

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Fisiopatologia

ROSANA LOPES RODRIGUES AMON

Células-tronco mesenquimais irradiadas: influência do efeito espectador sobre os controles da hematopoese

São Paulo

2024

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia)

Área de Fisiopatologia

ROSANA LOPES RODRIGUES AMON

Células-tronco mesenquimais irradiadas: influência do efeito espectador sobre os controles da hematopoese

Versão Corrigida

Dissertação para obtenção do título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock

São Paulo

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

A523c Amon, Rosana Lopes Rodrigues
Células-tronco mesenquimais irradiadas:
influência do efeito espectador sobre os controles
da hematopoese / Rosana Lopes Rodrigues Amon. - São
Paulo, 2024.
98 p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas -
Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia
e Toxicologia).
Orientador: Fock, Ricardo Ambrósio

1. Célula-tronco mesenquimal. 2. Efeito
espectador. 3. Hematopoese. I. T. II. Fock, Ricardo
Ambrósio, orientador.

ROSANA LOPES RODRIGUES AMON

Células-tronco mesenquimais irradiadas: influência do efeito espectador sobre os
controles da hematopoese

Comissão julgadora da dissertação para obtenção do título de Mestre

Prof. Dr. Ricardo Ambrósio Fock
Orientador/Presidente

1º Examinador

2º Examinador

3º Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2024

Dedicatória

À minha amiga de vida e profissão **Beatriz Almeida**, por todos os momentos e aprendizados, pelo apoio profissional e pessoal em todos os momentos da minha vida, me motivando sempre.

À minha avó **Vanda** por todo carinho e apoio em todas as etapas da minha vida, me empenhando a não desistir.

Ao meu irmão **Igor** por me ajudar a tornar meus sonhos realidade, compartilhando momentos e me ensinando muito.

À minha madrinha **Aline** e ao meu padrinho **Fernando** por acreditarem e se dedicarem para que eu possa seguir meus objetivos, sendo minhas referências.

À minha mãe **Silvia** e meu pai **Mihaly** por me proporcionarem o dom da vida e serem meu alicerce para seguir meus sonhos e torná-los realidade.

Dedicatória

Ao Professor **Dr. Ricardo Ambrósio Fock**, por me orientar e contribuir para meu crescimento pessoal e profissional, com profissionalismo e amizade. Confiando a mim a realização do presente trabalho.

Agradecimentos

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF-USP), em nome de seu diretor, Prof. Dr. Humberto Gomes Ferraz.

À Comissão de Pós-Graduação em Farmácia (CPG) da FCF-USP.

À Comissão Coordenadora de Programa (CCP) do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia da FCF-USP.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia da FCF-USP.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Farmácia: Fisiopatologia e Toxicologia, pela paciência e disponibilidade para ajudar.

À chefia do Departamento de Análises Clínicas (FBC) da FCF-USP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Agradeço a concessão de bolsa (Processo 88887.688791/2022-00).

Aos professores Dr. Joilson de Oliveira Martins, Dr. João Agostinho Machado Neto e Dr. Sandro Rogério de Almeida, pelas contribuições excelentes perante meu exame de qualificação.

À Professora Doutora Primavera Borelli por ser uma referência na área de hematologia, por contribuir com minha formação acadêmica e estar sempre disposta a ajudar.

Ao Professor Dr. Ricardo Ambrósio Fock pela orientação no presente trabalho, ensinamentos e confiança em mim depositada. Agradeço por me guiar no meu processo de aprendizagem e formação acadêmica, e me orientar com dedicação e amizade. E agradeço pelos momentos de descontração e risadas, que me proporcionaram momentos incríveis do processo de mestrado.

Às Professoras Dr^a. Silvy Stuchi Maria Engler e Dr^a Sabrina Epiphanyo por todos os ensinamentos e apoio durante a monitoria. E também ao Programa de Aperfeiçoamento ao Ensino pela oportunidade de desenvolvimento pedagógico nas monitorias.

Ao Edson Naoto Makiyama pelos ensinamentos que me fizeram crescer profissional e pessoalmente, pela amizade, momentos de risadas e conversas durante

meu processo de mestrado, que serão parte de uma memória alegre de todo o tempo de pós-graduação.

Aos demais colegas do Laboratório de Hematologia Clínica e Experimental da FCF-USP, Kalil, Iolanda, Sumara, Carlos, Juliana e Jeremias, pela troca de conhecimento, companheirismo e risadas.

À minha amiga de vida e profissão Beatriz Almeida, por todo companheirismo e amizade ao longo de todos esses anos. Agradeço por seu apoio profissional e emocional durante esta etapa da minha carreira, bem como pelos seus ensinamentos e trocas que tivemos ao longo do processo de mestrado, e de vida. Obrigada por compartilharmos a vida e profissão.

À toda minha família pelo suporte e dedicação, em especial ao meu irmão Igor que esteve ao meu lado e me apoiou em minhas decisões, me fortalecendo durante todo o processo. À minha avó Vanda pelo carinho e apoio incondicionais em minha vida e carreira. Aos meus padrinhos Aline e Fernando por todo suporte e dedicação à minha formação pessoal e profissional. Aos meus pais Silvia e Mihaly, por me apoiarem, sendo minha base e meu alicerce para que eu pudesse desenvolver e seguir meus sonhos, sempre me incentivando a não desistir e me auxiliando no meu crescimento profissional, pessoal e emocional, e compreenderem minha ausência enquanto eu me dedicava a este trabalho. Obrigada por fazerem todo este processo ser mais leve, tendo nos senhores, pessoas que eu posso dividir todos meus momentos e compartilhar todas as alegrias e os momentos nem tão alegres.

Por fim, agradeço a mim, me orgulhando de minha dedicação, persistência e resiliência, me mantendo sempre no caminho que desejei trilhar, independente dos momentos e situações vividos.

A todos, minha eterna gratidão!

*“Educação não transforma o mundo.
Educação muda as pessoas. Pessoas
transformam o mundo.” (Paulo Freire)*

Resumo

AMON, R. L. R. **Células-tronco mesenquimais irradiadas: influência do efeito espectador sobre os controles da hematopoese.** 2024. 98p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2024.

