

RITA DE CÁSSIA CARVALHO MELO

EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE CXCR7 EM SÍNDROMES  
MIELODISPLÁSICAS E LEUCEMIAS

CAMPINAS

2012





---

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE CXCR7 EM SÍNDROMES  
MIELODISPLÁSICAS E LEUCEMIAS

RITA DE CÁSSIA CARVALHO MELO

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Ciências, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sara Teresinha Olalla Saad.

CAMPINAS, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**  
Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

M491e      Melo, Rita de Cássia Carvalho, 1988-  
              Expressão e Função de CXCR7 em síndromes  
              mielodisplásicas e leucemias. / Rita de Cássia Carvalho  
              Melo. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Sara Teresinha Olalla Saad  
Coorientador : Carolina Louzão Bigarella  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Expressão Gênica. 2. Receptores CXCR4. 3.  
Migração. I. Saad, Sara Teresinha Olalla II. Bigarella,  
Carolina Louzão. III. Universidade Estadual de  
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês: Expression and function of CXCR7 in myelodysplastic syndromes and leukemias**

**Keywords:**

- Gene expression
- Receptors, CXCR4
- Migration

*Titulação: Mestre em Ciências*

*Banca examinadora:*

**Profª. Drª. Sara Teresinha Olalla Saad [orientador]**  
**Profª. Drª. Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille**  
**Profª. Drª. Karin Spat Albino Barcellos Silveira**

**Data da defesa: 27-02-2012**

---

## Banca examinadora de Tese de Mestrado

---

Rita de Cássia Carvalho Melo

---

Orientador(a): Prof. Dr. Sara Teresinha Olalla Saad

---

---

<b>Membros:</b>
Professor (a) Doutor (a) Maria de Lourdes Lopes F. Chauffaille
Professor (a) Doutor (a) Karin Spat Albino Barcellos Silveira
Professor (a) Doutor (a) Sara Teresinha Olalla Saad

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

---

**Data: 27/02/2012**

---



## **Dedicatória**

*Dedico este trabalho a todos que me incentivaram nesta etapa da minha vida principalmente meus pais, David e Izilda e meu irmão Thiago, sem eles nenhum sonho seria possível ou valeria a pena.*



## ***Agradecimentos***

Agradeço a Deus pelas oportunidades que me foram dadas na vida, principalmente por ter conhecido pessoas e lugares interessantes, mas também por ter vivido fases difíceis, que foram matérias-primas de aprendizado.

Não posso deixar de agradecer aos meus pais, David e Izilda, sem os quais não estaria aqui, e por terem me oferecido condições para me tornar a profissional e a mulher que sou.

Ao meu irmão Thiago, pelo grande companheirismo e ensinamento de diversas coisas da vida.

Aos meus familiares, que sempre acreditaram no meu potencial e se orgulham muito de mim.

A Prof<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sara Teresinha Olalla Saad por sua grande orientação, apoio, confiança em mim para a realização deste trabalho e principalmente por ter me aceitado em seu laboratório quando eu mais precisava e permitir iniciar minha carreira com ensinamentos essenciais, que levarei por toda vida.

A Dr.<sup>a</sup> Carolina Bigarella pelos seus cuidados, amizade, ensinamentos, paciência, dedicação e conselhos que foram fundamentais para a minha formação acadêmica.

A Dr.<sup>a</sup> Fabiola Traina, por sua disponibilidade para me ajudar sempre que eu precisei.

A Dr.<sup>a</sup> Mariana Baratti, Laure e Karla pela amizade, ajuda e bancadas compartilhadas.

A Dr.<sup>a</sup> Patrícia Favaro e Dr.<sup>a</sup> Mariana Lazarini pelos conselhos e ajuda no final do segundo tempo.

A Dra. Letícia e Dr.<sup>a</sup> Karin pelas críticas feitas à minha qualificação, que me ajudaram a melhorar este trabalho.

A Tereza Sueko pela ajuda essencial no laboratório e pelos ensinamentos.

As secretárias Patrícia e a Raquel pelo auxílio e orientação.

Aos meus amigos, Luciene, Kassandra, Thiago, Luciano, Hélio, Felipe, Manoella pela paciência, carinho e por entenderem os meus nervosos repentinos este ano.

A minha grande amiga Bruna, que felizmente tive a oportunidade de conhecer no mestrado, além de companheira profissional passou a ser a minha confidente, amiga de saídas, viagens, aventuras, e que aventuras.

Aos amigos do laboratório, Juliana, João, Fernanda, Victor, Tiago, Isabela, Matheus, Anamika, João Kleber, Pedro, Gisele, Vanessa e Daniella pela oportunidade de compartilhar as experiências e o carinho.

Aos funcionários Fernanda, Luis, Simone, Renata, Janine, Lena, Irene e Ana Leda e Audrey por me auxiliarem durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao departamento de estatística da FCM pela ajuda prestada.

Aos membros da banca examinadora da minha defesa, por aceitarem fazer parte desta grande etapa da minha vida.

As agências financiadoras FAPESP, CNPQ e INCT do sangue.

## ***Epílogo***

*“Aprende com teus erros, tenha humildade, reconheça o valor das pessoas, seja honesto e creia em Deus. Provavelmente você será feliz agora...”.*

***Fernando Toscano***



## **Resumo**

A medula óssea é constituída por microambientes específicos denominados “nichos”. O fator SDF-1 (*Stromal derived factor-1*) foi identificado como um importante fator quimioatrativo produzido por células estromais da medula óssea. Sua ação sobre seu receptor CXCR4 desempenha função primordial na migração, retenção e desenvolvimento dos progenitores hematopoiéticos na medula óssea. Células leucêmicas mielóides e linfóides expressam CXCR4 e aproveitam-se disso para acessar nichos medulares normalmente restritos às células progenitoras, passando a residir em microambientes que propiciam sobrevivência e proliferação. Recentemente foi descoberto que o receptor CXCR7 é capaz de se ligar ao SDF-1. Ele é expresso em várias linhagens tumorais, mas em células hematopoiéticas seu papel é ainda pouco explorado. Em vista da escassez de dados na literatura o objetivo deste trabalho foi investigar a expressão e função de CXCR7 em síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas. Neste estudo, foi mostrado que a expressão gênica de CXCR7 foi significativamente maior em leucemia linfoblástica aguda (LLA) em comparação com síndrome mielodisplásica (SMD), leucemia mielóide aguda (LMA) e indivíduos controles ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney). A proteína CXCR7 também foi mais expressa em linhagens celulares linfoblástica T (Molt-4 e Jurkat) em comparação com linhagens mielóides.

Em células linfoblásticas T, a localização subcelular de CXCR7 e CXCR4 por microscopia confocal e citometria de fluxo evidenciou CXCR7 mais próximo à membrana das células Molt-4 e mais frequentemente no citoplasma de células Jurkat enquanto CXCR4 está na membrana de ambas as linhas celulares. Curiosamente, notamos também que, depois da indução de SDF-1, células Molt-4 têm maior capacidade migratória comparada com Jurkat (mediana Molt 4 =  $52,0 \pm 5$  vs Jurkat =  $24,1 \pm 3$ ,  $p = 0,0079$ , teste de Mann-Whitney), que pode estar relacionado com a disponibilidade de membrana de CXCR7. Além disso, a inibição da CXCR7 ou CXCR4 resultou em mudanças significativas na resposta migratória de Molt4 e Jurkat ( $p < 0,05$  Mann-Whitney), no entanto, a inibição de ambos, CXCR7 e CXCR4 resultou em uma redução mais significativa na migração celular ( $p = 0.0079$ /Molt-4;  $p = 0.0043$ /Jurkat, Mann-Whitney).

Uma vez que é bem estabelecido que células CD34+ de pacientes com SMD não são atraídas pelo gradiente de SDF-1, apesar de terem expressão normal de CXCR4, nos interessou investigar qual a localização de CXCR4 nas células SMD e se esta irresponsividade estava associada a CXCR7. Linhagens mielóides P39 e U937 foram usadas como modelo de SMD e LMA, respectivamente. Foram encontrados níveis similares de expressão de CXCR4 e CXCR7 em ambas as linhagens celulares, no entanto encontramos que CXCR4 está localizado no citoplasma de células P39 enquanto ele está na membrana das células U937.

Uma vez que a proteína quinase C isotipo zeta (PKC $\zeta$ ) está relacionada com a sinalização SDF-1/CXCR4 aumentando a expressão de CXCR4 e sua disponibilidade na membrana, resolvemos trabalhar também com células P39 hiperexpressando PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$ wt). Este procedimento resultou na translocação de CXCR4 para a membrana de células P39, mas não alterou a localização subcelular de CXCR7. Ensaio de migração por tranwell mostraram que células P39 PKC $\zeta$ wt apresentam maior capacidade de migração em relação a SDF-1 em comparação com células P39 controle (aumento de 35 vezes pcDNA3 PKC- $\zeta$ -HA vs pcDNA3 transfectadas células P39, p = 0,0032, Mann-Whitney), sugerindo que a PKC $\zeta$  restaura a capacidade quimiotática de células P39.

Aumento da expressão de CXCR7, como aqui observado em células leucemicas linfoblásticas, é um fenômeno já descrito em uma variedade de linhagens de células tumorais sólidas, tais como cérebro, próstata e pulmão. Em tumores sólidos, CXCR7 principalmente aumenta a proliferação de células malignas. Estes resultados sugerem que a função biológica de CXCR7 depende tecido e órgãos que ele está localizado e que, na leucemia linfoblástica aguda pode ter um papel na migração de células, potencializando a resposta de CXCR4 a SDF-1 e, portanto, poderia contribuir para o recrutamento de células leucêmicas para nichos uma vez já ocupados por células-tronco hematopoéticas normais. Além disso, nossos resultados levam a crer que um defeito na via PKC $\zeta$ /CXCR4 está envolvido com a irresponsividade de células SMD a SDF-1, gerando uma hematopoese ineficaz. E confirma dados que sugerem que PKC $\zeta$  é uma proteína central na via de

sinalização SDF-1/CXCR4, muito importante para a migração de células hematopoéticas malignas.



## **Abstract**

Bone marrow is constituted of specific microenvironments called "niches". The factor SDF-1 (stromal derived factor-1) was identified as an important chemoattractant factor produced by bone marrow cells. SDF-1 acts on its receptor CXCR4 and plays primordial function in migration, retention and development of hematopoietic progenitors in bone marrow. CXCR4 is expressed in leukemic cells and enables them to access marrow niches that normally are restricted to quiescent stem cells, thereby ensuring its protection from cell death resulting in a worse prognosis. Recently, CXCR7 was identified as another SDF-1-binding receptor, but its contribution to SDF-1 – mediated effects in hematopoietic cells is still poorly explored, even though the CXCR7 relationship with tumor progression in non-hematopoietic malignancies is well established. Given that there is little information regarding CXCR7 we investigated its function and expression in MDS and acute leukemias. This work, was showed that CXCR7 is significantly higher expressed in ALL compared to MDS, AML and control subjects ( $p < 0.0001$ , Mann-Whitney test). CXCR7 protein is also higher expressed in lymphoblastic cell lines (Molt-4 and Jurkat) compared with myeloid cells.

In lymphoblastic cell lines, the subcellular location of CXCR7 and CXCR4 by confocal microscopy and flow cytometry evidenced CXCR7 closer in the membrane of Molt-4 cells and more frequently in the cytoplasm of Jurkat cells whereas CXCR4 was in the membrane of both cell lines. Interestingly, we also noticed that, after SDF-1 induction, Molt-4 cells have higher chemotactic ability compared with Jurkat (median Molt 4 =  $52.0 \pm 5$  vs Jurkat =  $24.1 \pm 3$ ,  $p = 0.0079$ , Mann-Whitney test) which may be related with the membrane availability of CXCR7. In addition, the inhibition of CXCR7 or CXCR4 resulted in significant changes in Molt4 and Jurkat chemotactic response ( $p < 0,05$ , Mann-Whitney test), however, the inhibition of both CXCR7 and CXCR4 resulted in a more significant reduction in cell migration ( $p = 0.0079$ /Molt-4;  $p = 0.0043$ /Jurkat, Mann-Whitney test).

Since it is well established that CD34<sup>+</sup> progenitor cells from patients with myelodysplastic syndromes (MDS) are not attracted by gradient of SDF-1 despite of having CXCR4 normal expression, we addressed if MDS cells have an abnormal localization of

CXCR4 or association with CXCR7. P39 and U937 cell line were used as a model of MDS and AML, respectively. Similar expression levels of CXCR4 and CXCR7 in both cell lines however we found, by confocal microscopy and flow cytometry, that CXCR4 was localized in the cytoplasm of P39 cells while it was in the membrane of U937 cells.

Since the protein kinase C (PKC $\zeta$ ) is related to the SDF-1/CXCR4 signaling by increasing CXCR4 expression and its membrane availability, we decided to work with cells P39 overexpressing PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$ wt). This procedure resulted in translocation of CXCR4 to the membrane of P39 cells but did not change the CXCR7 subcellular localization. Transwell chemotaxis assay showed that P39 cells overexpressing PKC $\zeta$  displayed higher chemotactic ability upon SDF-1 treatment compared with control P39 (35 fold increase pcDNA3-PKC $\zeta$ -HA vs pcDNA3-HA transfected P39 cells, p=0.0032; Mann-Whitney), suggesting that PKC $\zeta$  restored the chemotactic capacity of P39 cells.

Increased expression of CXCR7, as here observed in lymphoblastic leukemia cells, is a phenomenon already described in a variety of solid tumor cell lines such as brain, prostate and lung. In solid tumors, CXCR7 mainly increases the proliferation of malignant cells. These results suggest that the biological function of CXCR7 depends on its tissue and organ localization and that, in acute lymphoblastic leukemia may have a role in cell chemotaxis, potentiating CXCR4 response to SDF-1 and thus, could contribute for leukemia initiating cell recruitment to niches once occupied by normal hematopoietic stem cells. Furthermore, our results lead us to believe that a defect in the PKC $\zeta$ /CXCR4 pathway is involved with the unresponsiveness of MDS cells to SDF-1, generating an ineffective hematopoiesis. It confirms data that suggest that PKC $\zeta$  is a central protein in the SDF-1/CXCR4 signaling pathway, important for the migration of malignant hematopoietic cells.

## ***Lista de Abreviaturas***

Akt - *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*  
AR – Anemia refratária  
AREB - Anemia refratária com excesso de blastos  
AREBt - Anemia refratária com excesso de blastos em transformação  
ARSA - Anemia refratária com sideroblastos em anel  
cAMP - *cyclic adenosine monophosphate*  
CE - Células endoteliais associadas ao tumor  
cDNA - *complementary DNA*  
CRDM - Citopenia refratária com displasias múltiplas  
CRDMSA - Citopenia refratária com displasias múltiplas e blastos em forma de anel  
CXCL12 - (*CXC motif*) *chemokine ligand 12*  
CXCR4 - *CXC chemokine receptor type 4*  
CXCR7 - *CXC chemokine receptor type 7*  
DAG - *Diacylglycerol*  
DNA - *Desoxiribonucleic Acid*  
ERK - *Extracellular signal-regulated kinase*  
FAB - *French-American-British*  
GPCRs - *G protein-coupled receptors*  
GRK - *G protein-coupled receptor kinase*  
HSCs - *Hematopoietic stem cells*  
IPSS - *Internacional Prognostic Score System*  
IP3 - *Inositol 1,4,5-triphosphate*  
ITAC - *Interferon-inducible T cell a chemoattractant*  
JNK - *c-Jun N-terminal kinase*  
LLA - Leucemia linfoblástica aguda  
LLC - Leucemia linfoblástica crônica  
LMA - Leucemia mieloide aguda  
LMC - Leucemia mieloide crônica  
LMMC - Leucemia mielomonocítica crônica  
MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*  
MMP9 - *Matrix metalloproteinase 9*  
MOI - *Multiplicity of infection*  
MON - Medula óssea normal  
PCR - *Polymerase Chain Reaction*  
PE - *Phycoerythrin*  
PI3K - *Phosphoinositide-3-kinase*  
PKC - *Protein kinase C*  
PKC $\zeta$ wt - *Protein kinase C type zeta wild type*  
PLC - *Phospholipase C*  
Rac – *Rac protein-kinase*  
RNA - *Ribonucleic Acid*  
SDF-1 - *Stromal cell-derived factor-1*  
shRNA - *Short harpin RNA*

siRNA - *RNA interference*  
SMD - Síndrome mielodisplásica  
SNC - Sistema nervoso central  
WHO - *World Health Organization*

## ***Lista de Tabelas***

Tabela 1. Características dos pacientes com diagnóstico de SMD.....	56
Tabela 2. Características dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda.....	57
Tabela 3. Descrição das linhagens leucêmicas .....	58
Tabela 4. Concentração e Sequência dos Iniciadores .....	65



## ***Lista de Figuras***

**Figura 1.** Microambiente medular. Na medula óssea, as células-tronco residem próximas aos osteoblastos no nicho osteoblástico ou adjacentes as células endoteliais no nicho vascular. Após cada divisão, 1 célula-filha deixa o osso para se proliferar e diferenciar em várias linhagens. Células-tronco e seus descendentes são cercados por células estromais derivadas de células-tronco mesenquimais, que também residem na cavidade óssea. Células-tronco mesenquimais dão origem a condrócitos, osteoblastos, fibroblastos, adipócitos, endotélio e miócitos. AOT: área óssea trabecular (Adaptado de Yin & Li, 2006).

