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma.** *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 22(6):1095–102, 2004.
6. Donahue, RE; Jin, P; Bonifacino, AC; Metzger, ME; Ren, J; Wang, E. **Plerixafor (AMD3100) and granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) mobilize different CD34+ cell populations based on global gene and microRNA expression signatures.** *Blood.* 114(12):2530–41, 2009.
7. Fibbe, WE; Van Damme, J; Billiau, A; Duinkerken, N; Lurvonnk, E; Ralph, P; Altrock, BW; Kaushansky, K; Willemze, R; Falkenburg, JH. **Human fibroblasts produce granulocyte-CSF, macrophage-CSF, and granulocyte-macrophage-CSF following stimulation by interleukin-1 and poly(rI).poly(rC).** *Blood.* 72(3):860-866, 1988.
8. Flomenberg, N; Devine, SM; DiPersio, JF; Liesveld, JL; McCarty, JM; Rowley, SD. **The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone.** *Blood.* 106(5):1867–74, 2005.
9. Fruehauf, S; Veldwijk, MR; Seeger, T; Schubert, M; Laufs, S; Topaly, J; Wuchter, P; Dillmann, F; Eckstein, V; Wenz, F; Goldschmidt, H; Ho, AD; Calandra, G. **A combination of granulocyte-colony-stimulating factor (G-CSF) and plerixafor**

- mobilizes more primitive peripheral blood progenitor cells than G-CSF alone: results of a European phase II study.** *Cytotherapy*. 11(8):992-1001, 2009.
10. Hawkins, ED; Lo Celso, C. **Subdivision of bone marrow microenvironments: purpose built homes for haematopoietic stem cells.** *EMBO J*. 32(2):176–7, 2013.
  11. Heissig, B; Hattori, K; Dias, S; Friedrich, M; Ferris, B; Hackett, NR. **Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of Kit-ligand.** *Cell*. 109(5):625–37, 2002.
  12. Kawabata, K; Ujikawa, M; Egawa, T; Kawamoto, H; Tachibana, K; Iizasa, H. **A cell-autonomous requirement for CXCR4 in long-term lymphoid and myeloid reconstitution.** *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(10):5663–7, 1999.
  13. Kondo, M; Weissman, IL; Akashi, K. **Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.** *Cell*. 91:661–72, 1997.
  14. Lapidot, T; Petit, I. **Current understanding of stem cell mobilization: The roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells.** *Exp Hematol*. 30(9):973–81, 2002.
  15. Lévesque, JP; Takamatsu, Y; Nilsson, SK; Haylock, DN; Simmons, PJ. **Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor.** *Blood*. 98(5):1289–97, 2001.
  16. Lévesque, JP; Hendy, J; Takamatsu, Y; Simmons, PJ; Bendall, LJ. **Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by G-CSF or cyclophosphamide.** *J Clin Invest*. 111(2):187-96, 2003.
  17. Lévesque, JP; Liu, F; Simmons, PJ; Betsuyaku, T; Senior, RM; Pham, C. **Characterization of hematopoietic progenitor mobilization in protease-deficient mice.** *Blood*. 104(1):65–72, 2004.
  18. Li, T; Wu, Y. **Paracrine Molecules of Mesenchymal Stem Cells for Hematopoietic Stem Cell Niche.** *Bone Marrow Research*. 2011:1–8, 2011.

19. Méndez-Ferrer, S; Frenette, PS. **Hematopoietic stem cell trafficking: Regulated adhesion and attraction to bone marrow microenvironment.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1116:392–413, 2007.
20. Mendrone, AJ. **Sangue periférico como fonte de células para terapia celular.** *Rev. Bras de Hematologia e Hemoterapia.* 31:19-24, 2009.
21. Möhle, R; Murea, S; Kirsch, M; Haas, R. **Differential expression of L-selectin, VLA-4, and LFA-1 on CD34+ progenitor cells from bone marrow and peripheral blood during G-CSF-enhanced recovery.** *Exp Hematol.* 23(14):1535–42, 1995.
22. Morris, CL; Siegel, E; Barlogie, B; Cottler-Fox, M; Lin, P; Fassas A. **Mobilization of CD34+ cells in elderly patients ( $\geq 70$  years) with multiple myeloma: Influence of age, prior therapy, platelet count and mobilization regimen.** *Br J Haematol.* 120(3):413–23, 2003.
23. Pelus, LM; Horowitz, D; Cooper, SC; King, AG. **Peripheral blood stem cell mobilization - A role for CXC chemokines.** *Crit Rev Oncol Hematol.* 43(3):257–75, 2002.
24. Perea, G; Sureda, A; Martino, R; Altés, A; Martínez, C; Cabezudo, E. **Predictive factors for a successful mobilization of peripheral blood CD34+ cells in multiple myeloma.** *Ann Hematol.* 80(10):592–7, 2001.
25. Petit, I; Szyper-Kravitz, M; Nagler, A; Lahav, M; Peled, A; Habler, L. **G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4.** *Nat Immunol.* 3(7):687–94, 2002.
26. Pitchford, SC; Furze, RC; Jones, CP; Wengner, AM; Rankin, SM. **Differential mobilization of subsets of progenitor cells from the bone marrow.** *Cell Stem Cell.* 4(1):62–72, 2009.
27. Pusic, I; Jiang, SY; Landua, S; Uy, GL; Rettig, MP; Cashen, AF. **Impact of Mobilization and Remobilization Strategies on Achieving Sufficient Stem Cell Yields for Autologous Transplantation.** *Biol Blood Marrow Transplant.* 14(9):1045–56, 2008.

- 
28. Qing, M; Jones, D; Springer, TA. **The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment.** *Immunity*. 10(4):463–71, 1999.
29. Ren, G; Zhao, X; Zhang, L; Zhang, J; L’Huillier, A; Ling, W. **Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression.** *J Immunol*. 184:2321–2328, 2010.
30. Vilas-Boas, F; Feitosa, GS; Soares, MPB; Mota, A; Pinho-filho, JA; Almeida, AJG; Andrade, MV; Carvalho, HG; Dourado-oliveira, A; Ribeiro dos Santos, R. **Resultados Iniciais do Transplante de Células de medula óssea para o miocárdio de pacientes com Insuficiência cardíaca de Etiologia Chagásica.** *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 87(2): 159-166, 2006.