O processo de hematopoese compreende a produção de células sanguíneas e tem como protagonista o microambiente hematopoético (MH). No MH tem-se a participação do sistema hematopoético, compreendido principalmente pelas células-tronco hematopoéticas (CTH), e o sistema estromal, de sustentação e suporte para a hematopoese, com seu principal representante: a célula-tronco mesenquimal (CTM). Dentro desse contexto, caracteriza-se a CTM como reguladora de outros tipos celulares, sendo de suma importância na modulação das CTH. Com isso, faz-se importante relatar que malignidades hematopoéticas podem afetar o MH e a radiação é uma importante ferramenta terapêutica. Neste âmbito, o processo de radioterapia não atinge somente as células neoplásicas presentes no MH, como também as CTM saudáveis, que podem sofrer alterações e modular, através do efeito espectador, as CTH. Este efeito se caracteriza por células não irradiadas que apresentam alterações em sua fisiologia promovidas por células diretamente irradiadas. Desta forma, CTH, que têm como objetivo reestabelecer a hematopoese após o tratamento radioterápico, podem sofrer modificações na proliferação e diferenciação devido ao efeito espectador. Tendo isso, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar a influência direta da radiação nas CTM e se estas células modulariam, através do efeito espectador, o processo de hematopoese. Para tal, foram realizadas culturas de linhagem mesenquimal ($C_3H_{10}T_{1/2}$) que foram submetidas a irradiação, e, posteriormente, após suas avaliações, foram realizadas culturas condicionadas com os sobrenadantes irradiados e células de linhagem hematopoética (C1498). Como metodologias, a cultura 3D, a citometria de fluxo para viabilidade e ciclo celular, o PCR e imunofenotipagem, foram utilizados para caracterizar as alterações nas C1498 frente ao efeito espectador. E, através da citometria de fluxo, foi possível caracterizar que as CTM sofrem alteração a partir da dose de 6Gy, pela avaliação do ciclo celular e viabilidade. A modulação gênica apontou aumento da expressão de Bax e Cdkn1a em CTM irradiadas a partir de 6Gy. O marcador γ -H2AX também se mostrou alterado em CTM irradiadas. Dentre os fatores solúveis produzidos pelas CTM irradiadas, apenas a IL-6 apresentou diminuição de sua síntese quando estas células eram irradiadas, principalmente, com 6Gy. Frente a modulação espectadora, as células C1498 tiveram diminuição da capacidade clonogênica em cultura 3D em relação a quantidade de colônias formadas e sua densidade, diminuição da expressão gênica de Ccnd1 e Gata-3, bem como diminuição destas células nas fases S/G2/M do ciclo celular, e alteração das suas características imunofenotípicas com diminuição de células marcadas com CD3, sendo todas estas modulações nas C1498 promovidas pelas CTM irradiadas com 6Gy, em ambiente estimulado com G-CSF. Por conseguinte, haja vista a importância das CTM em modular as células hematopoéticas, em uma situação de irradiação, CTM modulam negativamente células hematopoéticas, diminuindo proliferação e diferenciação linfóide destas células.

Palavras-chave: Célula-tronco mesenquimal; Efeito espectador; Hematopoese.

Abstract

AMON, R. L. R. **Irradiated mesenchymal stem cells: influence of the bystander effect on hematopoiesis controls.** 2024. 98p. Dissertation (master's degree) - School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, 2024.

Process of hematopoiesis involves the production of blood cells and has the hematopoietic microenvironment (HM) as its protagonist. In the HM there is the participation of the hematopoietic system, comprised of hematopoietic stem cells (HSC), and the stromal system, which sustains and supports hematopoiesis, with its main representative: the mesenchymal stem cell (MSC). Within this context, the MSC is characterized as a regulator of other cell types, being of paramount importance in the modulation of HSCs. It is therefore important to note that hematopoietic malignancies can affect HM and that radiation is an important therapeutic tool. In this context, the radiotherapy process not only affects the neoplastic cells present in the HM, but also the healthy MSC, which can undergo alterations and modulate the HSC through the bystander effect. This effect is characterized by non-irradiated cells showing changes in their physiology caused by directly irradiated cells. In this way, HSCs, which aim to re-establish hematopoiesis after radiotherapy treatment, can undergo changes in proliferation and differentiation due to the bystander effect. The general aim of this study was to assess the direct influence of radiation on MSCs and whether these cells modulate the process of hematopoiesis through the bystander effect. To this end, mesenchymal lineage cultures (C₃H₁₀T_{1/2}) were subjected to irradiation and then, after their evaluation, conditioned cultures were made with the irradiated supernatants and hematopoietic lineage cells (C1498). As methodologies, 3D cultures, flow cytometry for viability and cell cycle, PCR and immunophenotyping were used to characterize the alterations in C1498 cells in the face of the bystander effect. And, through flow cytometry, it was possible to characterize that the MSC undergo changes from the dose of 6Gy, by evaluating the cell cycle and viability. Gene modulation showed an increase in the expression of Bax and Cdkn1a in MSCs irradiated after 6Gy. The γ -H2AX marker was also altered in irradiated MSCs. Among the soluble factors produced by irradiated MSC, only IL-6 showed a decrease in its synthesis when these cells were irradiated, with 6Gy. Faced with bystander modulation, C1498 cells showed a decrease in clonogenic capacity in 3D culture in relation to the number of colonies formed and their density, a decrease in Ccnd1 and Gata-3 gene expression, as well as a decrease in these cells in the S/G2/M phases of the cell cycle, and alterations in their immunophenotypic characteristics with a decrease in CD3-labeled cells, all of which were promoted by 6Gy-irradiated MSCs in an environment stimulated with G-CSF. Therefore, given the importance of MSC in modulating hematopoietic cells, in a situation of irradiation, MSC negatively modulate hematopoietic cells, decreasing proliferation and lymphoid differentiation of these cells.

Keywords: Mesenchymal stem cell; Bystander effect; Hematopoiesis.