.....38

**Figura 2.** Via SDF-1/CXCR4 em tumores sólidos. CXCL12 é hiperexpresso em tecidos normais como pulmões, fígado e medula óssea e também é secretado por células tumorais e estromais. Interações SDF-1/CXCR4 induzem a liberação do fator de crescimento endotelial vascular, o aumento da permeabilidade vascular, e recrutamento de macrófagos associados ao tumor e promovem a angiogênese tumoral. Células tumorais que hiperexpressam CXCR4 migram em direção ao gradiente quimioatrativo e fazem *homing* para órgãos que liberam CXCL12 (Adaptado de Woodard & Nimmagadda, 2011). .... 41

**Figura 3.** Via CXCL12. CXCL12 se liga a CXCR4 e CXCR7, que são GPCRs que podem formar homo e heterodímeros. Neste último caso, CXCR7 muda a conformação do complexo CXCR4/proteína G e modula a sinalização desse receptor. A ativação de CXCR4 por CXCL12 leva o acoplamento a proteína G e sinalização através das vias PI3K/Akt, IP3, e MAPK, que promovem a sobrevivência celular, proliferação, e quimiotaxia. Além disso, a via  $\beta$ -arrestina pode ser ativada através de GRK para internalizar CXCR4. Quando CXCL12 se liga a CXCR7 a clássica mobilização de  $Ca^{+}$  não ocorre, e a ativação da via  $\beta$ -arrestina pode levar à eliminação de CXCL12. Em determinadas células cancerígenas (por exemplo, gliomas), CXCR7 pode sinalizar através de PLC/MAPK aumentando a sobrevivência das células (Adaptado de Duda *et al.* 2011). ..... 46

**Figura 4.** Via de sinalização SDF-1/CXCR4. A ativação de proteínas à jusante do receptor CXCR4 (proteínas G e PI3K) resulta na ativação da proteína quinase C isotipo

zeta (PKC  $\zeta$ ). PKC $\zeta$  ativa, por sua vez irá modular uma série de eventos tais como proliferação, adesão celular e quimiotaxia, bem como controlar a expressão membranar de CXCR4 (Adaptado de Petit *et al.*, 2005). ..... 48

**Figura 5.** Gel de agarose denaturante a 1,2% de RNA total. As setas indicam as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A presença das subunidades é indicativa do grau de integridade da amostra. .... 62

**Figura 6.** Produtos resultantes do PCR para amplificação de  $\beta$ 2-microglobulina visualizados em gel de agarose. 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controle negativo, 3 – 8: amplicons. As setas indicam a presença da banda de 300 pb correspondente ao amplicon de  $\beta$ 2 –microglobulina. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida. .... 63

**Figura 7.**  $\Delta$ Rn e ciclos de amplificação do gene *CXCR7*. As curvas de amplificação são ilustradas na figura. O eixo y indica o  $\Delta$ Rn (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos. .... 73

**Figura 8.** Curva de dissociação do *CXCR7* baseada na temperatura de anelamento. As temperaturas resultantes da curva de dissociação estão demonstradas na figura. A presença de apenas um pico na curva demonstra a especificidade dos iniciadores. .... 74

**Figura 9.** Curvas de eficiência de *CXCR7*. A figura ilustra os 5 pontos obtidos no teste de eficiência. O eixo y indica o Ct e o eixo x a concentração do cDNA utilizado. Ambos os iniciadores apresentaram 100% de eficiência e uma inclinação de -3,32. .... 75

**Figura 10.** Testes de Compatibilidade de *CXCR7* com *GAPDH* (A) e *HPRT* (B). O eixo y indica os valores de  $\Delta$ Ct obtidos na fórmula Ct de *CXCR7* - Ct do controle endógeno, o eixo x indica o log das diluições de cDNA utilizadas no teste. Ao se traçar uma linha de tendência no gráfico se obtém a fórmula  $y=ax+b$ , que indica o valor de referência para a compatibilidade onde o valor de “a” deve ficar entre -0,1 e 0,1 para ser considerado compatível para análises. O valor de “a” para *GAPDH* (A) foi de -0,1101 e para *HPRT* (B) foi de 0,0152, valores muito próximos de 0,1 indicando boa compatibilidade entre ambos os endógenos para análises com *CXCR7*. .... 76

**Figura 11.** Expressão do RNAm de CXCR7 em células hematopoiéticas de doadores normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de MO de pacientes com diagnóstico de SMD (n=50), LMA (n=29) e LLA (n=11) ou de doadores normais (n=12). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de CXCR7. Uma amostra de doador normal foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de CXCR7 foi significativamente maior em pacientes com LLA, quando comparadas à expressão em células hematopoiéticas normais, SMD e LMA ( $P < 0.001$ ). Não foi observada diferença na expressão em pacientes com SMD e LMA quando comparados às células hematopoiéticas normais. Em adição, quando comparamos a expressão entre os pacientes de SMD e LMA também não encontramos diferença..... 77

**Figura 12.** Expressão de CXCR7 em células totais de medula óssea de pacientes com SMD, de acordo com as classificações franco-americana-britânica (FAB) (A) e Organização Mundial da Saúde (World Health Organization; WHO) (B) e de acordo com o sistema de índice prognóstico internacional (International Prognostic Scoring System, IPSS) (C). As linhas horizontais representam a mediana. Uma amostra de doador normal foi utilizada como calibradora ..... 78

**Figura 13.** Expressão de CXCR7 em células totais de medula óssea de pacientes com LLA. Pacientes com LLA-t apresentaram maior expressão de CXCR7 quando comparados com os demais subtipos, LLA-preB e LLA-B. .... 78

**Figura 14.** Expressão protéica de CXCR7 em células hematopoiéticas normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. Análise por Western Blot da expressão protéica de CXCR7 em células hematopoéticas normais (NL) [medula óssea normal (MON) (n=01) e células CD34 + de sangue periférico de doadores normais (NL) (n=4)] e de pacientes com SMD (n=01) e LMA (n=01). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-CXCR7 (42 kDa). Como controle da quantidade proteica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL Western Blot Analysis System. Note a ausência de expressão

proteica de CXCR7 nos paciente com SMD e LMA, em células de MO e células CD34+ de doadores normais..... 79

**Figura 15.** Expressão de CXCR7 e CXCR4 em linhagens leucêmicas. Análise por Western Blot da expressão das proteínas CXCR7 e CXCR4 em 50 µg de extratos de linhagens leucêmicas linfoblásticas (Molt-4, Jurkat, Raji e Daudi) e mieloides (U937, P39, K562, e KG-1). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-CXCR7 (42 kDa) e anti-CXCR4 (42kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL *Western Blot* Analysis System. Note a expressão protéica positiva de CXCR7 em todas as linhagens leucêmicas estudadas, porém apresentando-se mais expresso nas linhagens linfoblásticas T Molt-4 e Jurkat, enquanto que CXCR4 apresenta-se expresso em todas as linhagens. .... 80

**Figura 16.** Localização de CXCR7 e CXCR4 em linhagens linfoblásticas Molt-4 e Jurkat. Análise por Microscopia confocal da localização de CXCR7 e CXCR4 em linhagens leucêmicas linfoblásticas Molt-4 e Jurkat. Células previamente imobilizadas em lamínulas foram incubados com anticorpos primários anti-CXCR7 e anti-CXCR4 e anticorpos secundários anti-coelho 488 e anti-camundongo 555. As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 63X de imersão em óleo. Note a localização membranar e frequentemente citoplasmática em células Molt-4 e Jurkat, respectivamente. A expressão de CXCR4 mostrou-se mais frequentemente membranar em ambas as linhagens. .... 82

**Figura 17.** Localização de CXCR7 em linhagens linfoblásticas Molt-4 e Jurkat. Análise por citometria da localização de CXCR7 em linhagens leucêmicas linfoblásticas Molt-4 e Jurkat. Utilizamos esta técnica para demonstrar a diferença de localização encontrada entre as linhagens por microscopia confocal. Resultado foi considerado satisfatório, pois 98% das células Molt-4 apresentaram CXCR7 localizado na membrana citoplasmática, enquanto que 67% das células Jurkat apresentaram este mesmo receptor localizado no citoplasma... 83

**Figura 18.** Migração de células Molt-4 e Jurkat em resposta a SDF-1. Células Molt-4 e Jurkat foram submetidas a experimentos de migração em placas Transwell (Costar) por 24

horas, e células Jurkat apresentaram menor capacidade migratória em resposta a SDF-1 (+ SDF-1). A diferença na capacidade migratória entre as linhagens linfoblásticas é estatisticamente significativa (Mann-Whitney \* =  $P < 0,05$ ). ..... 84

**Figura 19.** ShRNA específico para CXCR7 mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de CXCR7 em células Molt-4 e Jurkat. A quantificação da expressão de CXCR7 nas células CXCR7 inibido em relação a células controle. Expressão dos níveis de CXCR7 foi normalizada pelos controles endógenos *HPRT* e *GAPDH* (A). Os resultados foram analisados usando  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . (B) Análise por Western Blot de extratos protéicos de células CXCR7 inibido e células controle. A membrana foi incubada com anticorpos anti-CXCR7 (42 kDa) ou anti-GAPDH (37 kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel. A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL Western Blot Analysis System. Os gráficos de barras representam a quantificação das intensidades de bandas. A expressão protéica de CXCR7 foi corrigida pela expressão de GAPDH correspondente (UN-SCAN-IT gel™ – 6.1). ..... 85

**Figura 20.** Migração de células Molt-4 controle, Molt-4 CXCR7 inibido, Molt-4 CXCR4 inibido, Molt-4 CXCR7 e CXCR4 inibidos e células Jurkat controle, Jurkat CXCR7 inibido, Jurkat CXCR4 inibido, Jurkat CXCR7 e CXCR4 inibidos em resposta a SDF-1. Células foram submetidas a experimentos de migração em placas Transwell (Costar) por 24 horas. A inibição de CXCR7 ou CXCR4 resultou na redução da capacidade migratória de ambas as linhagens linfoblásticas T, porém a inibição de ambos, CXCR7 e CXCR4 resultou em um efeito sinérgico (Mann-Whitney, \* e \*\* =  $P < 0,05$ ). ..... 87

**Figura 21.** Expressão protéica de CXCR7 e CXCR4 em células P39 controle e P39 PKC $\zeta$ wt. Análise por Western Blot da expressão das proteínas CXCR7 e CXCR4 em 50  $\mu$ g de extratos de células P39 e células P39 PKC $\zeta$ wt. Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-CXCR7 (42 kDa) e anti-CXCR4 (42 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL Western Blot Analysis System. Note a semelhança de expressão de CXCR7 e CXCR4 entre as

células P39 controle e P39 PKC $\zeta$ wt mostrando que a hiperexpressão de PKC $\zeta$  não altera a expressão dos receptores CXCR7 e CXCR4..... 88

**Figura 22.** Localização de CXCR7 e CXCR4 em células P39 e P39 PKC $\zeta$ wt. Análise por microscopia confocal da localização de CXCR7 e CXCR4 em células P39 e P39 PKC $\zeta$ wt. Células previamente imobilizadas em lamínulas foram incubados com anticorpos primários anti-CXCR7 e anti-CXCR4 e anticorpos secundários anti-coelho 488 e anti-camundongo 555. As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 63X de imersão em óleo. Note a localização citoplasmática de CXCR4 e CXCR7 em células P39 controle e a localização principalmente membranar em células P39 PKC $\zeta$ wt sugerindo que a hiperexpressão de PKC $\zeta$  promoveu o direcionamento dos receptores para a membrana das células P39..... 89

**Figura 23.** Migração de células P39 controle e P39 PKC $\zeta$ wt em resposta a SDF-1. Células P39 controle e P39 PKC $\zeta$ wt foram submetidas a experimentos de migração em placas Transwell (Costar) por 24 horas, e células P39 PKC $\zeta$ wt apresentaram maior capacidade migratória em resposta a SDF-1 (+ SDF-1). A diferença na capacidade migratória entre as células P39 controle e P39 PKC $\zeta$ wt é estatisticamente significativa (Mann-Whitney \* = P < 0,05)..... 90

**Figura 24.** Localização de CXCR7 e CXCR4 em células U937. Análise por Microscopia confocal da localização de CXCR7 e CXCR4 em células U937. Células previamente imobilizadas em lamínulas foram incubados com anticorpos primários anti-CXCR7 e anti-CXCR4 e anticorpos secundários anti-coelho 488 e anti-camundongo 555. As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 63X de imersão em óleo. Note a localização preferencialmente membranar de CXCR4 e localização citoplasmática de CXCR7 em células U937. .... 91

**Figura 25.** Expressão protéica de PKC $\zeta$  em células P39, U937, Molt-4 e Jurkat. Análise por Western Blot da expressão da proteína PKC $\zeta$  em 50  $\mu$ g de extratos de células P39,

U937, Molt-4 e Jurkat. Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-PKC $\zeta$  (68 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL Western BlotAnalysis System. Note a diferença de expressão de PKC $\zeta$  entre as células P39 e U937, estas células expressam mais esta proteína. Já entre as células Jurkat e Molt-4 não foi observada diferença de expressão desta proteína..... 92



## Sumário

<b>RESUMO</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIX</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XXI</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>XXIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>35</b>
1.1 O NICHOS MEDULAR .....	37
1.2 A VIA DE SINALIZAÇÃO SDF-1/CXCR4 .....	38
1.3 CXCR4 EM SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS.....	41
1.4 CXCR4 EM LEUCEMIAS AGUDAS.....	43
1.5 CXCR7, UM NOVO RECEPTOR PARA SDF-1.....	44
1.6 PROTEÍNA QUINASE C ISOTIPO ZETA, PKCz .....	46
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>49</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
<b>3. CASUÍSTICA</b> .....	<b>53</b>
3.1 CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS NORMAIS .....	55
3.2 CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS DE PACIENTES COM DIAGNÓSTICO DE MIELODISPLASIA E LEUCEMIA AGUDA.....	55
3.3 LINHAGENS CELULARES.....	57
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
4.1 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS .....	61
4.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	61
4.3 TRATAMENTO DO RNA TOTAL COM DNASE I.....	62

4.4 TRANSCRIÇÃO EM CDNA.....	62
4.5 PCR QUANTITATIVO (PCRQ) .....	64
4.6 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNA.....	65
4.7 WESTERN BLOT.....	65
4.8 IMUNOFLORESCÊNCIA E MICROSCOPIA CONFOCAL .....	66
4.9 CITOMETRIA DE FLUXO .....	67
4.10 TRANSDUÇÃO DE LENTIVÍRUS .....	68
4.11 TRATAMENTO COM O ANTAGONISTA DO RECEPTOR CXCR4 (AMD3100) ....	68
4.12 ENSAIO DE MIGRAÇÃO.....	68
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	69
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>71</b>
5.1 RESULTADOS DO ESTUDO DA EXPRESSÃO DE CXCR7 EM CÉLULAS HEMATOPOIÉTICAS NORMAIS, MIELODISPLÁSICAS E LEUCÊMICAS .....	73
5.1.1 Padronização para os iniciadores para CXCR7 .....	73
5.1.2 Seleção e verificação de compatibilidade entre CXCR7 e controles endógenos para normalização gênica.....	75
5.1.3 Análise da expressão gênica de CXCR7 em amostras de MO e pacientes com SMD, LMA e LLA, através da técnica de PCRq.....	76
5.1.4 Análise da expressão protéica de CXCR7 em amostras de MO e pacientes com SMD e LMA, através da técnica de Western Blot.....	79
5.1.5 Análise da expressão protéica de CXCR7 em linhagens leucêmicas, através da técnica de Western Blot .....	79
5.2 RESULTADOS DO ESTUDO DA FUNÇÃO DE CXCR7 EM LINHAGENS LINFOBLÁSTICAS E MIELOIDES .....	80
5.2.1 Avaliação da localização de CXCR7 e CXCR4 em células Molt-4 e Jurkat.....	80
5.2.2 Avaliação da migração em resposta a SDF-1 em células Molt-4 e Jurkat.....	83

5.2.3 Avaliação do silenciamento do CXCR7 em células Molt-4 e Jurkat por shRNA mediado por lentivírus.....	84
5.2.4 Avaliação do silenciamento do CXCR7 na migração de células Molt-4 e Jurkat em resposta a SDF-1 .....	85
5.2.5 Avaliação dos efeitos da hiperexpressão de PKC $\zeta$ na expressão de CXCR7 e CXCR4 em células P39.....	87
5.2.6 Avaliação dos efeitos da hiperexpressão de PKC $\zeta$ na localização de CXCR7 e CXCR4 em células P39 .....	88
5.2.7 Avaliação da hiperexpressão de PKC $\zeta$ na migração de células P39 em resposta a SDF-1.....	89
5.2.8 Avaliação da localização de CXCR7 e CXCR4 em células U937 .....	90
5.3 RESULTADOS DO ESTUDO DA FUNÇÃO DE CXCR7 EM LINHAGENS LINFOBLÁSTICAS E MIELOIDES .....	91
<b>6.DISSCUSSÃO.....</b>	<b>93</b>
<b>7.CONCLUSÃO.....</b>	<b>101</b>
<b>8.REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>113</b>

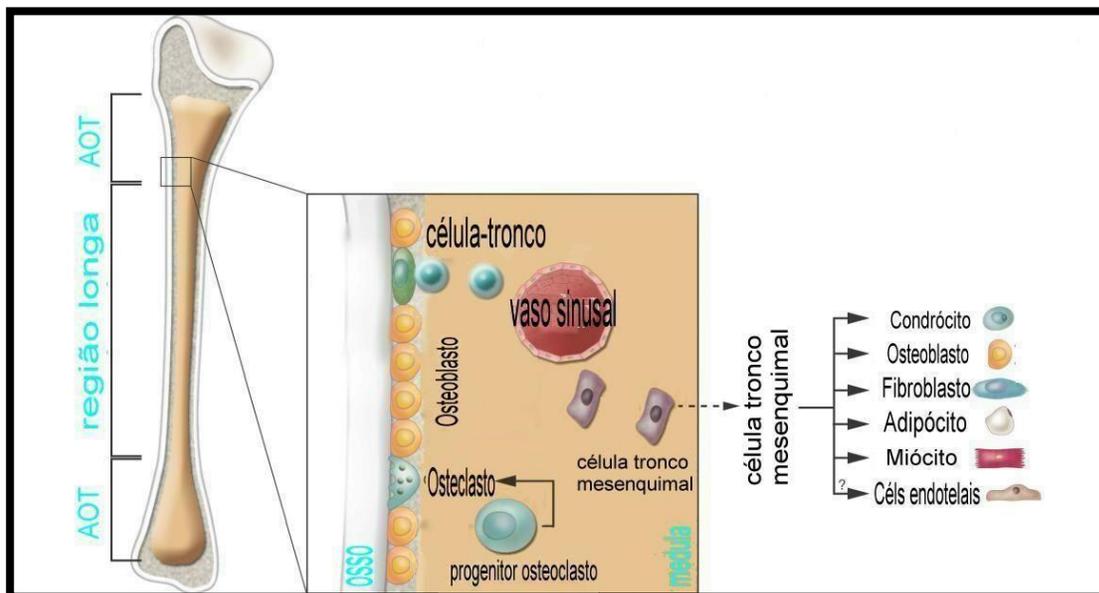


# ***1. Introdução***



## **1.1 O Nicho medular**

A hematopoese é um processo complexo envolvendo proliferação celular, diferenciação, morfogeneses, maturação funcional e morte celular. Ela ocorre no interior dos ossos, dentro dos espaços extravasculares entre os sinusóides e em contato com diversos tipos celulares que compõem o estroma hematopoético: células endoteliais, células acumuladoras de lipídios, macrófagos e células fibroblásticas. Esse ambiente proporciona microambientes medulares denominados “nichos”, cuja existência foi proposta por Schofield em 1978, são locais altamente específicos da medula óssea que modulam sobrevivência, proliferação e diferenciação das células progenitoras hematopoéticas por meio de contato direto entre as células do estroma e células hematopoiéticas ou de forma indireta por meio da liberação dos fatores de crescimento. A integridade destes dois sistemas, bem como a associação entre eles, são fatores cruciais para a manutenção da homeostase hematopoiética. O conceito de nicho é suportado por diversos trabalhos com experimentos de co-cultivo. Há pelo menos dois nichos distintos na medula óssea responsáveis pela manutenção dos precursores hematopoéticos: um nicho osteoblástico e um nicho vascular. Parte das células hematopoéticas se encontra em contato com as células da superfície endosteal, enquanto que outros progenitores se apresentam em contato com as células endoteliais dos sinusóides na medula óssea (Figura 1). A função principal do nicho das células-tronco hematopoéticas (HSCs) é manter o equilíbrio entre a auto-renovação celular e a diferenciação, pois o desequilíbrio pode levar à tumorigênese [1].



**Figura 1. Microambiente medular.** Na medula óssea, as células-tronco residem próximas aos osteoblastos no nicho osteoblástico ou adjacentes as células endoteliais no nicho vascular. Após cada divisão, 1 célula-filha deixa o osso para se proliferar e diferenciar em várias linhagens. Células-tronco e seus descendentes são cercados por células estromais derivadas de células-tronco mesenquimais, que também residem na cavidade óssea. Células-tronco mesenquimais dão origem a condrócitos, osteoblastos, fibroblastos, adipócitos, endotélio e miócitos. AOT: área óssea trabecular (Adaptado de Yin & Li, 2006).

Diversas moléculas de sinalização estão envolvidas na interação celular com o nicho, contribuindo para as características de cada função do nicho. Dentre as principais vias de sinalização está a interação entre a quimiocina *stromal cell derived factor-1* (SDF-1) e seu receptor CXCR4 [2].

### 1.2 A via de sinalização SDF-1/CXCR4

O SDF-1, agora designado também CXCL12 de acordo com o sistema atual de classificação de quimiocinas [3], foi inicialmente identificado como um fator estimulante de crescimento de células pré-B [4]. SDF-1 é expresso em muitos órgãos ao longo do corpo, incluindo baço, timo, pele, coração, pulmão, medula renal e medula óssea [5] e em

contraste com as quimiocinas “inflamatórias” que são expressas transientemente para atrair células inflamatórias para locais de inflamação ou infecção [6], ela é uma quimiocina “homeostática” [7]. Na cavidade da medula óssea, células expressam altos níveis de SDF-1 ajudando a formar os nichos e desempenham um papel importante no suporte das células-tronco e progenitoras hematopoéticas. Além disso, a alta expressão de SDF-1 concomitante a expressão de várias moléculas de adesão celular e receptores de superfície celular da via de sinalização Notch provavelmente contribuem para as condições necessárias para sobrevivência e manutenção das HSCs. A exata identificação de células secretoras de SDF-1 é desconhecida, mas estas funções têm sido atribuídas a células estromais, células-tronco mesenquimais, células perivasculares e os osteoblastos [5].

SDF-2 sinaliza através de CXCR4, que é expresso, porém em baixos níveis, em uma variedade de tecidos normais, incluindo tecidos linfáticos, timo, cérebro, baço, estômago e células hematopoiéticas normais [8-10]. CXCR4 e CXCL12 pertencem ao sistema de quimiocinas humanas que atualmente inclui mais de 50 quimiocinas e 20 receptores. Receptores de quimiocinas são caracterizadas pela sua capacidade de induzir a migração direcional de células em direção a um gradiente de uma citocina quimiotática (quimiotaxia). Quimiocinas são pequenas proteínas secretadas que podem ser agrupadas em duas subfamílias principais: CXC ou CC, baseada ou na presença de aminoácidos entre os resíduos de cisteínas [9-12].

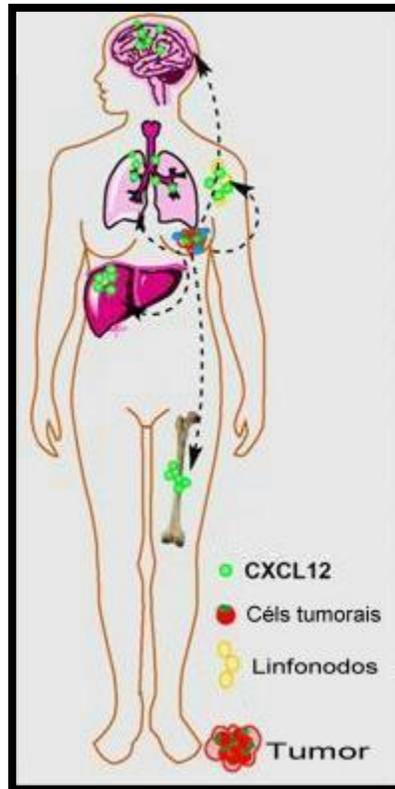
Uma vez que SDF-1 se liga a CXCR4, o receptor forma um complexo com a subunidade G $\alpha$ i da proteína G, resultando na inibição de adenilato ciclase mediada pela produção de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) e mobilização de cálcio intracelular. A dissociação da subunidade G $\alpha$ i de G $\beta\gamma$  leva à ativação de múltiplos alvos *downstream*, incluindo ERK1/2, MAPK, JNK, e efetores AKT [13-17]. A quimiotaxia estimulada é acompanhada por rearranjos do citoesqueleto, polimerização de actina, polarização, formação de pseudópodes, formação e adesão, dependente de integrinas, de células endoteliais e de outros substratos biológicos [17] (Figura 3).

A alta expressão de SDF-1 por células estromais da medula óssea e defeitos na hematopoese em camundongos CXCR4 e SDF-1- knockout sugerem que a sinalização

SDF-1/CXCR4 é particularmente importante no nicho celular, sendo o seu papel crítico para o desenvolvimento hematopoético, entre outros, como neural, vascular, craniofacial e cardíaco [17-19].

Em mamíferos, esta via tem sido fortemente implicado no *homing* e reconstituição que ocorre durante o transplante de células hematopoéticas [5]. E de fato, uma série de testes *in vitro* e *in vivo* indicam que uma das funções essenciais de SDF-1/CXCR4 é regular o *homing* e retenção de células progenitoras hematopoéticas no microambiente medular [18, 19]. HSCs migram para SDF-1, mas não para outras quimiocinas [20]. Esta seletividade única para SDF-1 é um pré-requisito para a conservação, mobilização, *homing* e manutenção das HSCs na medula óssea [18, 21, 22].

Embora, inicialmente fosse de interesse clínico para imunologia e doenças tais como AIDS, vias de quimiocinas tornaram-se uma importante área de investigação para terapia contra o câncer [12, 17]. CXCR4 é hiperexpresso em mais de 23 tipos de cânceres humanos incluindo câncer de mama, cérebro, ovário, câncer de próstata e melanoma [9, 23]. A expressão de CXCR4 em tecidos normais é acentuadamente menor do que em tumores [9, 12]. O aumento deste receptor em tumores está associado com um fenótipo agressivo. A expressão de CXCR4 permite o *homing* de células tumorais para órgãos que expressam níveis abundantes de SDF-1, como pulmões, ossos, entre outros como já citados acima (Figura 2). Assim, a hiperexpressão de CXCR4 em tumores está diretamente correlacionada ao aumento de risco, metástase e baixa taxa de sobrevivência em indivíduos com câncer de mama e em vários outros tipos de cânceres [9, 12, 23-26]. Assim como em tumores sólidos, a hiperexpressão de CXCR4 está relacionado com pior prognósticos em doenças malignas do sangue, como Síndromes Mielodisplásicas (SMDs) e Leucemias [8, 10, 11].



**Figura 2. Via SDF-1/CXCR4 em tumores sólidos.** SDF-1 é hiperexpresso em tecidos normais como pulmões, fígado e medula óssea e também é secretado por células tumorais e estromais. Interações SDF-1/CXCR4 induzem a liberação do fator de crescimento endotelial vascular, o aumento da permeabilidade vascular, e recrutamento de macrófagos associados ao tumor e promovem a angiogênese tumoral. Células tumorais que hiperexpressam CXCR4 migram em direção ao gradiente quimioatrativo e fazem *homing* para órgãos que liberam SDF-1 (Adaptado de Woodard & Nimmagadda, 2011).

### 1.3 CXCR4 em síndromes mielodisplásicas

Síndromes Mielodisplásicas constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoéticas clonais, que exibem hematopoese ineficaz e alto risco de evolução (30%) para leucemia mielóide aguda (LMA). A expansão do clone anômalo é um fenômeno medular caracterizado por displasia morfológica e diferenciação deficiente, resultando em células não funcionais. As consequências desta hematopoese deficiente no sangue periférico são citopenias, que podem vir a envolver os três segmentos do sangue:

eritrócitos, leucócitos e plaquetas. A anemia e seus sintomas relacionados são as manifestações clínicas mais comuns da maioria das SMDs [27, 28].

O diagnóstico e a classificação das SMDs são dificultados pela grande heterogeneidade da doença. Esforços do grupo cooperativo franco-americano-inglês (FAB), da Organização Mundial de Saúde (WHO) e do Sistema Internacional de Pontuação Prognóstico (IPSS) resultaram na divisão das SMDs em diferentes estágios baseados na morfologia medular, características citogenéticas e citopenias sanguíneas. Pelos critérios FAB, as SMDs foram divididas em: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em forma de anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBt), e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), apresentando dentre estas classes um aumento progressivo no número de precursores imaturos na medula (de 5% até 30% de blastos). Segundo a WHO 2008, as mielodisplasias estão assim classificadas: anemia refratária (AR), anemia refratária com blastos em forma de anel (ARSA), citopenia refratária com displasias múltiplas (CRDM), citopenia refratária com displasias múltiplas e blastos em forma de anel (CRDM-SA), anemia refratária com excesso de blastos-1 e 2 (AREB-1 e AREB-2), síndrome mielodisplásica não classificada (SMD-N) e SMD associada à deleção no cromossomo 5q (5q). Já o Sistema Internacional de Pontuação Prognóstico nas SMDs, derivado da análise de mais que 800 casos, resultou na definição de valores que oscilam entre 0 e >2,5 (do menor para o maior risco) e predizem com certa precisão a sobrevida e o risco de evolução para LMA [27]. Assim, as SMDs com maior percentual de blastos são de pior prognóstico, por possuírem maior chance de evolução para uma leucemia, na maioria das vezes leucemias mielóides agudas [28].

As SMDs são doenças hematológicas mais comuns na velhice, sendo a mediana da idade, no diagnóstico, 60 a 75 anos. Na Europa, ocorrem de 2,1 a 12,6 casos/1000/ano, aumentando para 15-50/1000/ano em pessoas com mais de 70 anos. Com o aumento da taxa de expectativa de vida, espera-se que a incidência das mielodisplasias se eleve nas próximas décadas [28].

As interações recíprocas entre células hematopoiéticas e o estroma medular estão alteradas em SMD. Já foi demonstrado que células progenitoras CD34<sup>+</sup> de pacientes com SMD de alto risco hiperexpressam CXCR4 em relação às células progenitoras de pacientes controles [10, 29, 30]. Além disso, estas mesmas células em pacientes com SMD de baixo risco não são atraídas por gradiente de SDF-1 apesar de expressarem CXCR4 em níveis comparáveis a os de doadores sadios [10, 31] devido à não ativação das vias de Rac e PI3K/AKT por esta quimiocina [10, 32], o que pode ser o responsável pelo estado indiferenciado dos precursores hematopoiéticos nessa neoplasia.

A hiperexpressão de CXCR4 em pacientes com SMD sugere que este receptor pode apresentar um papel crítico na patogênese da SMD e pode ser um marcador de pior prognóstico nesta doença [29, 30].

#### **1.4 CXCR4 em leucemias agudas**

As leucemias agudas constituem um grupo heterogêneo de doenças malignas caracterizadas por defeitos na diferenciação e elevada proliferação de progenitores hematopoiéticos, resultando na expansão e acúmulo de blastos [33, 34]. Os sintomas mais freqüentes são: anemia, neutropenia, trombocitopenia e infiltração de órgãos como fígado, baço, linfonodos, entre outros. As leucemias agudas são divididas em leucemia mielóide aguda e leucemia linfóide aguda (LLA) dependendo da presença de mieloblastos ou linfoblastos, respectivamente. Em 1976, foi proposta pela FAB uma classificação para LMA em 8 subgrupos, que se baseia em parâmetros morfológicos e citoquímicos [35]. As LLAs são subdivididas em 2 grupos, de acordo com as características imunológicas: precursor B (LLA-préB) e precursor T (LLA-T), enquanto que as células B maduras são chamadas de linfoma/leucemia de Burkitt (LLA-B) [36].

Com relação a estas doenças, já foi confirmado que a hiperexpressão de CXCR4 em pacientes com LMA e LLA está correlacionada com a redução de sobrevida dos pacientes, podendo então ser um marcador de prognóstico [10, 11, 30, 37, 38]. Além

disso, a sua inibição, através do uso de antagonistas por exemplo, aumentam a sensibilidade das células leucêmicas à drogas [38-40]

Blastos leucêmicos utilizam-se da via SDF-1/CXCR4 para migrarem [37, 41, 42]. Foi demonstrada *in vivo* a importância deste receptor no *homing* das células mielóides e linfóides para microambientes medulares mais próximos ao osso, normalmente restritos às células progenitoras, e na retenção destas células nesses nichos (quiescência) tornando-as mais resistentes a quimioterápicos, garantindo assim a sua sobrevivência e proliferação, já que estão protegidas da morte celular [11, 38, 42-46].

### **1.5 CXCR7, um novo receptor para SDF-1**

Recentemente foi identificado um outro receptor para SDF-1, nomeado como CXCR7 [47-53]. Tem alta afinidade por SDF-1 e *interferon-inducible T-cell  $\alpha$  chemoattractant* (ITAC), mas ao contrário de outros receptores de quimiocinas, CXCR7 não se acopla a proteínas G e não mobiliza  $Ca^{+2}$  [47, 48, 53-55], porque apresenta modificações Asp-Arg-Tyr-Leu-Arg-Arg/Ile-Val [56, 57], mas pode atuar como um receptor de  $\beta$ -arrestina [53, 58, 59] e / ou funcionar como um receptor de limpeza para CXCL12 e CXCL11 [56, 58, 60]. Esta descoberta foi possível após observar que células do fígado fetal murino CXCR4-knockout ainda podiam se ligar a SDF-1 [17, 50]. O gene deste receptor está no cromossomo 1 em camundongos e no cromossomo 2 humano, onde os genes CXCR1, CXCR2 e CXCR4 estão localizados [17, 50]

Em tecidos humanos, a expressão de CXCR7 tem sido descrita em células endoteliais associadas a tumor (CE), em muitos tipos de tumores e tem se mostrado essencial para a sobrevivência e crescimento das células tumorais [47, 49, 50, 53, 57, 61, 62]. Cada vez mais provas indicam um papel para CXCR7 na proliferação de células cancerosas e migração, mas sua contribuição para efeitos mediados por SDF-1 ainda é pouco conhecida [48, 52, 63-66]. É amplamente aceito que todas as respostas dependentes da sinalização CXCR7 são dependentes do órgão e tecido em que ele está localizado, então sua função pode variar com o tipo de célula. Tem sido mostrado que respostas a SDF-1

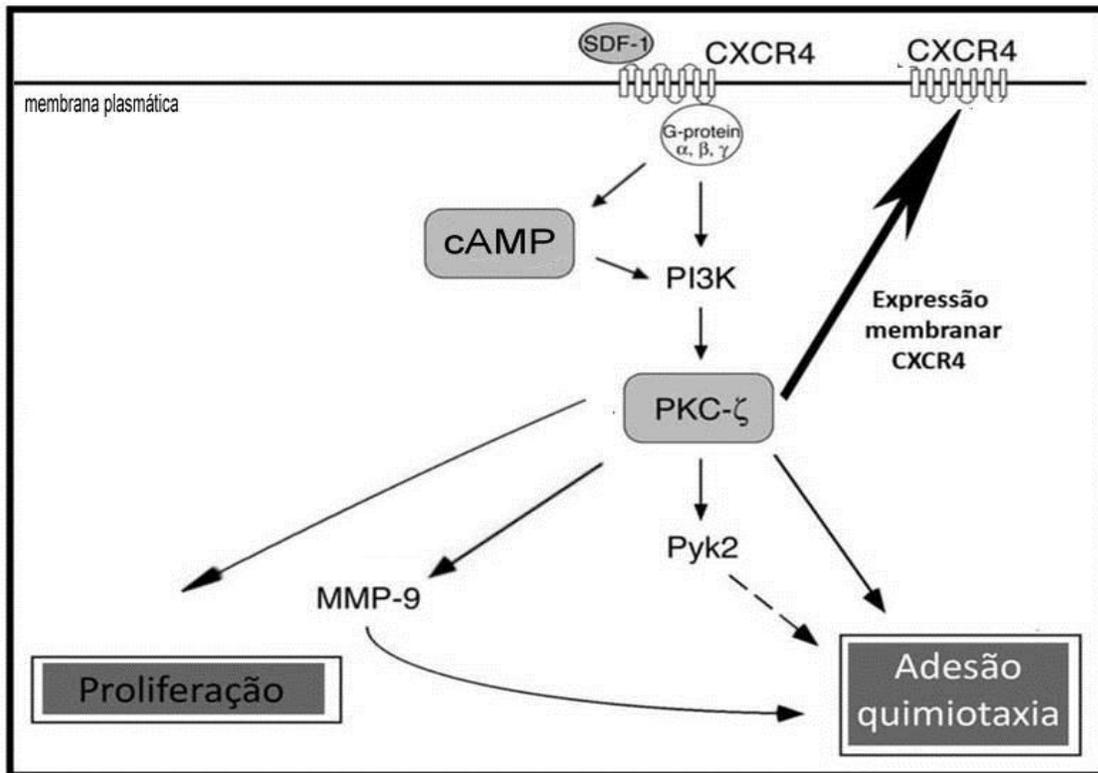
induzidas por CXCR7 levam ao aumento da motilidade e quimiotaxia [53, 67, 68]. Todas estas características sugerem que como CXCR4, CXCR7 apresenta um papel na regulação da imunidade, angiogênese, tráfego de células-tronco e metástase [17].

Os níveis de expressão relativa de CXCR4 e CXCR7 podem ser cruciais para determinar como a célula responderá a SDF-1 [48]. Estudos recentes sugerem que CXCR7 forme dímero com CXCR4, modulando assim a função deste receptor. [48, 55, 59, 64, 69]. Luker et al. [59] demonstraram que CXCR4 e CXCR7 podem formar homo e heterodímeros [59]. Além disso, co-expressão de CXCR4 com CXCR7 resultou na modulação da sinalização CXCR4 mediada por proteína G. Além disso, Décaillot et al. [47] demonstraram que o complexo de CXCR4-CXCR7 constitutivamente recruta  $\beta$ -arrestina levando a um aumento de migração de células de câncer de mama que expressam CXCR4 [47] (Figura 3).



A superfamília da PKC serina-tirosina quinase apresentam 12 enzimas as quais são divididas em 3 grupos de isoenzimas, de acordo com o seu modo de ativação. As PKCs convencionais ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) são ativadas por diacilglicerol (DAG), cálcio, ou fosfatidilserina; as PKCs novas ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , e  $\theta$ ) são ativas somente por DAG ou fosfatidilserina; enquanto que as PKCs atípicas ( $\zeta$  e  $\lambda/\iota$ ) são independentes de cálcio e DAG [70-72]. Ativação de PLC, mobilização de cálcio e ativação de PKCs DAG-dependentes por quimiocinas têm sido propostos como reguladores de adesão e migração celular [71, 73]. A ativação da via PCL e o aumento de cálcio intracelular em resposta a SDF-1, de fato sugerem um papel para PKC na quimiotaxia de SDF-1 [71, 74].

A proteína quinase C isotipo zeta ( $\zeta$ ) vem sendo apontada como central na sinalização SDF-1/CXCR4. Petit *et al.*, 2005 investigaram o papel de PKC na migração através de SDF-1 de células progenitoras humanas CD34<sup>+</sup> e células leucêmicas (de LLA) e identificou que PKC $\zeta$  tem um papel importante na sinalização SDF-1, já que a inibição desta proteína, utilizando peptídeos que imitam o substrato que se liga a esta isoforma deixando-a na sua forma inativa, resultou na redução significativa e dose-dependente da migração destas células em resposta a SDF-1[71]. Além disso, PKC $\zeta$  controla a expressão membranar de CXCR4, pois o efeito de cAMP sob esta expressão é dependente desta quinase [75] (Figura 4). Observou-se também que a ativação de PKC $\zeta$ , através da sua fosforilação, se dá a partir da ativação de proteínas *downstream* do receptor CXCR4 (proteína G e PI3K) [71, 72].



**Figura 4. Via de sinalização SDF-1/CXCR4.** A ativação de proteínas à jusante do receptor CXCR4 (proteínas G e PI3K) resulta na ativação da proteína quinase C isotipo zeta (PKC ζ). PKCζ ativa, por sua vez irá modular uma série de eventos tais como proliferação, adesão celular e quimiotaxia, bem como controlar a expressão membranar de CXCR4 (Adaptado de Petit *et al.*, 2005).

Em vista que a sinalização SDF-1/CXCR4 é desregulada em pacientes com síndromes mielodisplásicas e leucemias [67], e a recente descoberta de CXCR7 como outro receptor de SDF-1, a investigação da expressão e função de CXCR7 em SMD e leucemias se fez necessária. Além disso, a tentativa de elucidar se CXCR7 potencializa a resposta de CXCR4 a SDF-1 e o papel de novas proteínas, como PKCζ nesta via de sinalização nestas doenças hematológicas é impensável, pois podem servir como marcadores de diagnóstico e/ou prognóstico ou como alvos terapêuticos.

## ***2. Objetivos***



## **2.1 Objetivo Geral**

Investigar e caracterizar a função de CXCR7 em Síndromes Mielodisplásicas e Leucemias Agudas.

## **2.2 Objetivos Específicos**

2.2.1 Caracterizar a expressão gênica e protéica de CXCR7 em células hematopoiéticas normais, células hematopoiéticas de pacientes com SMD, LMA e LLA e linhagens leucêmicas linfoblásticas e mielóides.