Lista de figuras

Figura 1 - Modelo hierárquico da hematopoese e caracterização fenotípica das CTH e progenitores hematopoéticos	28
Figura 2 - Caracterização dos principais fatores regulatórios do processo de diferenciação da célula tronco hematopoética e progenitores hematopoéticos	30
Figura 3 - Esquema simplista de estímulos para as diferentes poeses.	31
Figura 4 - Figura esquematizada do ciclo celular com suas duas fases (Intérfase e Mitose), bem como a determinação dos seus checkpoints; Síntese e degradação das ciclinas observadas pela concentração destas nos diferentes momentos do ciclo celular. Ademais, cada ciclicna associada a uma CDK em seus respectivos checkpoints	33
Figura 5 - Resumo gráfico da metodologia utilizada para o desenvolver do trabalho	35
Figura 6 - Fotomicrografia da cultura celular da linhagem C ₃ H ₁₀ T _{1/2} . Aumento de 200x	36
Figura 7 – Fotomicrografia da cultura celular da linhagem C1498. Aumento de 200x.	37
Figura 8 – Coloração de Roselfed do citocentrifugado da cultura de C1498 em meio DMEM. Aumento de 600x.	38
Figura 9 – Esquema gráfico do sistema de cultura condicionada utilizado neste estudo.....	46
Figura 10 – Esquema de plaqueamento de 1N.	50
Figura 11 - Avaliação da viabilidade celular das CTM após 24h do processo de irradiação.....	54
Figura 12 – Avaliação do ciclo celular e senescência das CTM após 24 horas do processo de irradiação.	55
Figura 13 – Expressão dos genes relacionados ao controle de apoptose nas CTM após 24h de irradiação.	56
Figura 14 – Quantificação de γ -H2AX nas CTM após 3 horas de irradiação. Com destaque para a dose de 6Gy que foi escolhida para o decorrer do estudo.	57
Figura 15 – Relação das citocinas e NO produzidos pelas CTM irradiadas, após 24h.	58
Figura 16 – Contagem do número de colônias celulares originadas a partir do plaqueamento de C1498 em meio MethoCult [®] após 14 dias de experimento.....	59
Figura 17 – Fotos representativas da cultura de C1498 em metilcelulose (MethoCult [®]) em 14 dias de experimento.	60
Figura 18 – Dados de absorbância, em nm, das colônias após o ensaio de MTT da cultura 3D em metilcelulose (MethoCult [®]).	61
Figura 19 - Dados de absorbância, em nm, das colônias após o teste de MPO da cultura 3D em metilcelulose (MethoCult [®]).	62
Figura 20 – Dados das comparações dos valores de absorbância esperado de MPO em relação aos valores de MTT e os valores obtidos após a realização do experimento.....	62
Figura 21 - Avaliação da viabilidade celular das C1498 após 24h do processo de cultura condicionada.....	63
Figura 22 – Avaliação do ciclo celular das C1498 após 24 horas do processo de cultura condicionada.....	64

Figura 23 – Expressão de genes associados ao ciclo celular na C1498 submetida ao sistema de cultura condicionada com os sobrenadantes 6Gy e 0Gy sem estímulo de G-CSF.	65
Figura 24 – Estratégia de análise para as amostras de imunofenotipagem, tanto com e sem estímulo, para todos painéis.	66
Figura 25 – Expressão de marcadores de superfície e MPO intracelular associados a diferenciação celular da C1498 submetida ao sistema de cultura condicionada com os sobrenadantes 6Gy e 0Gy sem estímulo de G-CSF.	67
Figura 26 - Avaliação da viabilidade celular das C1498 após 24h do processo de cultura condicionada estimulada com G-CSF.	68
Figura 27 – Avaliação do ciclo celular das C1498 após 24 horas do processo de cultura condicionada estimulada com G-CSF.	69
Figura 28 - Expressão de genes associados ao ciclo celular na C1498 submetida ao sistema de cultura condicionada com os sobrenadantes 6Gy e 0Gy com estímulo de G-CSF.	70
Figura 29 – Heat map elaborado com os dados já apresentados de 4 experimentos independentes (grupos 6Gy e 0Gy sem estímulo) juntamente com os dados dos 4 experimentos independentes dos grupos com G-CSF.	71
Figura 30 – Expressão de marcadores de superfície e MPO intracelular associados a diferenciação celular da C1498 submetida ao sistema de cultura condicionada com os sobrenadantes 6Gy e 0Gy sem estímulo de G-CSF.	72
Figura 31 – Resumo gráfico dos principais resultados obtidos neste trabalho.	83

Lista de tabelas

Tabela 1 - Características da linhagem C ₃ H ₁₀ T _{1/2}	36
Tabela 2 - Características da linhagem C1498.....	37
Tabela 3 – Preparo de Anexina-V e 7-AAD referente a uma amostra.	39
Tabela 4 - Relação dos reagentes para síntese de cDNA, bem como suas respectivas quantidades referente a 1 amostra.....	42
Tabela 5 - Relação dos reagentes para realização do PCR em tempo real, bem como suas respectivas quantidades.	43
Tabela 6 – Relação dos grupos de cultura condicionada.....	46
Tabela 8 – Painel de anticorpos utilizados para diferenciação celular por imunofenotipagem.....	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Ccnd1	<i>Cyclin D1</i>
Ccnd2	<i>Cyclin D2</i>
Ccne1	<i>Cyclin E1</i>
CD115	<i>Cluster of differentiation 115</i>
CD11b	<i>Cluster of differentiation 11b</i>
CD14	<i>Cluster of differentiation 14</i>
CD3	<i>Cluster of differentiation 3</i>
CD34	<i>Cluster of differentiation 34</i>
CD45	<i>Cluster of differentiation 45</i>
CD73	<i>Cluster of differentiation 73</i>
CD90e	<i>Cluster of differentiation 90e</i>
CDK	Cinase dependente de ciclina
Cdkn1a	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i>
Cdkn1b	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i>
cDNA	<i>Complementar Deoxyribonucleic Acid</i>
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
CT	Célula-tronco
CTA	Célula-tronco adulta
CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Célula-tronco hematopoética
CTM	Célula-tronco mesenquimal
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DSB	Quebra de dupla fita de DNA
EPO	Eritropoetina
Gata-1	<i>GATA binding protein 1</i>
Gata-3	<i>GATA binding protein 3</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte and Monocyte Colony-stimulating factor</i>
Gy	<i>Gray</i>
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
ICT	Irradiação corporal total
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
INCA	Instituto Nacional do Câncer
JAK	<i>Janus kinase</i>
LA	Leucemia aguda
LM	Leucemia mieloide
LMA	Leucemia mieloide aguda
LT-HSC	<i>Long term hematopoetic Stem Cell</i>
MAC-3	Integrina Mac-3
MEC	Matriz extracelular
M-GSF	<i>Monocyte Colony-stimulating factor</i>

MH	Microambiente hematopoético
MO	Medula óssea
MPO	Mieloperoxidase
MPP	<i>Multipotent progenitors</i>
Nanog	<i>Nanog homeobox</i>
NH	Neoplasia hematológica
NK	<i>Natural Killer</i>
NO	<i>Nitric oxide</i>
OH ⁻	Íon hidroxila
PBS	<i>Phosphate saline solution</i>
PCR	<i>Polymer chain reaction</i>
PI	<i>Propidium Iodide</i>
Pou5f1	<i>POU class 5 homeobox 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
SFB	Soro fetal bovino
Sox2	<i>SRY-box transcription factor 2</i>
Spi1	<i>Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene</i>
SSB	Quebra de fita simples de DNA
STAT	<i>Signal-transducer and activator of transcription protein</i>
ST-HSC	<i>Short term hematopoetic Stem Cell</i>
Sv	<i>Siervier</i>
TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TMO	Transplante de medula óssea
TPO	Trombopoetina

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	30
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. RADIAÇÃO E RADIOTERAPIA	19
1.2. EFEITO ESPECTADOR	22
1.3. CÉLULAS-TRONCO	23
1.4. CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	24
1.5. MICROAMBIENTE HEMATOPOÉTICO.....	25
1.6. CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA.....	26
1.7. HEMATOPOESE.....	27
2. HIPÓTESE E OBJETIVOS	34
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1. CÉLULAS UTILIZADAS NESTE ESTUDO.....	36
3.1.1. <i>C₃H₁₀T_{1/2}</i>	36
3.1.2. <i>C1498</i>	37
3.2. CULTIVO DAS <i>C₃H₁₀T_{1/2}</i>	38
3.3. IRRADIAÇÃO	38
3.4. AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CTM APÓS IRRADIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	39
3.5. AVALIAÇÃO DA SENESCÊNCIA E CICLO CELULAR DAS CTM IRRADIADAS	40
3.6. EXPRESSÃO DE BCL-2, BAX E CDKN1A/B NAS CTM IRRADIADAS POR RT-PCR.....	41
3.6.1. <i>Extração de RNA</i>	41
3.6.2. <i>Síntese de DNA complementar (cDNA)</i>	41
3.6.3. <i>PCR em tempo real</i>	42
3.7. EXPRESSÃO DE γ -H2AX NAS CTM IRRADIADAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	44
3.8. SEPARAÇÃO DO MEIO	44
3.9. CITOCINAS E NO PRODUZIDAS PELAS CTM IRRADIADAS POR ELISA	45
3.10. SISTEMA DE CULTURA CONDICIONADA	45
3.11. AVALIAÇÃO DO EFEITO ESPECTADOR PROVOCADO PELAS CTM IRRADIADAS SOBRE A CAPACIDADE CLONOGÊNICA DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS EM CULTURA 3D	47
3.12. EFEITO ESPECTADOR EM RELAÇÃO A PROLIFERAÇÃO DAS <i>C1498</i> AVALIADO POR METODOLOGIA DE MTT EM METILCELULOSE	48
3.13. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE MIELOPEROXIDASE PELAS CÉLULAS <i>C1498</i> EM CULTURA 3D FRENTE AO EFEITO ESPECTADOR.....	48
3.14. EFEITOS DAS CTM IRRADIADAS SOBRE O CICLO CELULAR E VIABILIDADE DAS <i>C1498</i>	49

3.14.1.	CICLO CELULAR.....	49
3.14.2.	VIABILIDADE	49
3.15.	AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CTM IRRADIADAS SOBRE A REGULAÇÃO GÊNICA DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS POR RT-PCR 50	
3.15.1.	<i>PCR em tempo real</i>	51
3.16.	AVALIAÇÃO DO EFEITO ESPECTADOR PROVOCADO PELAS CTM IRRADIADAS SOBRE A EXPRESSÃO DE MARCADORES DE LINHAGEM DE CÉLULAS C1498	51
3.17.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
4.	RESULTADOS ALCANÇADOS.....	53
4.1	A IRRADIAÇÃO MODULA NEGATIVAMENTE A VIABILIDADE DE CTM.....	53
4.2	CICLO CELULAR E SENESCÊNCIA DAS CTM SOFREM ALTERAÇÃO COM A IRRADIAÇÃO	54
4.3	A RADIAÇÃO PROMOVE ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE BAX E CDKN1A DE CTM.....	55
4.4	EXPRESSÃO DE γ -H2AX NAS CTM AUMENTA DIRETAMENTE COM O AUMENTO DA DOSE DE RADIAÇÃO	56
4.5	A PRODUÇÃO DE IL-6 PELAS CTM É DIMINUÍDA COM A IRRADIAÇÃO	57
4.6	CTM IRRADIADAS MODULAM NEGATIVAMENTE A CAPACIDADE CLONOGÊNICA DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS	58
4.7	PROLIFERAÇÃO E METABOLISMO DAS CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS EM CULTURA 3D TENDEM A DIMINUIR SOB O EFEITO ESPECTADOR.....	60
4.8	EFEITO DAS CTM IRRADIADAS MODULA A PRODUÇÃO DE MPO PELAS C1498 EM CULTURA 3D	61
4.9	EFEITO ESPECTADOR NÃO ALTERA SIGNIFICATIVAMENTE O CICLO CELULAR E VIABILIDADE DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS EM AMBIENTE NÃO ESTIMULADO COM G-CSF.....	63
4.10	EFEITO ESPECTADOR NÃO PROMOVE MODULAÇÃO SIGNIFICATIVA NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS EM CULTURA NÃO ESTIMULADA COM G-CSF	64
4.11	EFEITO ESPECTADOR NÃO MODULA A DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS EM AMBIENTE NÃO ESTIMULADO COM G-CSF	66
4.12	CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS TEM SEU CICLO CELULAR MODULADO NEGATIVAMENTE PELO EFEITO ESPECTADOR EM AMBIENTE ESTIMULADO COM G-CSF	67
4.13	EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS FRENTE AO EFEITO ESPECTADOR SOFRE MODULAÇÃO DE CCND-1 E GATA-3 EM AMBIENTE ESTIMULADO COM G-CSF	69
4.14	CTM IRRADIADAS MODULAM NEGATIVAMENTE A DIFERENCIAÇÃO LINFOIDE DAS C1498 ATRAVÉS DO EFEITO ESPECTADOR, EM CULTURAS COM G-CSF	71
4.	DISCUSSÃO	73
5.	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO A – LISTA DOS ANTICORPOS UTILIZADOS PARA DIFERENCIAÇÃO DAS C1498 POR IMUNOFENOTIPAGEM	98

1. Introdução

1.1. Radiação e Radioterapia

De acordo com a Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN), a radiação é descrita como um processo físico de emissão de energia e propagação desta. Estes processos podem ser dados por ação de ondas eletromagnéticas e/ou de partículas que carregam energia cinética. A radiação interage com a matéria e promove excitação dos elétrons na camada de valência dos átomos, tendo como efeito arrancar este elétron de sua camada, ponto este que diferencia a radiação ionizante da não ionizante, visto que a não ionizante não tem essa capacidade. Tendo isso, a radiação ionizante tem como característica possuir uma energia maior do que a de ligação do elétron com sua camada a ponto de arrancá-lo (CNEN, Apostila Educativa: Radiações Ionizantes e a Vida, 2022). Algumas unidades de grandeza foram adotadas para quantificar e classificar a radiação emitida por um radioisótopo. A unidade de *Sierv* (Sv) corresponde as doses coletiva, efetiva e equivalente da radiação ionizante. E a unidade de medida *Gray* (Gy) foi estabelecida para as doses absorvidas da radiação, em que se refere a energia média depositada pela radiação em um volume de matéria (Resolução CNEN 114/2011; Publicação D.O.U. em 01.09.2011)

Entendendo a funcionalidade e medida da radiação, é preciso compreender os efeitos que esta, principalmente a ionizante, a qual é objeto de estudo neste trabalho, promove nas células que são atingidas (células-alvo). Portanto, a interação da radiação ionizante com a célula-alvo acontece de duas formas: efeito direto e indireto. O efeito direto ocorre após a ejeção de elétrons e interação destes elétrons com os componentes celulares como o DNA e proteínas, promovendo alterações, as quais podem ser estruturais em que há ruptura das ligações químicas induzindo quebras de dupla fita no DNA (DSBs). Este efeito corresponde a cerca de 30% do efeito biológico total da radiação. Os outros 70% são os efeitos indiretos, em que a radiação interage com a água promovendo a formação de radicais livres, principalmente o OH⁻ (hidroxila). O oxigênio presente nessa molécula necessita de estabilidade, com isso, confere oxidação de proteínas e lipídeos, bem como induz danos ao DNA como na promoção de sítios abásicos e quebras de fita simples (SSB), que podem suscitar em

DSB, para disponibilizar elétrons para seu equilíbrio eletrônico (MARTA, 2014; YAHYAPOUR *et al.*, 2018; NOGUEIRA-PEDRO *et al.*, 2022).