2.2.2 Em linhagens linfoblásticas:

- a) Caracterizar a expressão de CXCR4;
- b) Verificar a localização de CXCR7 e CXCR4;
- c) Avaliar a migração em resposta a SDF-1;
- d) Avaliar os efeitos da inibição de CXCR7 na migração em resposta a SDF-1;

2.2.3 Em linhagens mielóides:

- a) Caracterizar a expressão de CXCR4;
- b) Verificar a localização de CXCR7 e CXCR4;
- c) Avaliar os efeitos da hiperexpressão de PKC $\zeta$  na migração em resposta a SDF-1.

2.2.4 Em linhagens linfoblásticas e mielóides:

- a) Caracterizar a expressão de PKC $\zeta$ .



### ***3. Casuística***



### **3.1 Células hematopoiéticas normais**

As células hematopoiéticas normais foram obtidas de sangue periférico (n=4) ou de medula óssea (n=13) de doadores normais, incluindo 9 homens e 3 mulheres, com idade mediana de 35 anos (18-56 anos) do Hemocentro da Unicamp com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado.

### **3.2 Células hematopoiéticas de pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásicas e Leucemia Aguda**

As amostras foram obtidas de medula óssea de pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. As amostras foram coletadas no momento do diagnóstico de mielodisplasia ou de leucemia aguda, antes de qualquer tratamento. Utilizamos neste estudo as amostras que foram que apresentavam os dados hematológicos do diagnóstico, confirmação do diagnóstico de mielodisplasia ou de leucemia aguda através de mielograma, citoquímica, imunofenotipagem, biópsias, e que apresentavam RNA de boa qualidade no momento da realização dos experimentos. O diagnóstico e a coleta foram realizados pela Dra. Fabíola Traina do Centro de Hematologia e Hemoterapia, da Universidade Estadual de Campinas. Foi incluído um total de 50 pacientes com diagnóstico de SMD e 40 pacientes com diagnóstico de leucemia aguda, sendo 29 LMA e 11 LLA. As características dos pacientes com SMD e com leucemia aguda estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

**Tabela 1. Características dos pacientes com diagnóstico de SMD**

	Número
<b>Pacientes</b>	50
Sexo	
Masculino/Feminino	34/16
Idade (anos), mediana (faixa)	62,5 (20-85)
FAB	
AR/ARSA	22/8
AREB/AREBt	14/6
WHO	
CRDU/CRDM/ARSA	6/16/8
AREB-1/AREB-2	14/6
Número de Citopenias	
0 ou 1 citopenia	22
2 ou 3 citopenias	28
IPSS	
Baixo risco/INT-1	31/9
Alto risco/INT-2	6/4
Citogenética	
Normal	44
Monossomia 7	1
Trissomia 8	1
-Y	1
Complexo	3

**Abreviações:** SMD: síndrome mielodisplásica; FAB: French-American-British, AR: anemia refratária; ARSA: anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB: anemia refratária com excesso de blastos; AREBt: anemia refratária com excesso de blastos em transformação; WHO: World Health Organization, CRDU: Citopenia refratária com displasia unilinear, CRDM: citopenia refratária com displasia multilinear, ARSA: anemia refratária com sideroblastos em anel, AREB-1: anemia refratária com excesso de blastos-1, AREB-2: anemia refratária com excesso de blastos-2, LMA: leucemia mieloide aguda, IPSS: International Prognostic Scoring System, INT-1: intermediário-1, INT-2: intermediário-2.

**Tabela 2. Características dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda**

	Número
<b>Pacientes com LMA</b>	29
Sexo	
Masculino/Feminino	14/15
Idade (anos), mediana (faixa)	52(26-88)
FAB	
M0	0
M1	7
M2	9
M3	2
M4	4
M5	3
M6	1
M7	3
<b>Pacientes com LLA</b>	11
Sexo	
Masculino/Feminino	6/5
Idade (anos), mediana (faixa)	31(23-60)
FAB	
LLA-T	8
LLA-préB	2
LLA-B	1

**Abreviações:** LMA: leucemia mielóide aguda; FAB: French-American-British.

LLA: leucemia linfoblástica aguda

### 3.3 Linhagens Celulares

Linhagens celulares humanas de leucemias agudas foram adquiridas no ATCC, Philadelphia, USA. Foram utilizadas linhagens linfoides (Molt-4, Jurkat, Raji e Daudi) e linhagens mieloides (P39, K562, KG1, e U937). A descrição das linhagens leucêmicas está na Tabela 3.

**Tabela 3. Descrição das linhagens leucêmicas**

Linhagem	Descrição
Molt-4	LLA -T
Jurkat	LLA -T
Raji	LLA - B/Linfoma de Burkitt
Daudi	LLA - B/Linfoma de Burkitt
P39	Leucemia mielomonocítica secundária à mielodisplásia
K562	Leucemia mieloide crônica em fase blástica, t(9;21)
KG1	Eritroleucemia
U937	Leucemia mielocítica aguda

## ***4. Material e Métodos***



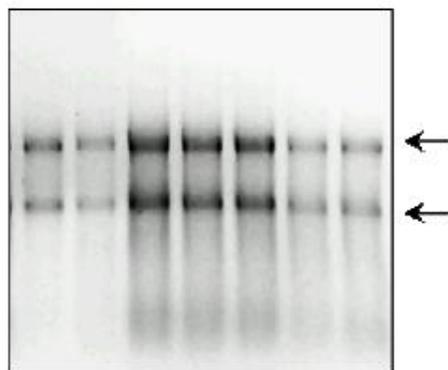
#### **4.1 Processamento das amostras**

Para obtenção de RNA, células de medula óssea (MO) foram coletadas em EDTA e submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. A seguir, as células foram submetidas à extração de RNA. Estas células foram também submetidas à extração protéica.

Para separação de progenitores CD34+, as células mononucleares de sangue periférico foram isoladas em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) e separadas através de colunas de imunoafinidade MIDI-MACS, de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Após purificação, as células foram submetidas à extração protéica.

#### **4.2 Extração de RNA total**

O RNA de células foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, USA). O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA com esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi [76]. Ao precipitado de células, contendo  $5 \times 10^6$  a  $1 \times 10^7$  células, foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra foi homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A purificação do RNA deu-se segundo o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO a 260 nm equivale a 40  $\mu\text{g/mL}$  de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e esse varia normalmente entre 1,6 e 1,8. A qualidade das amostras de RNA obtidas após a extração foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose denaturante com formaldeído 1,2% e as bandas 28 e 18S foram visualizadas em luz ultravioleta (Figura 1).



**Figura 5. Gel de agarose denaturante a 1,2% de RNA total.** As setas indicam as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A presença das subunidades é indicativa do grau de integridade da amostra.

#### **4.3 Tratamento do RNA total com DNase I**

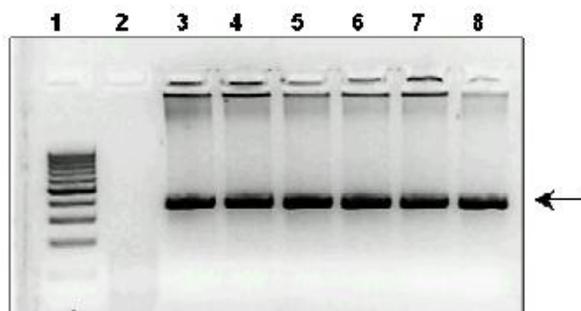
O RNA total de células foi tratado com DNase livre de RNase 1 U/ $\mu$ L (Life Technologies), utilizando 1 U da enzima para tratar 5  $\mu$ g de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente, a fim de eliminar uma possível contaminação deste material com DNA genômico. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA com concentração final de 2 mM. A enzima foi inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C.

#### **4.4 Transcrição em cDNA**

As amostras de RNA total, contendo 5  $\mu$ g de RNA e tratadas com DNase I, foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) em uma reação de volume final de 20  $\mu$ L (Life Technologies). A reação foi iniciada adicionando aos 5  $\mu$ g de RNA tratado 1  $\mu$ L de oligonucleotídeo (dT) 500  $\mu$ g/mL e 1  $\mu$ L da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C, e, em seguida, incubada no gelo. Adicionou-se, então, 4  $\mu$ L do tampão de reação 5x, contendo 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub> e 0,1 M DTT, e 200 U enzima transcriptase reversa SuperScript II, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 50

minutos à 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos a 70°C e finalmente foram adicionadas 40 unidades de Rnase H e a solução incubada por 20 minutos a 37°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro NanoDrop e 20 ng foram utilizados por reação.

Como controle da transcrição em cDNA foi realizado uma PCR para o gene  $\beta$ 2-microglobulina. A PCR para amplificação de  $\beta$ 2-microglobulina foi realizada para um volume final de 50  $\mu$ L de reação que contém: 1,5  $\mu$ L do cDNA sintetizado, 5  $\mu$ l de tampão de reação, 3  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 2,5 unidades de Taq polimerase e 200 nM de cada iniciador. Foi realizado um controle negativo, sem adição de cDNA. As sequências dos iniciadores de  $\beta$ 2-microglobulina utilizados foram: FW: ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAGCT; RV: CCTCCATGATGCTGC TTACATGTC. O programa foi composto de 5 minutos de desnaturação à 94°C, seguido por 35 ciclos de 40 segundos à 94°C, 40 segundos à 55°C e 40 segundos à 72°C, com uma fase final de 72°C por 7 minutos, os fragmentos resultantes contém 300 pb e foram visualizadas em luz ultravioleta em gel de agarose 2%.(Figura 2).



**Figura 6 Produtos resultantes do PCR para amplificação de  $\beta$ 2-microglobulina visualizados em gel de agarose.** 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controlenegativo, 3 – 8: amplicons. As setas indicam a presença da banda de 300 pb correspondente ao amplicon de  $\beta$ 2 –microglobulina. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida.

#### 4.5 PCR quantitativo (PCRq)

Iniciadores foram desenhados usando o programa PRIMER3 (versão 0.4.0) (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) com os dados das sequências publicadas no banco de dados do NCBI. Para encontrar a melhor concentração de iniciadores, diluição seriada de 150 a 600nM de cada par de iniciador foi realizada, considerando reações de amplificação do produto gênico no menor ciclo ( $C_t$ ) como sendo a melhor concentração, evitando sobra de reagente e formações de dímeros. Em seguida, a eficiência da amplificação foi verificada através da curva de diluição seriada de cDNA (1:2), consideradas eficientes reações de amplificação maiores que 95% e inclinação de -3,30 a -3,34. Os genes *HPRT* e *GAPDH* foram selecionados como controles endógenos por não alterarem os seus níveis de expressão em todas as amostras de estudo. Além disso, sua complementaridade com os genes alvos foi verificada, através da curva de dispersão, que utiliza os valores de  $\Delta C_t$  ( $C_t$  alvo -  $C_t$  endógeno) (os valores de  $C_t$  são gerados na curva padrão de eficiência), em comparação ao log de entrada (log da diluição do cDNA utilizada), as eficiências das duas reações de PCR foram consideradas equivalentes quando apresentaram inclinação entre -0,1 a 0,1.

Para a análise PCRq, Power SYBRGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems) foi usado de acordo com instruções do fabricante, e as reações foram corridas no equipamento 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) por 40 ciclos. Cada amostra foi feita em triplicata e o controle negativo sem amostra foi incluído em cada par de iniciador. A expressão relativa foi calculada como  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde  $\Delta\Delta C_t$  é a diferença do valor de  $C_t$  para cada paciente normalizado pela média do  $C_t$  da diferença de  $C_t$  das amostras dos indivíduos saudáveis (método  $C_t$  Comparativo  $\Delta\Delta C_t$ ) [77].

**Tabela 4. Concentração e Seqüência dos Iniciadores**

<b>Gene</b>	<b>Concentração</b>	<b>Seqüência dos Iniciadores</b>
CXCR7	450 nM	FW: 5' GGC TAT GAC ACG CAC TGC TA 3' RW: 5' CTC ATG CAC GTG AGG AAG AA 3'
HPRT	150 nM	FW: 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A 3' RW: 5' TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'
GAPDH	150 nM	FW: 5' GCA CCG TCA AGG CTG AGA AC 3' RW: 5' CCA CTT GAT TTT GGA GGG ATC T 3'

#### **4.6 Extração de proteína**

As células foram lisadas em tampão RIPA (150mM NaCl, 50mM Tris-Cl, 0,5% deoxicolato, 0,1% SDS e 1% NP-40, pH7,4) contendo inibidores de protease (10mM PMSF, 1 µg/mL leupeptina, 1mM ortovanadato de sódio e 1 ng/mL pepstatina A) e mantidas em gelo por 30 minutos. Em seguida, os lisados foram centrifugados a 10.000g por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos de 1,5 mL e o conteúdo protéico foi quantificado utilizando reagente BreadFord 20% (BioRad), seguindo especificações do fabricante.

#### **4.7 Western Blot**

Western Blot foi realizado para análise da expressão protéica. Foram utilizados quantidades de extratos protéicos correspondentes a 50 µg e adicionados 5% do volume final de tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditiotreitol e estes foram aquecidos a 100 °C por 10 minutos. Em seguida, foram fracionados em gel de poliacrilamida 12%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Millipore) por 2 horas a 120 volts (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. As membranas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente em solução de TBS-T

(50mM Tris (pH 7,5), 150mM NaCl e 0,1% Tween-20) contendo 5% de leite desnatado para bloqueio dos sítios inespecíficos. Em seguida foram incubadas com anticorpo primário de interesse por 16-18 horas a 4 °C. No dia seguinte as membranas foram lavadas em TBS-T por três vezes de 10 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA): anticorpo policlonal que reconhece PKC $\zeta$  (sc-216) e anticorpos policlonais que reconhecem a actina (sc-1616) e GAPDH (sc-32233). Anticorpos monoclonais que reconhecem CXCR7 (ab72100) e CXCR4 (ab2074) foram obtidos da Abcam apl (Abcm,Cambridge, MA, USA). O sistema de revelação usado foi baseado em quimiluminescência, e realizado de acordo com orientações do fabricante, ECLTM *Western Blot* Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com anticorpo secundário, conjugado à HRP (Horseradish peroxidase), lavadas novamente para retirada do excesso de anticorpo, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectado por auto-radiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY), utilizando-se o reagente ECL (GE Healthcare, Amersham, UK).

Quando houve necessidade de quantificação das bandas de western blot utilizou-se o programa UN-SCAN-IT gel™ – 6.1 (Silk Scientific Corporation), que fornece a média de pixel/área de cada banda. As intensidades foram normalizadas pelas bandas correspondentes de  $\beta$ -actina ou GAPDH de cada amostra.

#### **4.8 Imunofluorescência e Microscopia Confocal**

Células foram mobilizadas em lamínulas de vidro previamente tratadas com 1mg/ml de poli-L-lisina. As células foram fixadas em solução de PBS-paraformaldeído (PFA) 4% por 15 minutos (TA), e então foram lavadas em PBS 3 vezes (5 minutos, sob agitação). Para evitar ligação inespecífica do anticorpo primário e permeabilizar as células, foi realizado bloqueio em solução de PBS contendo 3% de leite desnatado e 0,6% de triton X-100 (1 hora, TA). A incubação com o anticorpo primário de interesse foi realizada em câmara úmida por 16-18 horas (4°C). O anticorpo monoclonal que reconhece CXCR7

(ab72100) foi obtido da Abcam apl (Abcm,Cambridge, MA, USA) e o anticorpo policlonal que reconhece CXCR4 (sc-6190) foi obtido da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Após o período de incubação, as lamínulas foram lavadas em PBS (3 vezes de 5 minutos, sob agitação). Seguiu-se a incubação com o anticorpo secundário anti-coelho AlexaFluor 488 e anti-camundongo AlexaFluor 555 (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) por 1 hora a TA. Após a última lavagem em PBS, as lamínulas foram montadas em lâminas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência. Independentemente do protocolo utilizado, as lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando as objetivas de 63X de imersão em óleo.

#### **4.9 Citometria de fluxo**

$1 \times 10^6$  células (Molt-4 e Jurkat) foram coletadas, lavadas em PBS 2 vezes, incubadas com o anticorpo PE anti-human/mouse CXCR7 (BioLegend, San Diego, CA, USA) por 20 min (temperatura ambiente, no escuro) e então ressuspendidas em 200  $\mu$ L de paraformaldeído a 1%. Para a coloração intracelular, após a marcação da membrana plasmática, como já descrito, as células foram fixadas com 100  $\mu$ L de paraformaldeído 4% (10 min, temperatura ambiente), peletadas e permeabilizadas com 100  $\mu$ L de solução de permeabilização contendo 0,2% BSA, azida 0,1%, saponina 0,5% dissolvida em PBS (5 minutos, temperatura ambiente) e novamente incubadas com o anticorpo de interesse. Células não marcadas e células marcadas com PE anti mouse IgG2b,  $\kappa$  Isotype Ctrl (BioLegend, San Diego, CA, USA) foram usadas como controle da reação. As células foram analisadas em um FACSCalibur (Becton–Dickinson, CA, USA). Os dados foram analisados usando o programa FACSDiva (version 4.0.1, Becton–Dickinson, CA, USA).

#### **4.10 Transdução de lentivírus**

Células Molt-4 e Jurkat foram transduzidas com lentivírus contendo short hairpin RNA controle GFP (sc-108084) ou shRNA alvo CXCR7 (sc- 94573-V) da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e nomeadas como células Controle e CXCR7 inibido, respectivamente. Resumidamente,  $2 \times 10^5$  células foram transduzidas com lentivírus através da técnica de inoculação através da centrifugação, que consiste em centrifugar as células por 30 minutos à 800g na presença de 3  $\mu\text{g/mL}$  de polibrene (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O número de partículas virais por célula (multiplicity of infection; MOI) foi igual a 0,5. Após a transdução as células Molt-4 e Jurkat foram selecionadas com 0,3  $\mu\text{g/mL}$  e 0,75  $\mu\text{g/mL}$  de puromicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA), respectivamente, por 15 dias antes dos experimentos.

#### **4.11 Tratamento com o antagonista do receptor CXCR4 (AMD3100)**

Células Molt-4 (controle e CXCR7 inibido) e Jurkat (controle e CXCR7 inibido) foram incubadas com 1,25  $\mu\text{g/mL}$  de plerixafor (AMD3100) por 1 hora para a inibição da atividade do receptor CXCR4.

#### **4.12 Ensaio de migração**

Células Molt-4 (controle e CXCR7 inibido) e Jurkat (controle e CXCR7 inibido), tratadas ou não com AMD3100, e células U937 e P39 (hiperexpressando ou não PKC $\zeta$ ) foram submetidas a ensaios de migração em placas Transwell (membranas com poros de 5  $\mu\text{M}$ ). As membranas de policarbonato das placas foram recobertas com 1  $\text{mg/mL}$  de poli-L-lisina em água por 1 hora à 37°C. Após este período, as membranas foram lavadas com água destilada estéril por duas vezes. As células foram cultivadas em meio RPMI até a obtenção do número adequado de células.

Após este período foram lavadas 2 vezes com RPMI sem soro 0.1% BSA, contadas e  $5 \times 10^4$  células foram colocadas por membrana. Aos compartimentos inferiores

das placas Transwell adicionamos meio RPMI sem soro 0,1% BSA (Controle negativo de migração) ou meio RPMI sem soro 0,1% BSA contendo SDF-1 (200 ng/ml) como quimio-atrativo. Após 24 horas, a quantidade de células da parte inferior da membrana (células que migraram) foi contada em câmara de Neubauer.

Os experimentos foram realizados em triplicatas e foram realizados três experimentos independentes para cada clone.

#### **4.13 Análise Estatística**

A comparação dos valores da quantidade relativa de expressão do RNAm de CXCR7 entre os pacientes e com os doadores normais e os resultados dos ensaios de migração foram analisados através do teste estatístico de *Mann-Whitney* disponível no programa GraphPad Prism versão 5.0. Valor de  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.