Baseado nos efeitos biológicos da radiação já descritos, a exposição celular à radiação ionizante promove danos ao DNA, por conseguinte, desencadeando parada do ciclo celular, que por sua vez podem suscitar em morte celular. Um marcador importante para detecção de dano celular é a fosforilação de histonas do DNA. A senescência celular é outro ponto induzido pela parada do ciclo, que pode ser uma barreira para evolução neoplásica (WU *et al.*, 2017; CARVALHO; VILLAR, 2018; NOGUEIRA-PEDRO, 2022).

Atualmente, a radiação ionizante é utilizada principalmente no tratamento de neoplasias conhecido como radioterapia. Esta tem como principal objetivo destruir as células neoplásicas e/ou impedir o crescimento tumoral, sendo de forma paliativa ou curativa, associada ou não à outras terapias, possibilitando que células saudáveis se recuperem após essa irradiação (MANCINI, 2023).

Historicamente, após a descoberta dos raio-X em 1895 por Wilhelm C. Röntgen, estudos sobre a radioterapia se iniciaram. Tempo depois, o médico e pesquisador Emil Herman Grubbé utilizou pela primeira vez da radiação ionizante, mais especificamente os raios-X, como forma de tratamento para uma neoplasia avançada de mama (GRUBBÉ, 1933). Dado este fato, sucederam-se pesquisas que foram essenciais para o que se conhece e se aplica sobre a radioterapia (SILVA, 2014).

Frente aos avanços da radioterapia se fizeram necessários estudos, em relação a prática clínica, que visassem aumentar o efeito antitumoral e diminuir os danos diretos às células adjacentes (CARVALHO; VILLAR, 2018). Baseado nisso, os esquemas de fracionamento desta terapia têm suas particularidades para cada paciente, posto que, por mais que uma parte dos pacientes seja tratado com o protocolo clássico/convencional de dose 1,8 a 2Gy/fração por 3 a 7 semanas, a escolha do protocolo deve seguir baseado na prática mais vantajosa para alcançar melhor controle neoplásico. Na atualidade, existem diversos protocolos de radioterapia, os quais podem ser da terapia convencional já descrita; de doses altas de radiação (3 a 20Gy/fração/dia) em um curto espaço de tempo; ou de pacientes que

recebam 0,5 a 2Gy/fração/dia por um período de 4 a 5 semanas; entre outras inúmeras estratégias (DELOCH *et al.*, 2016).

Dentre os diversos tipos de neoplasias, as leucemias (neoplasias hematológicas (NH) que afetam as células-tronco bem como células progenitoras da medula-óssea (MO)) (SANTOS *et al.*, 2019) também são tratadas com radiação ionizante. Nestes casos, a finalidade do tratamento pode ser de impedir que a leucemia invada o sistema nervoso central (SNC); tratar quando este fato já aconteceu, podendo ser apenas paliativa; promover o alívio da dor nos ossos; e, por fim, como estratégia de condicionamento para o transplante de medula óssea (TMO) (MANCINI, 2023). Para a realização da TMO, um protocolo de radioterapia indicado é a irradiação de corpo total (ICT), denominada também de tratamento sistêmico. Após muitos estudos, essa técnica foi associada à potentes quimioterápicos, com doses fracionadas de radiação. A ICT tem o objetivo de promover a imunossupressão no paciente e criar um espaço para desenvolvimento da nova MO a ser transplantada (GIORDANI *et al.*, 2004).

De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer), o TMO é indicado para tratar as neoplasias hematológicas bem como para doenças que comprometem a hematopoese, sendo de origem não maligna. Este tratamento se resume na substituição de uma MO doente por uma MO saudável.

No processo radioterapia que pode ser utilizado no tratamento de NH, o microambiente hematopoético é atingido e, uma célula que pode sofrer com a ação direta da radiação é a Célula-Tronco Mesenquimal (CTM), por estar presente na MO. Com isso, utilizando como base o contexto apresentado, há um grande desafio para a radiobiologia uma vez que se têm observado que as alterações genéticas e bioquímicas, promovidas pela radiação ionizante, não se aplicam restritamente às células diretamente irradiadas, mas também, às células adjacentes às células-alvo, as quais apresentam efeitos similares das células irradiadas, efeito esse chamado de “efeito do espectador” (BASKAR, 2010; PELLIZZON, 2020). Interpretando-se assim que as CTM diretamente irradiadas podem promover alterações em células adjacentes a ela, as quais podem desenvolver alterações nos seus mecanismos fisiológicos.

1.2. Efeito Espectador

Em outras palavras, o efeito espectador promovido pela radiação tem por definição ser a resposta de células que não foram diretamente expostas à radiação, entretanto que sofrem influência desta, por meio de fatores secretados pelas células diretamente atingidas (MOTHERSILL; SEYMOUR; SEYMOUR, 2004; NAJAFI *et al.*, 2014; YAHYAPOUR *et al.*, 2018). O efeito espectador pode ser resultado de uma resposta ao estresse nos tecidos e/ou células. Ou seja, essa resposta produzida por células não atravessadas pela radiação tem a possibilidade de ser um processo adaptativo, uma vez que estas células sofrem com o efeito indireto da radiação e precisam iniciar mecanismos de controle (HALL, 2003; MOTHERSILL; SEYMOUR, 2006).

Alguns estudos investigam que a radiação local no processo de radioterapia pode promover danos de maneira sistêmica, e até mesmo desencadear a carcinogênese fora da área tratada (NAJAFI *et al.*, 2014; YAHYAPOUR *et al.*, 2018).

Diversos trabalhos identificam duas como as principais vias pelas quais esses efeitos são transmitidos entre as células, que são via junções comunicantes (contato célula-célula) (CHIPMAN *et al.*, 2003; HARADA *et al.*, 2009; NELSON *et al.*, 2012) ou via de liberação de fatores solúveis (BALDUZZI *et al.*, 2010; HODNY *et al.*, 2010). Entretanto a importância do metabolismo oxidativo neste processo também tem sido relatada (SHEN *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013). E, a depender da via ativada, a resposta espectadora se faz de maneira diferente (HALL, 2003).

O ponto inicial para se estudar esse fenômeno se deu na pesquisa de Nagasawa e Little (1992), que estudavam sobre troca de cromátides irmãs em células de ovário de hamster irradiadas na fase G1 do ciclo, com radiação alfa através de uma fonte de plutônio-238. Nesta pesquisa, estes pesquisadores observaram que uma população maior de células apresentou danos biológicos quando comparada com a população irradiada. Mais especificamente, 30% das células apresentaram alteração na troca de cromátides irmãs, ao passo que menos de 1% de todas as células teriam sido irradiadas (HALL, 2003; NAJAFI *et al.*, 2014).

Dado isso, sucederam-se pesquisas em relação ao tema como forma de avaliar outros danos provocados, indiretamente, pela radiação ionizante. E, como estudado nesse trabalho, mais especificamente em relação a radiação utilizada na radioterapia.

Frente ao exposto, para melhor compreensão do efeito espectador promovido pela radiação no presente trabalho, é necessário compreender sobre células-tronco e o papel destas no processo de hematopoese tendo em vista a utilização da radiação como esquema de condicionamento de TMO, e a necessidade do reestabelecimento da medula-óssea após o tratamento. Com isso, como exemplo de célula diretamente atravessada pela radiação, teremos a Célula-tronco Mesenquimal, e como exemplo de células espectadoras, é de grande interesse para o presente trabalho citar as células-tronco hematopoéticas (CTH) saudáveis na reconstrução da hematopoese, após um processo radioterápico.

1.3. Células-tronco

A célula-tronco (CT) é caracterizada como uma célula não especializada que possui capacidade de autorrenovação e diferenciação, o que possibilita a formação de vários tipos teciduais a partir de estímulos externos (PEREIRA, 2008; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ; VERGARA-YANEZ; HERRERA-ALMANZA, 2021).

Esta célula é encontrada tanto no embrião quanto no indivíduo adulto, a qual pode ser dividida de acordo com sua capacidade de diferenciação e tecido de origem. Para tal, de acordo com a diferenciação, as células-tronco totipotentes são aquelas capazes de originar um organismo completo. O exemplo desta célula é o zigoto que tem capacidade de originar tanto tecido embrionário quanto células do folheto extraembrionário. A célula-tronco pluripotente, diferentemente da anterior, não origina um organismo completo pelo fato de não gerar os tecidos extraembrionários, como a placenta. Este tipo de célula-tronco é derivado do blastocisto, com isso, recebe o nome de Célula-Tronco Embrionária, podendo dar origem as estruturas dos três folhetos embrionários. Já, as células-tronco multipotentes, em um estado comparativo com a totipotente e a pluripotente, são mais diferenciadas e estão presentes no indivíduo adulto. Deste modo, estas células multipotentes apresentam a capacidade de se diferenciar em um menor número de tipos teciduais, sendo esta diferenciação

dependente do órgão em que se encontram (SOUZA *et al.*, 2003; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ; VERGARA-YANEZ; HERRERA-ALMANZA, 2021).

Já, de acordo com o tecido de origem, as CT são classificadas em dois grupos, as células-tronco embrionárias (CTE) originadas do blastocisto e células-tronco adultas (CTA), encontradas no organismo adulto. As CTM e as CTH são CTA e possuem grande capacidade de auto renovação e diferenciação (BERTANHA, 2016; SANTOS *et al.*, 2017; SOARES; ARGOLO NETO; CARVALHO, 2020).

1.4. Células-tronco mesenquimais

Também conhecidas como células estromais mesenquimais multipotentes, são um grupo de células clonogênicas presentes ao longo da MO que originam o estroma de suporte para a hematopoese (KASSEM e ABDALLAH, 2008; HOCKING e GIBRAN, 2010).

Somente na década de 70 foram encontrados dados concretos da existência de células não-hematopoéticas na MO (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1976), conhecidas hoje como as CTM. Estudos posteriores revelaram que estas células exibiam capacidade de se diferenciar em tipos celulares mesodérmicos, como osteoblastos, condrócitos e adipócitos (MONTEIRO; ARGOLO NETO; CARLO, 2010; SANTOS *et al.*, 2017; MARTÍNEZ-SÁNCHEZ; VERGARA-YANEZ; HERRERA-ALMANZA, 2021).

Contudo, até os dias atuais, a CTM não apresenta homogeneidade, ou seja, não há descrição de algum fenótipo específico para esta célula. Como alternativa para identificação, as CTM são definidas por um conjunto de características expressas *in vitro* (LIU; ZHUGE; VELAZQUEZ, 2009). Com isso, de acordo com a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT – *International Society for Cellular Therapy*) para se comprovar que uma célula-tronco é uma CTM se faz necessária a confirmação de, ao menos, 3 características: I) capacidade de adesão da célula ao plástico do frasco do meio de cultura apresentando alta proliferação, com morfologia semelhante aos fibroblastos; II) capacidade de diferenciação em tecido adiposo, ósseo e cartilaginoso quando exposta a estímulos específicos; III) apresentar ao menos 3 marcadores positivos, como exemplo CD73, CD90e CD105, e, 3 marcadores hematopoéticos negativos (CD34, CD45 e CD14) (BERTANHA, 2016).

Na MO a CTM tem grande papel na manutenção do microambiente hematopoético. Esta função se deve ao fato desta célula dar origem ao estroma da MO. O componente estromal da MO tem função estrutural, com atuação na construção e manutenção do microambiente medular. As CTM interagem com as células hematopoéticas e possuem capacidade imunomoduladora e modulam a angiogênese. Estas funções são estabelecidas pela produção de citocinas, quimiocinas, expressão de moléculas de adesão, de proteínas de matriz extracelular, entre outros. (MONTEIRO; ARGOLO NETO; CARLO, 2010; SANTOS *et al.*, 2017).

Dessa forma, as CTM são capazes de influenciar a função de outras células através de interação direta célula-célula e através da liberação de um amplo espectro de fatores solúveis, como citocinas e fatores de crescimento (OLIVEIRA, 2010). Dentre os fatores secretados estão a Interleucina 6 (IL-6), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônias de monócitos (M-CSF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (MEIRELLES; CAPLAN; NARDI, 2008).