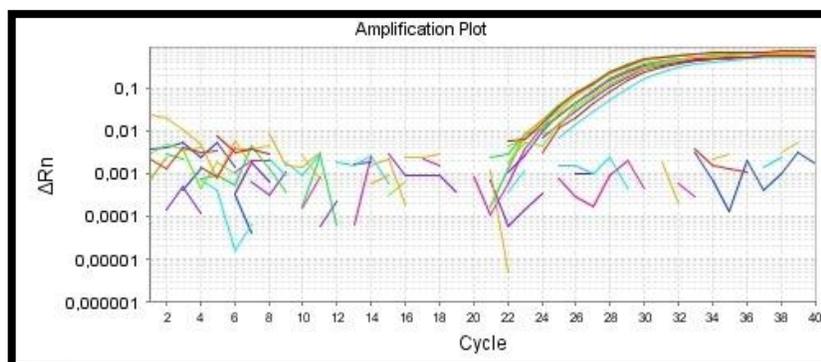
## ***5. Resultados***



## 5.1 Resultados do estudo da expressão de CXCR7 em células hematopoiéticas normais, mielodisplásicas e leucêmicas

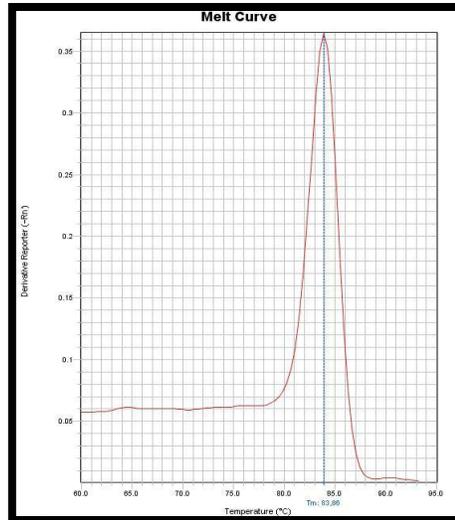
### 5.1.1 Padronização para os iniciadores para CXCR7 para PCRq

Para a verificação da concentração ideal dos iniciadores para CXCR7, diferentes concentrações dos iniciadores (150 nM, 300 nM, 450 nM e 600 nM) foram testadas, com o objetivo de identificar a concentração que apresentasse o menor Ct (ciclo de amplificação) e o maior  $\Delta Rn$  (intensidade de fluorescência). Para tanto, foi utilizada a amostra de cDNA da linhagem leucêmica T98G, pois a expressão de CXCR7 já havia sido brevemente descrita nesta linhagem celular [78]. A concentração escolhida para o gene CXCR7 foi de 450 nM (Figuras 7 e 8). As reações de PCRq foram realizadas no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).



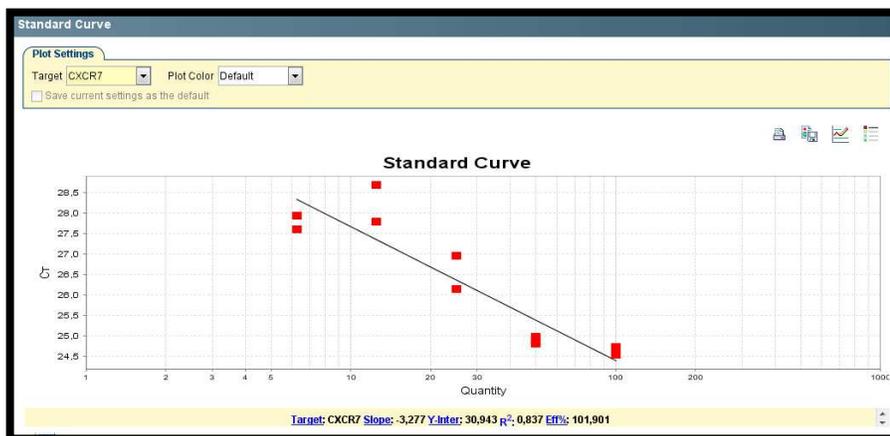
**Figura 7.**  $\Delta Rn$  e ciclos de amplificação do gene CXCR7. As curvas de amplificação são ilustradas na figura. O eixo y indica o  $\Delta Rn$  (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos.

## CXCR7 – 450 nM



**Figura 8. Curva de dissociação do CXCR7 baseada na temperatura de anelamento.** As temperaturas resultantes da curva de dissociação estão demonstradas na figura. A presença de apenas um pico na curva demonstra a especificidade dos iniciadores.

A eficiência dos iniciadores para CXCR7 foi verificada através de uma curva de diluição na ordem de 1:2 com 5 pontos. O experimento foi realizado em triplicata e a concentração inicial da amostra foi de 100 ng. A eficiência ideal é de 100% com valores toleráveis de 10 % a mais ou a menos, com uma inclinação em torno de -3,32. Após análise, os iniciadores foram considerados com ótima eficiência, a curva de eficiência e a inclinação dos iniciadores CXCR7 são ilustradas na Figura 9.

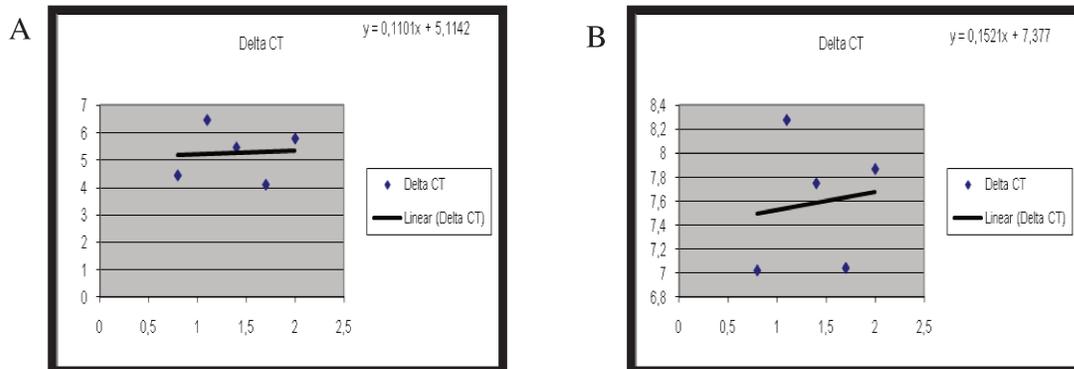


**Figura 9. Curvas de eficiência de CXCR7.** A figura ilustra os 5 pontos obtidos no teste de eficiência. O eixo y indica o Ct e o eixo x a concentração do cDNA utilizado. Ambos os iniciadores apresentaram 100% de eficiência e uma inclinação de -3,32.

### 5.1.2 Seleção e verificação de compatibilidade entre CXCR7 e controles endógenos para normalização da expressão gênica

O teste de compatibilidade entre controles endógenos com CXCR7 foi realizado conforme recomendando pela Applied Biosystems, para se verificar qual gene endógeno apresenta a melhor cinética de reação em relação aos genes CXCR7. Os controles endógenos testados foram *HPRT* e *GAPDH*, as sequências dos iniciadores são descritas na Tabela 4.

Ambos os genes endógenos *HPRT* e *GAPDH* apresentaram boa cinética de reação com CXCR7 (Figura 10). O gene *HPRT* tem sido utilizado com frequência na análise da expressão de genes por PCRq, inclusive em doenças onco-hematológicas [79, 80], além disso, o gene *HPRT* apresentou um Ct de expressão muito próximo ao do gene alvo e teve a menor variação entre as amostras, e foi um dos genes escolhidos para normalização de expressão relativa de CXCR7. Como é importante a escolha de dois genes endógenos para maior confiabilidade do experimento, nós escolhemos também o gene *GAPDH*.

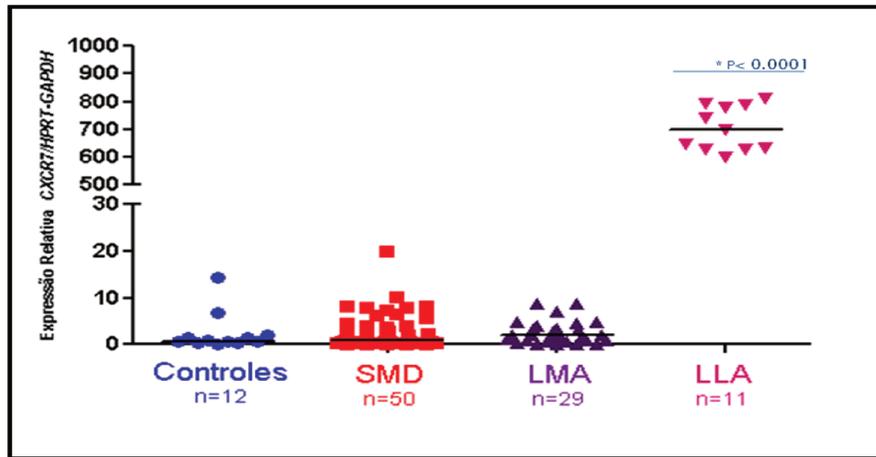


**Figura 10. Testes de Compatibilidade de *CXCR7* com *GAPDH* (A) e *HPRT* (B).** O eixo y indica os valores de  $\Delta Ct$  obtidos na fórmula  $Ct$  de *CXCR7* -  $Ct$  do controle endógeno, o eixo x indica o log das diluições de cDNA utilizadas no teste. Ao se traçar uma linha de tendência no gráfico se obtém a fórmula  $y=ax+b$ , que indica o valor de referência para a compatibilidade onde o valor de “a” deve ficar entre -0,1 e 0,1 para ser considerado compatível para análises. O valor de “a” para *GAPDH* (A) foi de -0,1101 e para *HPRT* (B) foi de 0,0152, valores muito próximos de 0,1 indicando boa compatibilidade entre ambos os endógenos para análises com *CXCR7*.

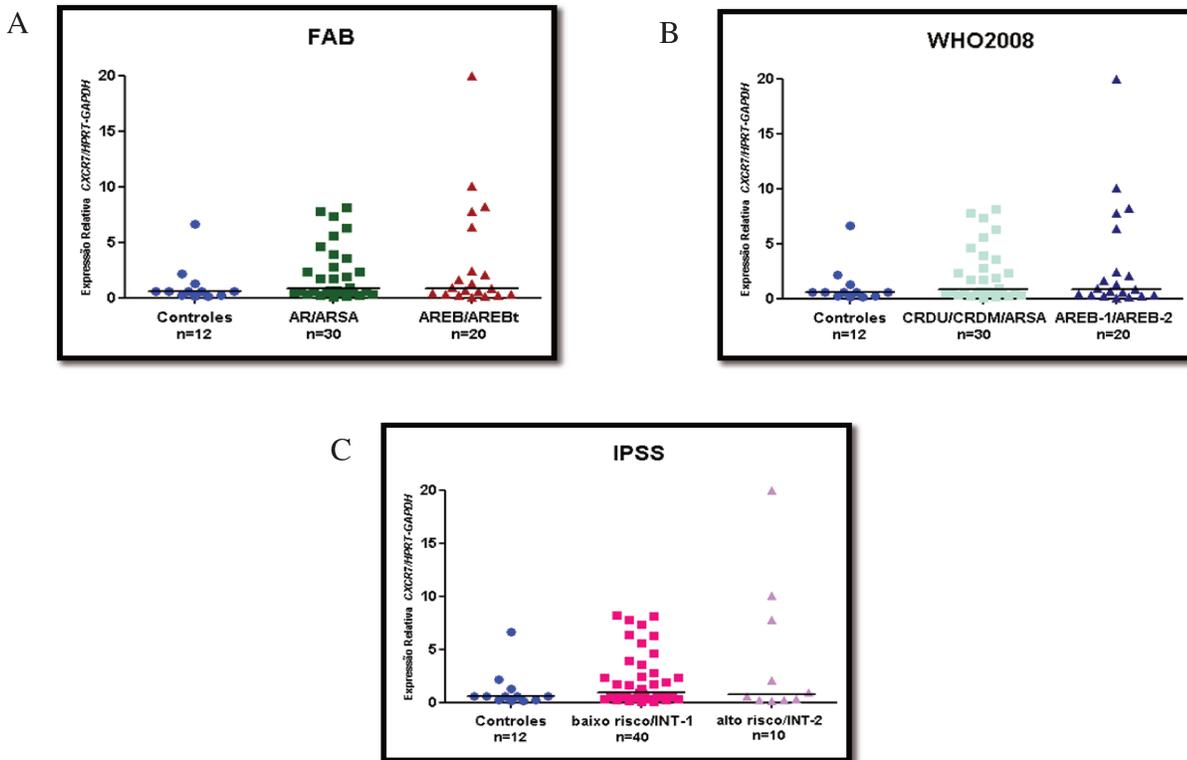
### 5.1.3 Análise da expressão gênica de *CXCR7* em amostras de MO e pacientes com SMD, LMA e LLA, através da técnica de PCRq

O RNAm de *CXCR7* apresentou-se altamente expresso em amostras de MO de pacientes com diagnóstico de LLA, quando comparadas às amostras de células hematopoiéticas normais (703 [809,84 - 600,09] versus(vs.) 0,75 [14,1 - 0,17],  $P < 0,0001$ ) e quando comparadas às amostras de pacientes com SMD e LMA, respectivamente (703 [809,84 - 600,09] versus(vs.) (1,7 [20,00 - 0,03]; 2,18 [8,69 - 0,02],  $P < 0,0001$ ). Não foi observada diferença na expressão de *CXCR7* em pacientes com SMD e LMA quando comparados às células hematopoiéticas normais (Figura 11). Em adição, quando comparamos a expressão deste receptor entre os pacientes de SMD e LMA também não encontramos diferença na sua expressão. Nos pacientes com diagnóstico de SMD, não foram observadas diferenças na expressão de *CXCR7* entre os pacientes SMD baixo e SMD alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO e IPSS (Figura 12). Já entre os pacientes com diagnóstico de LLA, os com o subtipo LLA-t apresentaram maior expressão quando comparados com os demais subtipos LLA-préB e LLA-B (761,45

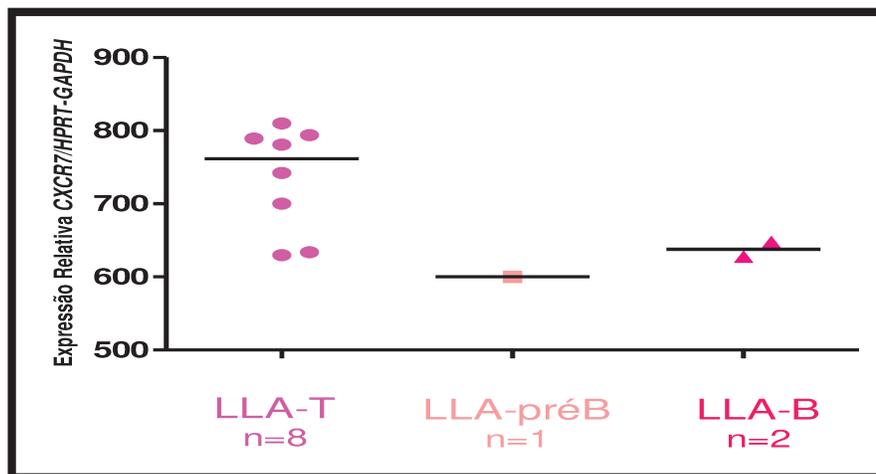
[809,84 – 629,89) versus(vs.) 600,09; 637,89 [647,83 – 627,92] (Figura 13). Os resultados são apresentados como mediana [máximo - mínimo].



**Figura 11. Expressão do RNAm de CXCR7 em células hematopoiéticas de doadores normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA.** PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de MO de pacientes com diagnóstico de SMD (n=50), LMA (n=29) e LLA (n=11) ou de doadores normais (n=12). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de CXCR7. Uma amostra de doador normal foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de CXCR7 foi significativamente maior em pacientes com LLA, quando comparadas à expressão em células hematopoiéticas normais, SMD e LMA ( $P < 0.001$ ). Não foi observada diferença na expressão em pacientes com SMD e LMA quando comparados às células hematopoiéticas normais. Em adição, quando comparamos a expressão entre os pacientes de SMD e LMA também não encontramos diferença.



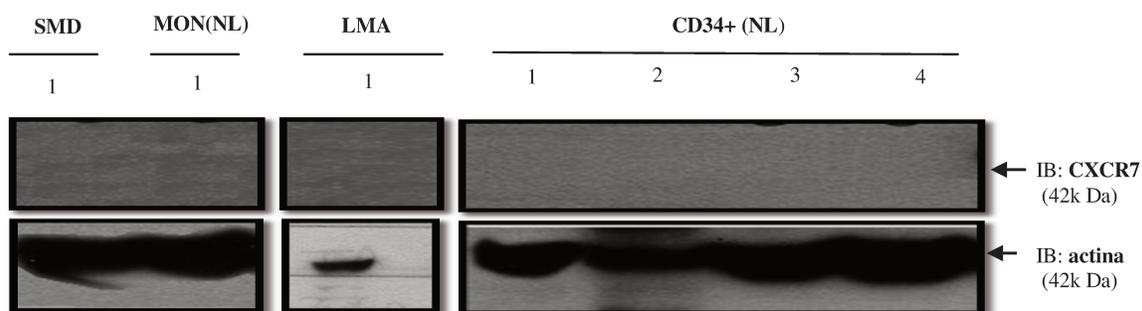
**Figura 12.** Expressão de CXCR7 em células totais de medula óssea de pacientes com SMD, de acordo com as classificações franco-americana-britânica (FAB) (A) e Organização Mundial da Saúde (World Health Organization; WHO) (B) e de acordo com o sistema de índice prognóstico internacional (International Prognostic Scoring System, IPSS) (C). As linhas horizontais representam a mediana. Uma amostra de doador normal foi utilizada como calibradora.



**Figura 13.** Expressão de CXCR7 em células totais de medula óssea de pacientes com LLA. Pacientes com LLA-t apresentaram maior expressão de CXCR7 quando comparados com os demais subtipos, LLA-préB e LLA-B.

#### 5.1.4 Análise da expressão protéica de CXCR7 em amostras de MO e pacientes com SMD e LMA, através da técnica de Western Blot

O estudo da expressão protéica de CXCR7 em células hematopoiéticas normais de MO e leucêmicas revelou a ausência de expressão de CXCR7 em células de MO de doador normal (MON) (n=01), de paciente com SMD (n=01) e de pacientes com LMA (n=01). Estes dados corroboram os resultados obtidos através de PCRq. Células CD34 + (n=4) de sangue periférico de doadores normais também não apresentaram expressão de CXCR7 (Figura 14).

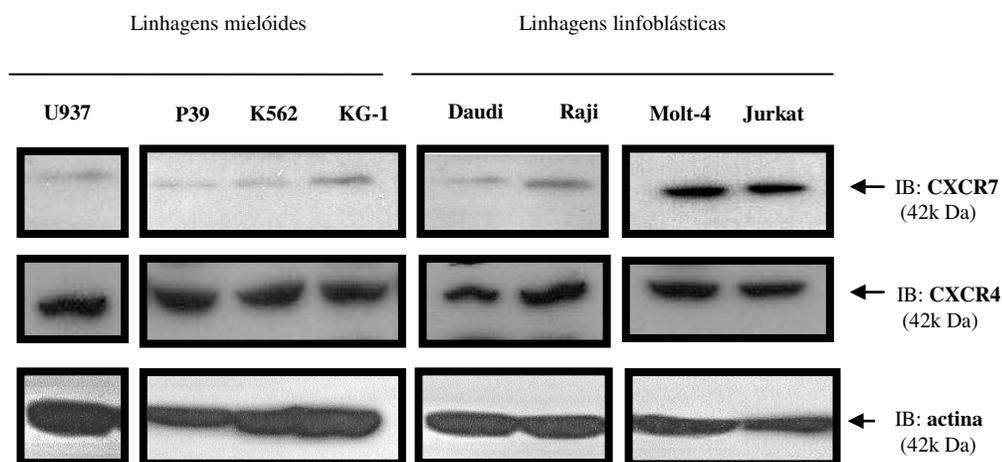


**Figura 14. Expressão protéica de CXCR7 em células hematopoiéticas normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA.** Análise por Western Blot da expressão protéica de CXCR7 em células hematopoiéticas normais (NL) [medula óssea normal (MON) (n=01) e células CD34 + de sangue periférico de doadores normais (NL) (n=4)] e de pacientes com SMD (n=01) e LMA (n=01). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-CXCR7 (42 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL Western Blot Analysis System. Note a ausência de expressão protéica de CXCR7 nos paciente com SMD e LMA, em células de MO e células CD34+ de doadores normais.