1.5. Microambiente Hematopoético

Em 1978, Schofield relatou que o microambiente atua como regulador das CTH, modulando seus processos de diferenciação, proliferação e auto-renovação (SCHOFIELD, 1978), por conta da presença de CTM. O microambiente medular é composto basicamente pelo sistema celular hematopoético e estromal (DEANS e MOSELEY, 2000). O estroma apresenta-se como uma estrutura compartimentalizada e dinâmica que, além de fornecer o parênquima de sustentação para as células hematopoéticas, permite um “ambiente bioquímico” fundamental para a proliferação, diferenciação e maturação das mesmas (MAYANI *et al.*, 1992). Entre esses aspectos, a CTM é um importante componente do microambiente hematopoético pelo fato de originar o estroma de suporte para a hematopoese e a produção de importantes fatores de crescimento que atuam diretamente sobre a hematopoese (KASSEM e ABDALLAH, 2008; HOCKING e GIBRAN, 2010), como já descrito.

O microambiente medular é altamente organizado e regula a localização e fisiologia das células-tronco bem como sua produção e taxa de liberação celular da MO para o sangue periférico (MAYANI *et al.*, 1992; VITURI *et al.*, 2000). Dessa

maneira, a existência de fatores regulatórios pode formar microambientes indutivos (TRENTIN, 1978; TESTA e DEXTER, 1990), que controlam a hematopoese pela produção e secreção local de citocinas pelas células do estroma, co-localização de citocinas para a CTH nos locais de contato célula – célula e/ou célula – MEC (matriz extra-celular) ou ainda, por estímulo direto pelo contato celular (RIOS e WILLIAMS, 1990; METCALF, 1994).

Dessa forma, a regulação da CTH é dada como um processo multifatorial, envolvendo também aspectos físicos, químicos e mecânicos (como temperatura, tensão de O₂, presença de íons), sendo o controle da diferenciação, maturação e proliferação desta célula um processo feito através de interações com o microambiente (ANJOS; ALVARES-SILVA; BORELLI, 2000; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

Ou seja, o equilíbrio entre autorrenovação e diferenciação das CTH é controlado pelos fatores intrínsecos e extrínsecos, os quais são modulados pelo microambiente em que esta célula se encontra (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014) Em outras palavras, o processo de hematopoese e manutenção de CTH são coordenados fisiologicamente por diversos fatores.

1.6. Célula-tronco Hematopoética

As CTH têm por característica serem as mais imaturas dentre todas na hierarquia das células sanguíneas. São células-tronco adultas que contêm capacidade de autorrenovação e de originar todas as linhagens hematopoéticas, tais como a mieloide (que inclui eritroide) e linfoide. Ademais, têm habilidade de reconstruir a hematopoese, a longo prazo e de forma completa, de um indivíduo após submissão às terapias supressoras (radioterapia e quimioterapia). Em sua maioria, as CTH se encontram em estado quiescente dentro de seus nichos e respondem aos estímulos intrínsecos e extrínsecos (CHOTINANTAKUL; LEEANANSAKSIRI, 2012; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

Quando classificadas, as CTH são divididas em 2 subpopulações (com característica multipotente): LT-HSC (*Long Term Hematopoetic Stem Cell*) e ST-HSC (*Short Term Hemtaopoetic Stem Cell*). A LT-HSC, também denominada “vida-longa”

(*long term*) é responsável por manter o *pool* hematopoético imaturo e não diferenciado. Esta célula se encontra na fase G0 do ciclo celular. Este subconjunto se autorrenova durante toda vida do indivíduo. A ST-HSC, mesmo se apresentando também em estado quiescente, apresenta maior capacidade proliferativa para originar os precursores das diferentes linhagens sanguíneas, sendo originada da divisão celular assimétrica da LT-HSC. Esta divisão resulta em outra LT-HSC, bem como uma ST-HSC. Tendo isso, a linhagem de células é determinada: LT-HSC → ST-HSC → Progenitores multipotentes (MPPs – *27ultipotente progenitors*), em que cada estágio de maturação promove mudanças irreversíveis (WEISSMAN, 2000; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

Os MPPs, através de estímulos recebidos, entram em processo de maturação, até a formação das células maduras do sangue periférico; com isso, pode-se concluir que todos os elementos figurados do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) têm a mesma origem: formados a partir da CTH que se encontra na MO, por um processo denominado hematopoese.

1.7. Hematopoese

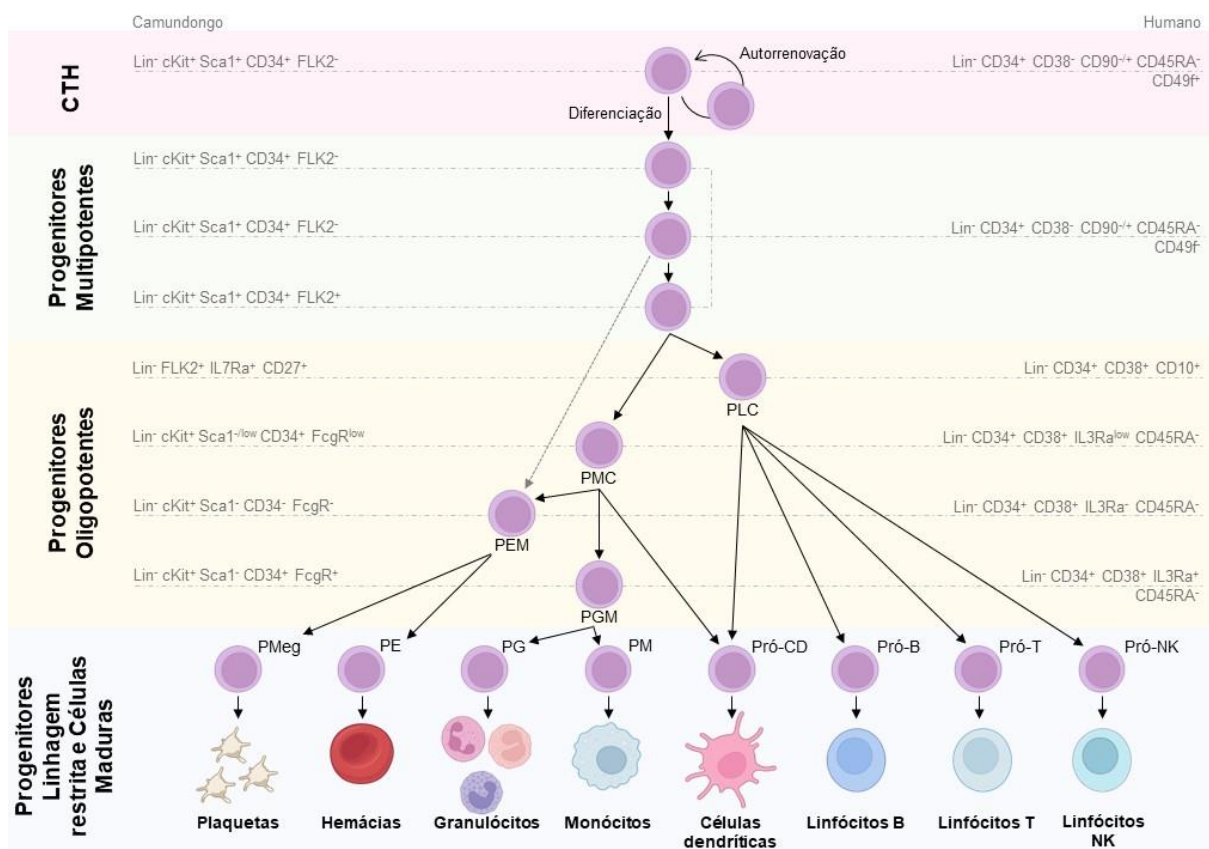
A hematopoese é caracterizada como um conjunto de eventos envolvidos em funções fisiológicas, sendo estas a automanutenção do *pool* indiferenciado de CTH, a formação e manutenção do *pool* das células precursoras e a proliferação e diferenciação destas células precursoras em diferenciadas (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014).