#### 5.1.5 Análise da expressão protéica de CXCR7 em linhagens leucêmicas, através da técnica de Western Blot

A expressão protéica de CXCR7 foi analisada em extrato total de linhagens de células leucêmicas humanas linfoblásticas T (Molt-4, Jurkat), linfoblásticas B (Raji e Daudi) e mieloides (U937, P39, K562 e KG-1). Através de Western Blot, observou-se que a

expressão de CXCR7 esteve presente em todas as linhagens leucêmicas analisadas, porém CXCR7 é mais expresso nas linhagens linfoblásticas T Molt-4 e Jurkat quando comparadas com as demais linhagens. Analisamos também a expressão do outro receptor do SDF-1, CXCR4, e sua expressão foi positiva em todas as linhagens leucêmicas estudadas (Figura 15).



**Figura 15. Expressão de CXCR7 e CXCR4 em linhagens leucêmicas.** Análise por Western Blot da expressão das proteínas CXCR7 e CXCR4 em 50 µg de extratos de linhagens leucêmicas linfoblásticas (Molt-4, Jurkat, Raji e Daudi) e mielóides (U937, P39, K562, e KG-1). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-CXCR7 (42 kDa) e anti-CXCR4 (42kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL *Western Blot Analysis System*. Note a expressão protéica positiva de CXCR7 em todas as linhagens leucêmicas estudadas, porém apresentando-se mais expresso nas linhagens linfoblásticas T Molt-4 e Jurkat, enquanto que CXCR4 apresenta-se expresso em todas as linhagens.

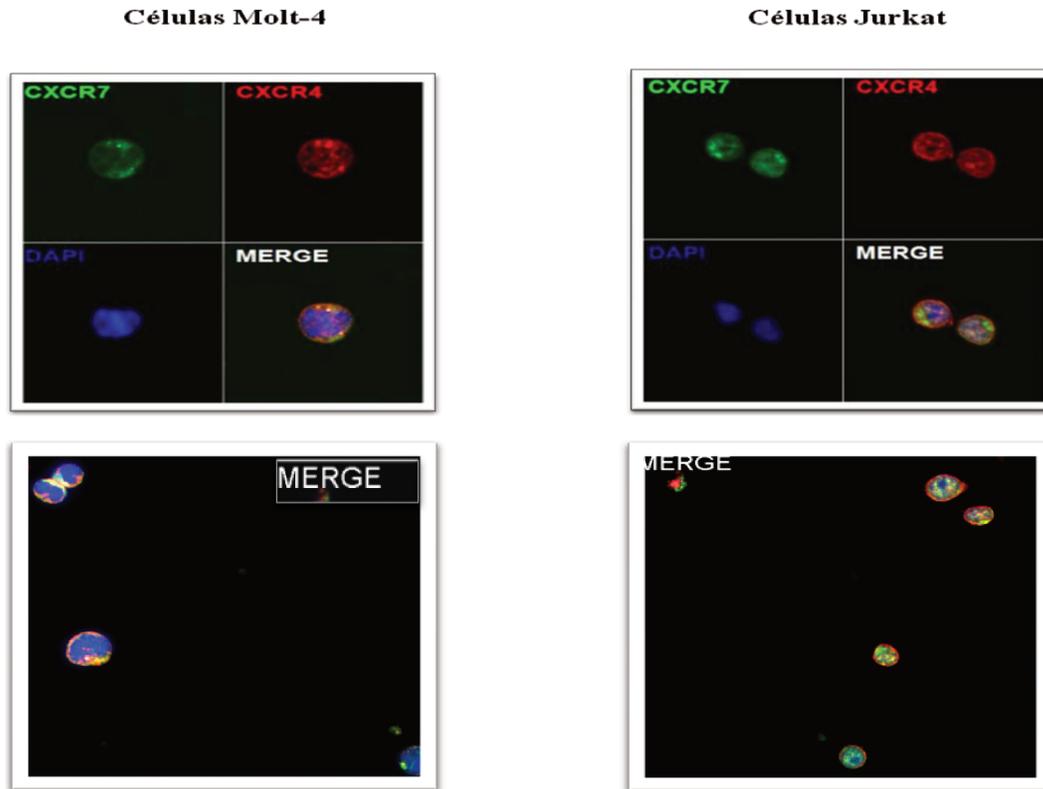
## 5.2 Resultados do estudo da função de CXCR7 em linhagens linfoblásticas e mielóides

### 5.2.1 Avaliação da localização de CXCR7 e CXCR4 em células Molt-4 e Jurkat

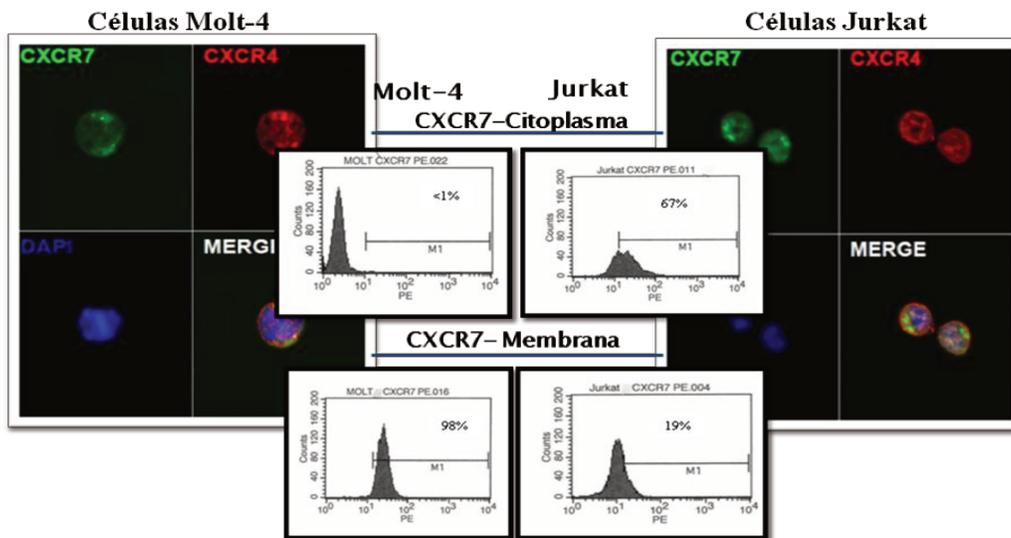
As linhagens leucêmicas Molt-4 e Jurkat foram escolhidas para dar continuidade ao estudo com as linhagens leucêmicas linfoblásticas, pois são células leucêmicas linfoblásticas T e estas células apresentaram maior expressão gênica e proteica de CXCR7.

A análise por microscopia confocal mostrou que enquanto CXCR7 se localiza mais próximo a membrana citoplasmática de células Molt-4, ele encontra-se mais frequentemente no citoplasma nas células Jurkat. Adicionalmente observou-se a localização do outro receptor, CXCR4, e este apresenta localização mais frequentemente membranar em ambas as linhagens (Figura 16).

Estes resultados foram comprovados por citometria de fluxo que mostrou que menos que 1% das células Molt-4 apresentam CXCR7 localizado no citoplasma e o restante (98%) apresentam-no na membrana citoplasmática. Enquanto que na Jurkat 67% das células apresentam CXCR7 no citoplasma e 19% na membrana citoplasmática (Figura 17).



**Figura 16. Localização de CXCR7 e CXCR4 em linhagens linfoblásticas Molt-4 e Jurkat.** Análise por Microscopia confocal da localização de CXCR7 e CXCR4 em linhagens leucêmicas linfoblásticas Molt-4 e Jurkat. Células previamente imobilizadas em lamínulas foram incubados com anticorpos primários anti-CXCR7 e anti-CXCR4 e anticorpos secundários anti-coelho 488 e anti-camundongo 555. As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 63X de imersão em óleo. Note a localização membranar e freqüentemente citoplasmática em células Molt-4 e Jurkat, respectivamente. A expressão de CXCR4 mostrou-se mais frequentemente membranar em ambas as linhagens.

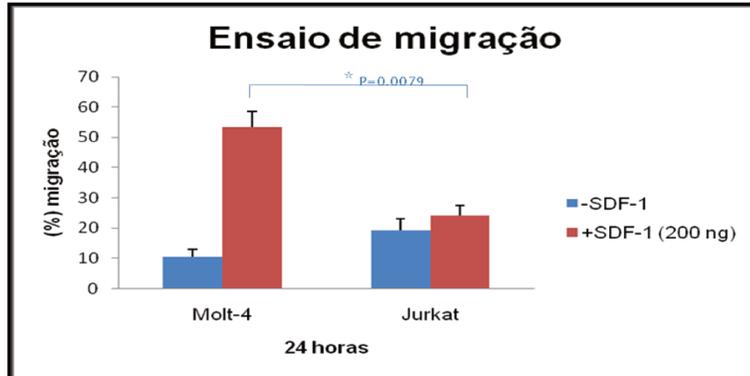


**Figura 17. Localização de CXCR7 em linhagens linfoblásticas Molt-4 e Jurkat.** Análise por citometria da localização de CXCR7 em linhagens leucêmicas linfoblásticas Molt-4 e Jurkat. Utilizamos esta técnica para demonstrar a diferença de localização encontrada entre as linhagens por microscopia confocal. Resultado foi considerado satisfatório, pois 98% das células Molt-4 apresentaram CXCR7 localizado na membrana citoplasmática, enquanto que 67% das células Jurkat apresentaram este mesmo receptor localizado no citoplasma.

### 5.2.2 Avaliação da migração em resposta a SDF-1 em células Molt-4 e Jurkat

Os experimentos de migração celular foram realizados em placas Transwell (Costar) contendo filtros com poros de 5  $\mu\text{m}$  em triplicatas. Os resultados apresentados são médias e desvios padrões de ao menos dois experimentos independentes. Células Molt-4 demonstraram uma razão média migratória (mr) de  $53,29\% \pm 5,33$ , enquanto as células Jurkat demonstraram mr de  $24,11\% \pm 3,33$  mostrando que as células Jurkat apresentam uma menor capacidade migratória a SDF-1 (Figure 18).

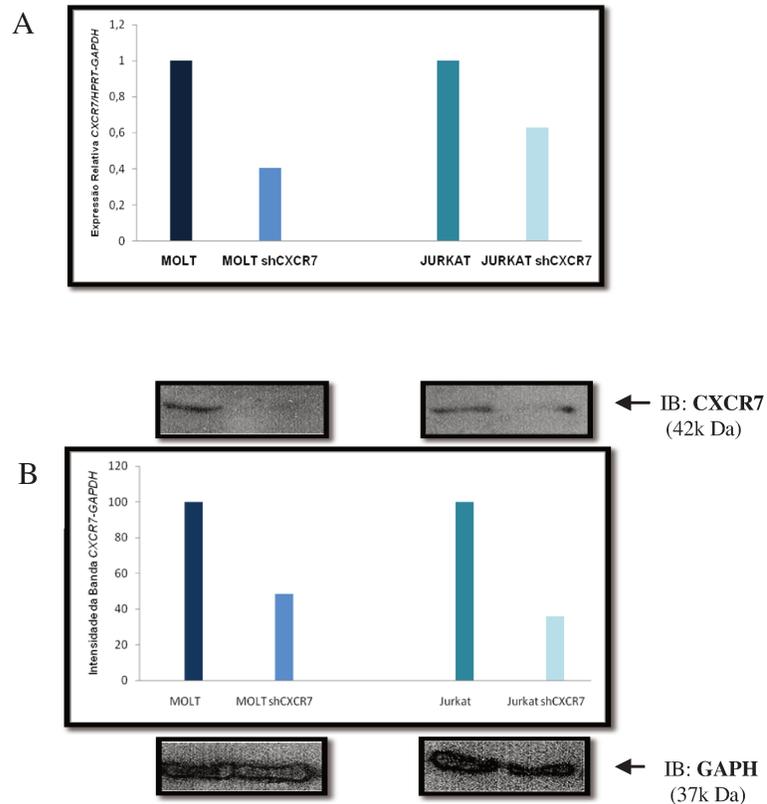
A diferença na capacidade migratória entre as linhagens Molt-4 e Jurkat mostrou-se significativamente estatística ( $P=0.0079$ ) indicando que a localização citoplasmática de CXCR7 encontrada nas células Jurkat pode ser um dos fatores que reduzem a capacidade migratória em resposta a SDF-1.



**Figura 18. Migração de células Molt-4 e Jurkat em resposta a SDF-1.** Células Molt-4 e Jurkat foram submetidas a experimentos de migração em placas Transwell (Costar) por 24 horas, e células Jurkat apresentaram menor capacidade migratória em resposta a SDF-1 (+SDF-1). A diferença na capacidade migratória entre as linhagens linfoblásticas é estatisticamente significativa (Mann-Whitney \* =  $P < 0,05$ ).

### 5.2.3 Avaliação do silenciamento do CXCR7 em células Molt-4 e Jurkat por shRNA mediado por lentivírus

Com o objetivo de avaliar os efeitos do silenciamento de CXCR7 na migração de células linfoblásticas T, células Molt-4 e Jurkat foram transduzidas com shRNA mediado por lentivírus específico para CXCR7 (shCXCR7) ou controle adequado (shGFPcontrol). Após a seleção por puomicina, a expressão de CXCR7 foi determinada por PCRq e Western blot. Redução significativa na expressão gênica ( $\pm 60\%$ ) e protéica ( $\pm 52\%$ ) de CXCR7 foi detectada nas células Molt-4 CXCR7 inibido quando comparados com células Molt-4 controle. O mesmo efeito foi verificado nas células Jurkat que também apresentaram redução significativa na expressão gênica ( $\pm 40\%$ ) e protéica ( $\pm 64\%$ ) ao comparar células CXCR7 inibido com células controle (Figura 19).

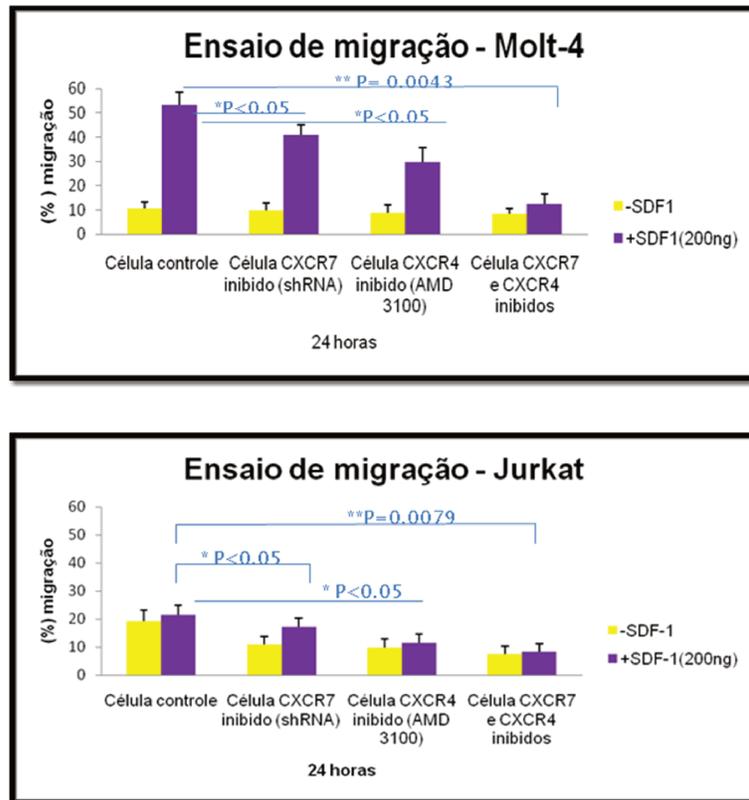


**Figura 19. ShRNA específico para CXCR7 mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de CXCR7 em células Molt-4 e Jurkat.** A quantificação da expressão de CXCR7 nas células CXCR7 inibido em relação a células controle. Expressão dos níveis de CXCR7 foi normalizada pelos controles endógenos *HPRT* e *GAPDH* (A). Os resultados foram analisados usando  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . (B) Análise por Western Blot de extratos protéicos de células CXCR7 inibido e células controle. A membrana foi incubada com anticorpos anti-CXCR7 (42 kDa) ou anti-GAPDH (37 kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel. A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL Western Blot Analysis System. Os gráficos de barras representam a quantificação das intensidades de bandas. A expressão protéica de CXCR7 foi corrigida pela expressão de GAPDH correspondente (UN-SCAN-IT gel™ – 6.1).

#### 5.2.4 Avaliação do silenciamento do CXCR7 na migração de células Molt-4 e Jurkat em resposta a SDF-1

Células Molt-4 controle e CXCR7 inibido e células Jurkat controle e CXCR7 inibido foram previamente tratadas com o antagonista para CXCR4, AMD3100 para serem avaliados também os efeitos da inibição de CXCR4 na migração dessas células.

Células Molt-4 controle, Molt-4 CXCR7 inibido, Molt-4 CXCR4 inibido, Molt-4 CXCR7 e CXCR4 inibidos e células Jurkat controle, Jurkat CXCR7 inibido, Jurkat CXCR4 inibido e Jurkat CXCR7 e CXCR4 inibidos foram submetidas a ensaios de migração. Em ambas as linhagens linfoblásticas T as células que apresentaram CXCR7 inibido mostraram uma menor resposta migratória em relação às células controle. Células Mol-4 controle e Jurkat controle demonstraram um mr de  $53,28\% \pm 5,33$  e  $21,55 \pm 3,33$ , enquanto que células Molt-4 CXCR7 inibido e Jurkat CXCR7 inibido demonstraram um mr de  $40,89\% \pm 4,17$  e  $17,22\% \pm 3,16$ , respectivamente. A inibição de CXCR4 promoveu o mesmo efeito já que células Molt-4 CXCR4 inibido e Jurkat CXCR4 inibido demonstraram um mr de  $29,84\% \pm 5,88$  e  $11,59\% \pm 3,05$ , respectivamente. Porém a inibição de ambos os receptores, CXCR7 e CXCR4, exibiu um efeito sinérgico, células Molt-4 CXCR7 e CXCR4 inibidos e Jurkat CXCR7 e CXCR4 inibidos apresentaram um mr de  $12,45\% \pm 4,12$  e  $8,34\% \pm 2,77$ , respectivamente (Figura 20).



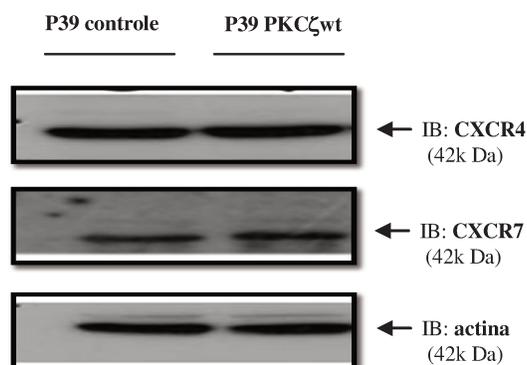
**Figura 20.** Migração de células Molt-4 controle, Molt-4 CXCR7 inibido, Molt-4 CXCR4 inibido, Molt-4 CXCR7 e CXCR4 inibidos e células Jurkat controle, Jurkat CXCR7 inibido, Jurkat CXCR4 inibido, Jurkat CXCR7 e CXCR4 inibidos em resposta a SDF-1. Células foram submetidas a experimentos de migração em placas Transwell (Costar) por 24 horas. A inibição de CXCR7 ou CXCR4 resultou na redução da capacidade migratória de ambas as linhagens linfoblásticas T, porém a inibição de ambos, CXCR7 e CXCR4 resultou em um efeito sinérgico (Mann-Whitney, \* e \*\* =  $P < 0,05$ ).

### 5.2.5 Avaliação dos efeitos da hiperexpressão de PKC $\zeta$ na expressão de CXCR7 e CXCR4 em células P39

Sabe-se que células CD34+ de pacientes com SMD não são atraídas a SDF-1 mesmo expressando níveis normais de CXCR4 [31]. Além disso, a proteína PKC $\zeta$  desempenha um papel crucial no *turn over* de CXCR4 para a membrana celular [75]. Em vista disso, nos interessou verificar se a hiperexpressão de PKC $\zeta$  (PKC $\zeta$ wt) alteraria a expressão de CXCR7 e CXCR4 em células mielóides P39 (modelo bem estabelecido de

SMD). A hiperexpressão de PKC $\zeta$  foi realizada em nosso laboratório pela Dr<sup>a</sup> Carolina Louzão Bigarella durante o seu pós doutorado.

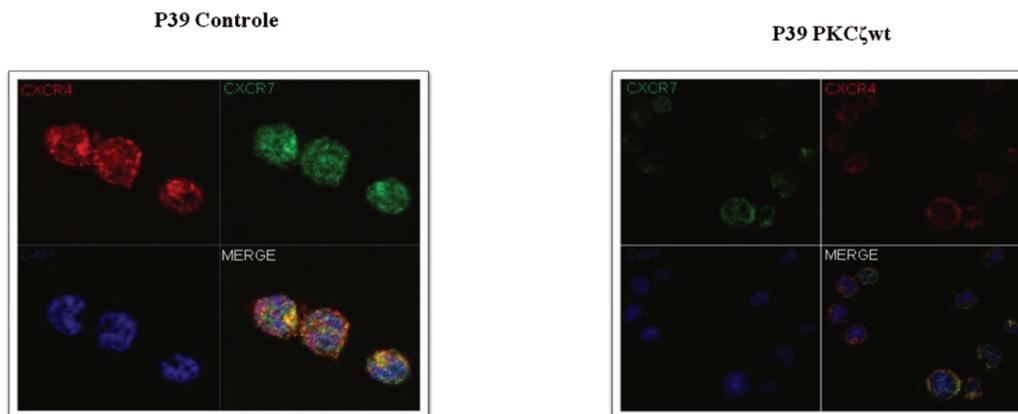
O estudo da expressão proteica de CXCR7 e CXCR4 em células P39 controle e células P39 PKC $\zeta$ wt revelou que a hiperexpressão de PKC $\zeta$  não altera a expressão destes dois receptores em células P39 (Figura 21).



**Figura 21. Expressão protéica de CXCR7 e CXCR4 em células P39 controle e P39 PKC $\zeta$ wt.** Análise por Western Blot da expressão das proteínas CXCR7 e CXCR4 em 50  $\mu$ g de extratos de células P39 e células P39 PKC $\zeta$ wt. Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-CXCR7 (42 kDa) e anti-CXCR4 (42 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL Western BlotAnalysis System. Note a semelhança de expressão de CXCR7 e CXCR4 entre as células P39 controle e P39 PKC $\zeta$ wt mostrando que a hiperexpressão de PKC $\zeta$  não altera a expressão dos receptores CXCR7 e CXCR4.

### 5.2.6 Avaliação dos efeitos da hiperexpressão de PKC $\zeta$ na localização de CXCR7 e CXCR4 em células P39

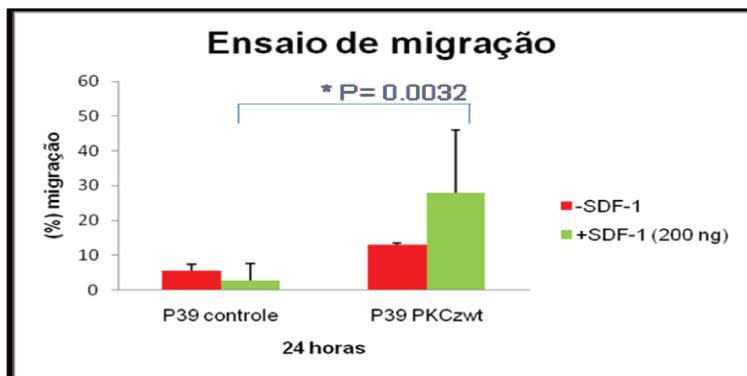
A análise por microscopia confocal mostrou que enquanto células P39 controle apresentam CXCR7 e CXCR4 localizados no citoplasma, células P39 PKC $\zeta$ wt apresentam ambos os receptores preferencialmente localizados na membrana citoplasmática, sugerindo que a hiperexpressão de PKC $\zeta$  promoveu o direcionamento dos receptores para a membrana das células P39 (Figura 22).



**Figura 22. Localização de CXCR7 e CXCR4 em células P39 e P39 PKC $\zeta$ wt.** Análise por microscopia confocal da localização de CXCR7 e CXCR4 em células P39 e P39 PKC $\zeta$ wt. Células previamente imobilizadas em lâminulas foram incubados com anticorpos primários anti-CXCR7 e anti-CXCR4 e anticorpos secundários anti-coelho 488 e anti-camundongo 555. As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 63X de imersão em óleo. Note a localização citoplasmática de CXCR4 e CXCR7 em células P39 controle e a localização principalmente membranar em células P39 PKC $\zeta$ wt sugerindo que a hiperexpressão de PKC $\zeta$  promoveu o direcionamento dos receptores para a membrana das células P39

### 5.2.7 Avaliação da hiperexpressão de PKC $\zeta$ na migração de células P39 em resposta a SDF-1

Células P39 controle e P39 PKC $\zeta$ wt foram submetidas a ensaios de migração. Células P39 controle demonstraram uma razão média migratória (mr) de 2,73%  $\pm$  5,11, enquanto as células P39 PKC $\zeta$ wt demonstraram mr de 27,89%  $\pm$  18,01 mostrando que as células P39 PKC $\zeta$ wt apresentam uma maior capacidade migratória a SDF-1, sugerindo que a hiperexpressão de PKC $\zeta$  resgata a capacidade migratória de células P39 (Figura 24).

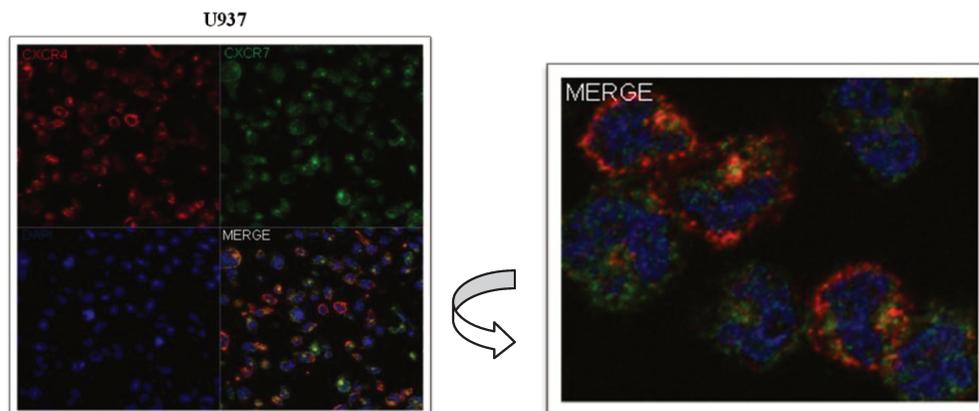


**Figura 23. Migração de células P39 controle e P39 PKCζwt em resposta a SDF-1.** Células P39 controle e P39 PKCζwt foram submetidas a experimentos de migração em placas Transwell (Costar) por 24 horas, e células P39 PKCζwt apresentaram maior capacidade migratória em resposta a SDF-1 (+ SDF-1). A diferença na capacidade migratória entre as células P39 controle e P39 PKCζwt é estatisticamente significativa (Mann-Whitney \* =  $P < 0,05$ ).

### 5.2.8 Avaliação da localização de CXCR7 e CXCR4 em células U937

Sabe-se que células mielóides U937 expressam os receptores CXCR7 e CXCR4 [68] e são atraídas por SDF-1 [81]. Estes dados foram comprovados por nosso laboratório pela Dr<sup>a</sup> Carolina Louzão Bigarella durante seu pós doutorado. Em vista disso, nos interessou em investigar a localização destes receptores nestas células para posterior comparação com os resultados obtidos em células P39.

A análise por microscopia confocal mostrou que células U937 apresentam CXCR4 preferencialmente localizado na membrana citoplasmática e CXCR7 localizado no citoplasma, sugerindo que a presença de CXCR4 na membrana celular é essencial para a migração das células mielóides em resposta a SDF-1 (Figura 24).

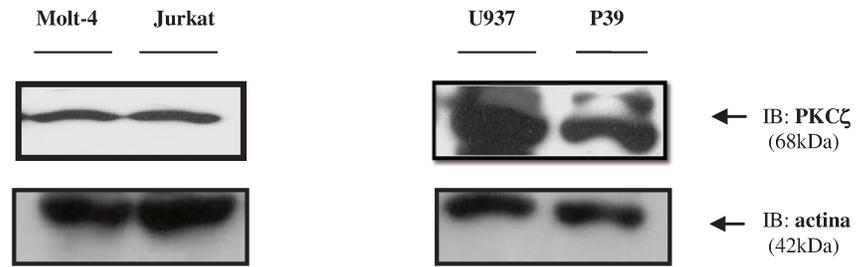


**Figura 24. Localização de CXCR7 e CXCR4 em células U937.** Análise por Microscopia confocal da localização de CXCR7 e CXCR4 em células U937. Células previamente imobilizadas em lamínulas foram incubados com anticorpos primários anti-CXCR7 e anti-CXCR4 e anticorpos secundários anti-coelho 488 e anti-camundongo 555. As lâminas foram analisadas por escaneamento a laser em um LSM-510 (Zeiss) montado sobre um microscópio Axioplan (Zeiss), utilizando a objetiva de 63X de imersão em óleo. Note a localização preferencialmente membranar de CXCR4 e localização citoplasmática de CXCR7 em células U937.

### 5.3 Avaliação da expressão de PKC $\zeta$ em células P39, U937, Molt-4 e Jurkat

O estudo da expressão proteica de PKC $\zeta$  em células mieloides P39 e U937 revelou a presença de expressão de PKC $\zeta$  em ambas as linhagens, porém esta proteína é mais expressa em células U937 (Figura 25).

Já em células linfoblásticas Jurkat e Molt-4 não houve diferença de expressão da proteína PKC $\zeta$ .



**Figura 25. Expressão protéica de PKC $\zeta$  em células P39, U937, Molt-4 e Jurkat.** Análise por Western Blot da expressão da proteína PKC $\zeta$  em 50  $\mu$ g de extratos de células P39, U937, Molt-4 e Jurkat. Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-PKC $\zeta$  (68 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL Western Blot Analysis System. Note a diferença de expressão de PKC $\zeta$  entre as células P39 e U937, estas células expressam mais esta proteína. Já entre as células Jurkat e Molt-4 não foi observada diferença de expressão desta proteína.

## ***6. Discussão***



Quimiocinas desempenham um papel significativo no crescimento, produção e migração celular. Estudos anteriores mostraram uma correlação significativa de receptores de quimiocinas em cânceres humanos e/ou metástases em uma variedade de tumores malignos tais como carcinoma hepatocelular (CCR6), carcinoma gástrico (CCR7), carcinoma renal (CXCR3), câncer de ovário (CXCR4), osteossarcoma (CXCR4), câncer colorectal (CCR7 e CXCR4), e melanoma maligno (CXCR3 e CXCR4) [52]. Neste trabalho nós investigamos a expressão do receptor de quimiocina nomeado CXCR7 em SMD e leucemias agudas. Descobrimos que CXCR7 foi expressa em células da medula óssea de pacientes com SMD e leucemia aguda, sendo a mais alta expressão observada em células de paciente com LLA, que foi confirmado por níveis de proteínas por Western Blot. Aumento da expressão de CXCR7 em células de leucemia linfoblásticas detectado neste estudo é um fenômeno observado em uma variedade de tumores sólidos, tais como cérebro, pulmão, mama, próstata, células renais e glioma e é significativamente associada com o comportamento agressivo do tumor [49, 62]. Em acordo com nossas descobertas sobre a baixa expressão da CXCR7 detectada em células normais de MO, Berahovich e colaboradores [82] recentemente não encontraram nenhuma expressão gênica e protéica de CXCR7 em leucócitos de camundongos e humanos adultos.

A função biológica que o receptor CXCR7 desempenha pode ser específico do tipo celular e dependente de tecidos e órgãos que ele está localizado [68]. Enquanto que em tumores sólidos ele apenas aumenta a proliferação de células malignas [63, 83] foi demonstrado aqui, um papel importante desse receptor na influência no comportamento migratório das linhagens leucêmicas linfoblásticas. Suportando nossos dados, Tarnowski e colaboradores [84] mostraram participação de CXCR7 na migração/adesão de células hematopoéticas malignas, mas não na proliferação.

Relatos na literatura têm demonstrado constantemente uma função crucial de CXCR7 no controle da migração de células CXCR4<sup>+</sup> através de SDF-1 por seqüestro de SDF-1 em excesso. Excesso de quimiocina pode resultar em dessensibilização do receptor de quimiocinas e bloqueio da migração celular, portanto, o seqüestro de SDF-1 por CXCR7 pode ser de importância vital para a migração de células CXCR4<sup>+</sup> [56, 60, 85, 86]. Da

mesma forma, um trabalho recente de Cruz-Orengo e seus colegas [60, 87] mostrou que a expressão de CXCR7 em células endoteliais inflamadas do SNC foi essencial no controle da entrada de leucócitos CXCR4<sup>+</sup> no tecido. Além disso, vários estudos têm demonstrado que a expressão de CXCR7 em células endoteliais influencia positivamente a migração trans-endotelial de células CXCR4<sup>+</sup>. Nossos dados também sugerem que a presença de CXCR7 em células leucemicas linfoblásticas agudas é importante para potencializar a migração promovida por SDF-1/CXCR4. A potencialização de SDF-1/CXCR4 por CXCR7 pode ser devido a heterodimerização com CXCR4 [48, 56, 88, 89]. Porém dados na literatura a respeito do papel de CXCR7 na migração celular são contraditórios, pois também há relatos que este receptor não desempenha um papel importante na migração de células T de pacientes com leucemia linfoblástica crônica (LLC) [90].

Linfócitos têm sido usados como modelo celular para estudos de CXCR7, porém os resultados são contraditórios [68]. Um estudo inicial mostrou alta expressão de CXCR7 em linfócitos humanos T [51], a qual é apoiada por nossos dados, que mostrou alta expressão do gene CXCR7 em células dos pacientes com LLA e alta expressão proteica em células de linhagens linfoblásticas. No entanto, Hartmann et al. [61] relataram níveis muito baixos de CXCR7 nestas células. Esta diferença pode estar relacionada a diferentes protocolos utilizados: nosso estudo detectou CXCR7 intracelular além da membrana, como mostrado por imagens de confocal e citometria de fluxo; receptores intracelulares são enriquecidos na área submembranar chamados endossomos, que é acessível aos anticorpos após a permeabilização celular. No estudo de Hartmann, as células não foram permeabilizadas [61] e CXCR7 só foi detectado na membrana.

Nós relatamos uma diferente distribuição subcelular de CXCR7 entre linhagens celulares Molt-4 e Jurkat. Enquanto CXCR7 está localizado mais próximo à membrana das células Molt-4, em células Jurkat ele se apresenta mais frequentemente no citoplasma. Esta localização celular pode estar relacionada com o maior comportamento de migração de células Molt-4, já CXCR4 foi localizado na membrana em ambas as linhagens celulares. Quando induzidas por SDF-1 estas células mostraram tanto CXCR4 e CXCR7 no citoplasma (dados não publicados), indicando que ambas as linhagens celulares transduzem

a sinalização SDF-1. Este padrão de distribuição subcelular não é confirmada em outros cânceres, como de vesícula biliar e pâncreas, que têm CXCR4 e CXCR7 no citoplasma da célula, sem a estimulação por SDF-1, porém estes estudos não analisaram a capacidade migratória destas células [49, 53].

A maioria dos estudos sobre o envolvimento de quimiocinas e seus receptores no tropismo de células leucêmicas têm-se concentrado sobre a interação de SDF-1 e seu receptore CXCR4. Dado que as células estromais da MO são grandes produtoras de SDF-1 e é sugerido que a expressão de CXCR4 e CXCR7 é superior em blastos residentes na MO que em blastos circulantes, interações SDF-1/CXCR4 provavelmente facilitam a retenção de blastos na MO [91]. Como é sabido que blastos LLA têm altos níveis de CXCR4 e aqui nós detectados altos níveis de CXCR7, é possível que esse receptor potencialize o *homing* e retenção desses blastos na MO. Então, uma inibição de ambos os receptores poderia diminuir o *homing* de blastos leucêmicos no microambiente medular e estaria associada a melhor prognóstico do que bloqueando apenas um receptor [49].

Nossos dados indicam que CXCR7 provavelmente tem um papel importante na transformação de células leucemicas linfoblásticas já que a potencialização da resposta CXCR4 para SDF-1 causada por ele pode aumentar o *homing* e retenção dessas células no interior da medula óssea. Assim, a menor expressão dos receptores CXCR4 e CXCR7 pode estar relacionada a melhor prognóstico em doenças malignas hematopoiéticas.

Depois que foi descoberto que um grande número de moléculas intracelulares são ativadas após a ligação do SDF-1 a CXCR4 em muitos tipos celulares, a via específica (direcional) passou a ser descartada [71]. Uma vez que é bem estabelecido que células CD34<sup>+</sup> de pacientes com SMD não são atraídas pelo gradiente de SDF-1, apesar de terem expressão normal de CXCR4, e que a proteína PKC $\zeta$  vem sendo apontada como central na sinalização SDF-1/CXCR4 [31], nos interessou investigar qual a localização de CXCR4 nas células SMD e se esta irresponsividade estava associada a PKC $\zeta$ . Proteína quinase C é uma família de enzimas que modulam vias de sinalização de alguns receptores. Elas controlam muitas funções celulares importantes, tais como proliferação, sobrevivência e migração celular [92]. PKC $\zeta$ , um subtipo atípico da família de PKC foi encontrado ser

envolvido em muitos tipos de cânceres [93]. Apesar disso, há poucos dados na literatura a respeito do papel de PKC $\zeta$  em doenças hematológicas, como SMD e leucemias.

Migração celular direcionada e polarização celular são cruciais para muitos processos biológicos como respostas imunes, bem como processos patológicos [94]. Nós utilizamos células mielóides P39 e U937 as quais são modelos bem estabelecidos de SMD e LMA, respectivamente. Nós fomos os primeiros a demonstrar que a hiperexpressão de PKC $\zeta$  pode restabelecer a capacidade migratória de células P39 por ocasião a translocação de CXCR4 para a membrana celular nestas células, porém a importância de PKC $\zeta$  na migração celular de células cancerígenas já foi relatado em outros estudos [71, 94-96]. A inibição da expressão de PKC $\zeta$  por siRNA na quimiotaxia prejudicou severamente a capacidade migratória de células LN-229 [94]. Já o efeito de translocação ocasionado por PKC $\zeta$  observado aqui já foi descrito por Goichberg e colaboradores [75], que observaram que a expressão membranar de CXCR4, ou seja, a diminuição da endocitose deste receptor, em células progenitoras estimuladas por níveis de cAMP dependem de PKC $\zeta$ , já que na linhagem celular B1 (deficiente de PKC $\zeta$ ) o nível de CXCR4 não foi afetado e nas células CD34<sup>+</sup> com PKC $\zeta$  inibido a expressão membranar do receptor foi totalmente interrompida. Além disso, Lauanna e colaboradores [97] reportaram o papel de PKC $\zeta$  na migração de neutrófilos. E dentre as outras isoenzimas PKC, somente a inibição desta quinase altera a expressão de CXCR4 e processos como quimiotaxia [72, 75]. Embora muito importante este processo ainda é pouco estudado e merece mais atenção, já que normalmente a relação de PKC $\zeta$  com a migração celular é pouco documentada e a sua função é atribuída a outros fatores, como por exemplo, regulação do rearranjo do citoesqueleto, adesão celular e expressão da metaloprotease MMP-9 [72, 94].

As vias intracelulares que levam ao recrutamento e posterior retenção de células CD34<sup>+</sup> humanas para a cavidade da medula óssea ainda permanecem incertas. Um estudo mostrou que a migração de células primitivas (CD34<sup>+</sup>) para a medula óssea é dependente da via PI3K e PKC $\zeta$  [74]. A junção destes dados com os de Matsuda e colaboradores [31] e os do nosso trabalho aqui apresentado sugerem que a irresponsividade de células CD34<sup>+</sup> de

pacientes com SMD deve ser devido a um defeito na via de sinalização PKC $\zeta$ /CXCR4, já que PKC $\zeta$  está diretamente ligado a via das GPCRs, afetando o *homing* das células progenitoras para a MO e resultando numa hematopoese ineficaz.

Além disso, observamos que células U937, respondem a SDF-1 e apresentam mais PKC $\zeta$  endógeno do que células P39, sugerindo que este pode ser um dos fatores relacionados ao pior prognóstico de doenças hematopoéticas. Este achado está de acordo com artigos sobre glioblastomas que demonstraram que a hiperexpressão de PKC $\zeta$  pode estar envolvida com o fenótipo maligno desta doença, embora níveis de proteína não representem níveis de atividade enzimática [94]. Além de glioblastomas, a expressão de PKC $\zeta$  é importante em inumeros cânceres, como por exemplo, de ovário, cólon, mama, prostata e pulmão [72, 98-100], sendo viável o uso de inibidores desta quinase para a ocorrência de um melhor prognóstico em leucemias.



## ***7. Conclusão***



O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

- 1) Não há diferença na expressão de CXCR7 entre as amostras de medula óssea de pacientes com SMD, LMA e controles normais, porém a expressão de CXCR7 está aumentada em amostras de MO de pacientes com LLA em relação aos controles normais e pacientes com SMD e LMA.
- 2) CXCR7 está expresso em todas as linhagens mielóides e linfoblásticas, porém está mais expresso em LLA-T.
- 3) CXCR7 apresenta diferentes localizações entre as linhagens linfoblásticas T Molt-4 e Jurkat, enquanto ele se apresenta mais próximo da membrana de células Molt-4, em células Jurkat está mais frequentemente no citoplasma.
- 4) Células Molt-4 e Jurkat apresentam diferença na capacidade migratória em resposta a SDF-1. Molt-4 respondem mais a esta quimiocina sugerindo que a localização citoplasmática de CXCR7 pode reduzir a migração celular.
- 5) Em células Molt-4 e Jurkat a inibição de CXCR7 é efetiva e reduz a capacidade migratória. A inibição de CXCR4 provoca o mesmo resultado. Além disso, a inibição de CXCR7 apresenta um efeito sinérgico com CXCR4 na migração celular.
- 6) Em células mielóides P39 a hiperexpressão de PKC $\zeta$  não altera a expressão de CXCR7 e CXCR4, porém aumenta a expressão de CXCR4 e CXCR7 na membrana celular destas células.
- 7) Células P39 não respondem a SDF-1, mas a hiperexpressão de PKC $\zeta$  resgata a capacidade migratória destas células. Além disso, células mielóides U937 respondem a SDF-1, apresentam CXCR4 localizado na membrana e maior expressão de PKC $\zeta$  endógeno em relação às células P39, sugerindo que a irresponsividade das células P39 se deve a baixa expressão de PKC, resultando em uma menor expressão membranar de CXCR4 nestas células.
- 8) Diferente das células mielóides, não há diferença na expressão de PKC $\zeta$  endógeno entre as células linfoblásticas T.



## **8. *Referências***



1. Kiel, M.J. and S.J. Morrison, *Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 290-301.
2. Yin, T. and L. Li, *The stem cell niches in bone*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1195-201.
3. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
4. Nagasawa, T., K. Tachibana, and T. Kishimoto, *A novel CXC chemokine PBSF/SDF-1 and its receptor CXCR4: their functions in development, hematopoiesis and HIV infection*. Semin Immunol, 1998. **10**(3): p. 179-85.
5. Glass, T.J., et al., *Stromal cell-derived factor-1 and hematopoietic cell homing in an adult zebrafish model of hematopoietic cell transplantation*. Blood, 2011. **118**(3): p. 766-74.
6. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.
7. Moser, B., et al., *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004. **25**(2): p. 75-84.
8. Burger, M., et al., *Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells*. Blood, 2005. **106**(5): p. 1824-30.
9. Woodard, L.E. and S. Nimmagadda, *CXCR4-based imaging agents*. J Nucl Med, 2011. **52**(11): p. 1665-9.
10. Yang, R., et al., *The biological behavior of SDF-1/CXCR4 in patients with myelodysplastic syndrome*. Med Oncol, 2011.
11. Burger, J.A. and A. Burkle, *The CXCR4 chemokine receptor in acute and chronic leukaemia: a marrow homing receptor and potential therapeutic target*. Br J Haematol, 2007. **137**(4): p. 288-96.
12. Duda, D.G., et al., *CXCL12 (SDF1alpha)-CXCR4/CXCR7 pathway inhibition: an emerging sensitizer for anticancer therapies?* Clin Cancer Res, 2011. **17**(8): p. 2074-80.
13. Lee, R.L., J. Westendorf, and M.R. Gold, *Differential role of reactive oxygen species in the activation of mitogen-activated protein kinases and Akt by key receptors on B-lymphocytes: CD40, the B cell antigen receptor, and CXCR4*. J Cell Commun Signal, 2007. **1**(1): p. 33-43.
14. Lu, D.Y., et al., *SDF-1alpha up-regulates interleukin-6 through CXCR4, PI3K/Akt, ERK, and NF-kappaB-dependent pathway in microglia*. Eur J Pharmacol, 2009. **613**(1-3): p. 146-54.
15. Princen, K., et al., *Evaluation of SDF-1/CXCR4-induced Ca<sup>2+</sup> signaling by fluorometric imaging plate reader (FLIPR) and flow cytometry*. Cytometry A, 2003. **51**(1): p. 35-45.
16. Roland, J., et al., *Role of the intracellular domains of CXCR4 in SDF-1-mediated signaling*. Blood, 2003. **101**(2): p. 399-406.
17. Sun, X., et al., *CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression*. Cancer Metastasis Rev, 2010. **29**(4): p. 709-22.

18. Peled, A., et al., *The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow*. J Clin Invest, 1999. **104**(9): p. 1199-211.
19. Broxmeyer, H.E., et al., *Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist*. J Exp Med, 2005. **201**(8): p. 1307-18.
20. Wright, D.E., et al., *Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines*. J Exp Med, 2002. **195**(9): p. 1145-54.
21. Aiuti, A., et al., *The chemokine SDF-1 is a chemoattractant for human CD34+ hematopoietic progenitor cells and provides a new mechanism to explain the mobilization of CD34+ progenitors to peripheral blood*. J Exp Med, 1997. **185**(1): p. 111-20.
22. Sugiyama, T., et al., *Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 977-88.
23. Teicher, B.A. and S.P. Fricker, *CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(11): p. 2927-31.
24. Luker, K.E. and G.D. Luker, *Functions of CXCL12 and CXCR4 in breast cancer*. Cancer Lett, 2006. **238**(1): p. 30-41.
25. Salvucci, O., et al., *The role of CXCR4 receptor expression in breast cancer: a large tissue microarray study*. Breast Cancer Res Treat, 2006. **97**(3): p. 275-83.
26. Rhodes, L.V., et al., *Cytokine receptor CXCR4 mediates estrogen-independent tumorigenesis, metastasis, and resistance to endocrine therapy in human breast cancer*. Cancer Res, 2011. **71**(2): p. 603-13.
27. List, A.F., et al., *Myelodysplastic syndromes*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004: p. 297-317.
28. Mufti, G.J., *Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome*. Best Pract Res Clin Haematol, 2004. **17**(4): p. 543-57.
29. Zhang, Y., et al., *SDF-1/CXCR4 axis in myelodysplastic syndromes: Correlation with angiogenesis and apoptosis*. Leuk Res, 2011.
30. Chunkang, C., et al., *The roles of SDF-1/CXCR4 axis and its relationship with apoptosis in the myelodysplastic syndromes*. Med Oncol, 2011. **28 Suppl 1**: p. 494-500.
31. Matsuda, M., et al., *CD34+ progenitors from MDS patients are unresponsive to SDF-1, despite high levels of SDF-1 in bone marrow plasma*. Leukemia, 2004. **18**(5): p. 1038-40.
32. Fuhler, G.M., et al., *Reduced activation of protein kinase B, Rac, and F-actin polymerization contributes to an impairment of stromal cell derived factor-1 induced migration of CD34+ cells from patients with myelodysplasia*. Blood, 2008. **111**(1): p. 359-68.
33. Milella, M., et al., *Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 851-9.
34. Testa, U. and R. Riccioni, *Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2007. **92**(1): p. 81-94.

35. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Haematol, 1976. **33**(4): p. 451-8.
36. Digiuseppe, J.A., *Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy*. Clin Lab Med, 2007. **27**(3): p. 533-49, vi.
37. Wen, Q., et al., *[Level of SDF-1/CXCR4 in children with acute leukemia and its significance]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2011. **19**(2): p. 324-6.
38. Beider, K., et al., *CXCR4 antagonist 4F-benzoyl-TN14003 inhibits leukemia and multiple myeloma tumor growth*. Exp Hematol, 2011. **39**(3): p. 282-92.
39. Zeng, Z., et al., *Inhibition of CXCR4 with the novel RCP168 peptide overcomes stroma-mediated chemoresistance in chronic and acute leukemias*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(12): p. 3113-21.
40. Fierro, F.A., et al., *Combining SDF-1/CXCR4 antagonism and chemotherapy in relapsed acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2009. **23**(2): p. 393-6.
41. Ge, J., et al., *Stromal-derived factor-1 deficiency in the bone marrow of acute myeloid leukemia*. Int J Hematol, 2011. **93**(6): p. 750-9.
42. Mohle, R., et al., *Functional response of leukaemic blasts to stromal cell-derived factor-1 correlates with preferential expression of the chemokine receptor CXCR4 in acute myelomonocytic and lymphoblastic leukaemia*. Br J Haematol, 2000. **110**(3): p. 563-72.
43. Sanz-Rodriguez, F., A. Hidalgo, and J. Teixido, *Chemokine stromal cell-derived factor-1alpha modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1*. Blood, 2001. **97**(2): p. 346-51.
44. Matsunaga, T., et al., *Interaction between leukemic-cell VLA-4 and stromal fibronectin is a decisive factor for minimal residual disease of acute myelogenous leukemia*. Nat Med, 2003. **9**(9): p. 1158-65.
45. Parameswaran, R., et al., *Combination of drug therapy in acute lymphoblastic leukemia with a CXCR4 antagonist*. Leukemia, 2011. **25**(8): p. 1314-23.
46. Juarez, J.G., et al., *CXCR4 mediates the homing of B cell progenitor acute lymphoblastic leukaemia cells to the bone marrow via activation of p38MAPK*. Br J Haematol, 2009. **145**(4): p. 491-9.
47. Decaillot, F.M., et al., *CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration*. J Biol Chem, 2011. **286**(37): p. 32188-97.
48. Boudot, A., et al., *Differential estrogen-regulation of CXCL12 chemokine receptors, CXCR4 and CXCR7, contributes to the growth effect of estrogens in breast cancer cells*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20898.
49. Yao, X., et al., *High expression of CXCR4 and CXCR7 predicts poor survival in gallbladder cancer*. J Int Med Res, 2011. **39**(4): p. 1253-64.
50. Burns, J.M., et al., *A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development*. J Exp Med, 2006. **203**(9): p. 2201-13.
51. Balabanian, K., et al., *The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(42): p. 35760-6.

52. Li, T., et al., *The expression of CXCR4, CXCL12 and CXCR7 in malignant pleural mesothelioma*. J Pathol, 2011. **223**(4): p. 519-30.
53. Shimizu, S., et al., *CXCR7 protein expression in human adult brain and differentiated neurons*. PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20680.
54. Thelen, M., *Dancing to the tune of chemokines*. Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 129-34.
55. Thelen, M. and S. Thelen, *CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio?* J Neuroimmunol, 2008. **198**(1-2): p. 9-13.
56. Naumann, U., et al., *CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9175.
57. Mazzinghi, B., et al., *Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells*. J Exp Med, 2008. **205**(2): p. 479-90.
58. Rajagopal, S., et al., *Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(2): p. 628-32.
59. Luker, K.E., M. Gupta, and G.D. Luker, *Imaging chemokine receptor dimerization with firefly luciferase complementation*. FASEB J, 2009. **23**(3): p. 823-34.
60. Monnier, J., et al., *CXCR7 is up-regulated in human and murine hepatocellular carcinoma and is specifically expressed by endothelial cells*. Eur J Cancer, 2012. **48**(1): p. 138-48.
61. Hartmann, T.N., et al., *A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells*. J Leukoc Biol, 2008. **84**(4): p. 1130-40.
62. Miao, Z., et al., *CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(40): p. 15735-40.
63. Wang, J., et al., *The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer*. J Biol Chem, 2008. **283**(7): p. 4283-94.
64. Levoye, A., et al., *CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6085-93.
65. Zabel, B.A., et al., *The novel chemokine receptor CXCR7 regulates trans-endothelial migration of cancer cells*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 73.
66. Yoshida, D., R. Nomura, and A. Teramoto, *Signalling pathway mediated by CXCR7, an alternative chemokine receptor for stromal-cell derived factor-1alpha, in AtT20 mouse adrenocorticotrophic hormone-secreting pituitary adenoma cells*. J Neuroendocrinol, 2009. **21**(5): p. 481-8.
67. Maksym, R.B., et al., *The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer*. Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 31-40.
68. Tarnowski, M., et al., *CXCR7: a new SDF-1-binding receptor in contrast to normal CD34(+) progenitors is functional and is expressed at higher level in human malignant hematopoietic cells*. Eur J Haematol, 2010. **85**(6): p. 472-83.

69. Sierro, F., et al., *Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(37): p. 14759-64.
70. Toker, A., *Signaling through protein kinase C*. Front Biosci, 1998. **3**: p. D1134-47.
71. Petit, I., et al., *Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(1): p. 168-76.
72. Liu, Y., et al., *Down-regulation of PKCzeta expression inhibits chemotaxis signal transduction in human lung cancer cells*. Lung Cancer, 2009. **63**(2): p. 210-8.
73. Wu, D., C.K. Huang, and H. Jiang, *Roles of phospholipid signaling in chemoattractant-induced responses*. J Cell Sci, 2000. **113** ( Pt 17): p. 2935-40.
74. Wang, J.F., I.W. Park, and J.E. Groopman, *Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C*. Blood, 2000. **95**(8): p. 2505-13.
75. Goichberg, P., et al., *cAMP-induced PKCzeta activation increases functional CXCR4 expression on human CD34+ hematopoietic progenitors*. Blood, 2006. **107**(3): p. 870-9.
76. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on*. Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 581-5.
77. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
78. Miekus, K., et al., *Role of I-TAC-binding receptors CXCR3 and CXCR7 in proliferation, activation of intracellular signaling pathways and migration of various tumor cell lines*. Folia Histochem Cytobiol, 2010. **48**(1): p. 104-11.
79. de Kok, J.B., et al., *Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes*. Lab Invest, 2005. **85**(1): p. 154-9.
80. Korz, C., et al., *Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes*. Blood, 2002. **99**(12): p. 4554-61.
81. Blades, M.C., et al., *Stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) induces monocyte migration into human synovium transplanted onto SCID Mice*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(3): p. 824-36.
82. Berahovich, R.D., et al., *CXCR7 protein is not expressed on human or mouse leukocytes*. J Immunol, 2010. **185**(9): p. 5130-9.
83. Grymula, K., et al., *Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas*. Int J Cancer, 2010. **127**(11): p. 2554-68.
84. Tarnowski, M., et al., *Regulation of expression of stromal-derived factor-1 receptors: CXCR4 and CXCR7 in human rhabdomyosarcomas*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(1): p. 1-14.

85. Boldajipour, B., et al., *Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration*. Cell, 2008. **132**(3): p. 463-73.
86. Mahabaleshwar, H., B. Boldajipour, and E. Raz, *Killing the messenger: The role of CXCR7 in regulating primordial germ cell migration*. Cell Adh Migr, 2008. **2**(2): p. 69-70.
87. Cruz-Orengo, L., et al., *CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity*. J Exp Med, 2011. **208**(2): p. 327-39.
88. Werner, L., et al., *Reciprocal regulation of CXCR4 and CXCR7 in intestinal mucosal homeostasis and inflammatory bowel disease*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(3): p. 583-90.
89. Mellado, M., et al., *Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways*. EMBO J, 2001. **20**(10): p. 2497-507.
90. Borge, M., et al., *CXCL12-induced chemotaxis is impaired in T cells from patients with ZAP-70-negative chronic lymphocytic leukemia*. Haematologica, 2010. **95**(5): p. 768-75.
91. Faaij, C.M., et al., *Chemokine/chemokine receptor interactions in extramedullary leukaemia of the skin in childhood AML: differential roles for CCR2, CCR5, CXCR4 and CXCR7*. Pediatr Blood Cancer, 2010. **55**(2): p. 344-8.
92. Donson, A.M., et al., *Protein kinase C zeta isoform is critical for proliferation in human glioblastoma cell lines*. J Neurooncol, 2000. **47**(2): p. 109-15.
93. Sun, R., et al., *Protein kinase C zeta is required for epidermal growth factor-induced chemotaxis of human breast cancer cells*. Cancer Res, 2005. **65**(4): p. 1433-41.
94. Guo, H., et al., *Reduction of protein kinase C zeta inhibits migration and invasion of human glioblastoma cells*. J Neurochem, 2009. **109**(1): p. 203-13.
95. Picinich, S.C., J.W. Glod, and D. Banerjee, *Protein kinase C zeta regulates interleukin-8-mediated stromal-derived factor-1 expression and migration of human mesenchymal stromal cells*. Exp Cell Res, 2010. **316**(4): p. 593-602.
96. Wu, J., et al., *Screening of a PKC zeta-specific kinase inhibitor PKCzI257.3 which inhibits EGF-induced breast cancer cell chemotaxis*. Invest New Drugs, 2010. **28**(3): p. 268-75.
97. Laudanna, C., et al., *Evidence of zeta protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis*. J Biol Chem, 1998. **273**(46): p. 30306-15.
98. Tatsuda, Y., et al., *Protein kinase C is inhibited by bisphosphonates in prostate cancer PC-3 cells*. Eur J Pharmacol, 2010. **627**(1-3): p. 348-53.
99. Luna-Ulloa, L.B., et al., *Protein kinase C zeta is a positive modulator of canonical Wnt signaling pathway in tumoral colon cell lines*. Carcinogenesis, 2011. **32**(11): p. 1615-24.
100. Nazarenko, I., et al., *Atypical protein kinase C zeta exhibits a proapoptotic function in ovarian cancer*. Mol Cancer Res, 2010. **8**(6): p. 919-34.

# ***ANEXOS***



## Parecer do Comitê de Ética



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

(0\_19) 3788-8936

FAX (0\_19) 3788-8925

[www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

[cep@fem.unicamp.br](mailto:cep@fem.unicamp.br)

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

**PARECER PROJETO: N° 124/2005**

### I-IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: "INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NOVOS GENES ALVO E NOVAS TERAPÊUTICAS NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS E EM LINHAGENS LEUCÊMICAS"**

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Terezinha Olalla Saad

INSTITUIÇÃO: Centro de Hematologia e Hemoterapia - UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/05/2005

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/06

### II - OBJETIVOS

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

### III - SUMÁRIO

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

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

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

### V - PARECER DO CEP

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

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

### VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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

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

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro

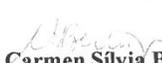
centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

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

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

#### **VII - DATA DA REUNIÃO**

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

  
**Profa. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo**  
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
FCM / UNICAMP