No processo de hematopoese tem-se etapas estabelecidas, as quais são de extrema importância para o entendimento da produção sanguínea, sendo elas: estímulo, proliferação, diferenciação e maturação.

Em camundongos, as CTH ($\text{Lin}^- \text{Flk2}^- \text{Thy1.1}^{\text{low}} \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$), de origem mesodérmica, originam uma população heterogênea de progenitores hematopoéticos multipotentes (MPP, $\text{Lin}^- \text{Flk2}^- \text{Thy1.1}^{\text{low}} \text{Sca-1}^+ \text{c-Kit}^+$), com pequena ou nenhuma capacidade de autorrenovação. Os MPPs, por sua vez, podem se diferenciar para a linhagem linfóide, originando o progenitor linfóide comum (CLP, $\text{Lin}^- \text{Il7r}^{\text{low}} \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^+$), do qual resultam linfócitos T e B e células *natural killers*, e progenitor mielóide comum (CMP, $\text{Lin}^- \text{Il7r}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca-1}^- \text{CD34}^+ \text{CD16/32}^{\text{low}}$), que origina os progenitores

grânulo-monocíticos (GMP, $\text{Lin}^{-}\text{IL7r}^{-}\text{c-Kit}^{+}\text{Sca-1}^{-}\text{CD34}^{+}\text{CD16/32}^{\text{high}}$) e megacariocítico-eritroides (MEP, $\text{Lin}^{-}\text{IL7r}^{-}\text{c-Kit}^{+}\text{Sca-1}^{-}\text{CD34}^{-}\text{CD16/32}^{\text{low}}$) (Figura 1) (KONDO *et al.*, 1997; AKASHI *et al.*, 1999; WEISSMAN, 2000; BRYDER *et al.*, 2006; WEISSMAN e SHIZURU, 2008). Estudos indicam que o comprometimento das células-tronco pluripotentes para determinada linhagem hematopoética ocorra nos estágios iniciais da divisão celular e de forma simétrica ou assimétrica, ou seja, podendo resultar em duas filhas com graus de comprometimento diferentes (SUDA *et al.*, 1984; QUESENBERRY *et al.*, 2005).

Figura 1 – Modelo hierárquico da hematopoese e caracterização fenotípica das CTH e progenitores hematopoéticos



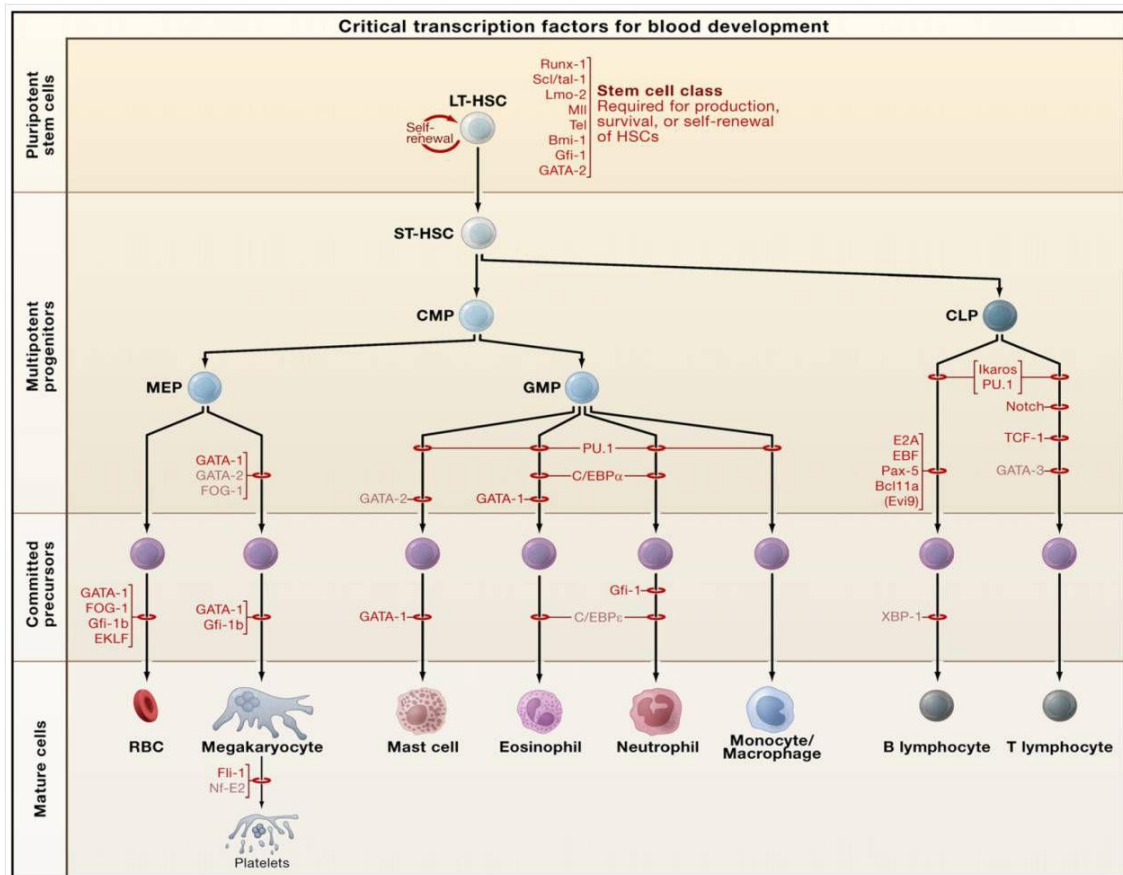
Fonte: Adaptado de Chotinantakul; Leraanaksiri, (2012), utilizando ferramentas do Biorender.

Para que este processo hematopético ocorra, se faz necessária a compreensão do motivo pela qual a CTH sai do seu estado quiescente e começa a se proliferar e diferenciar. Os mediadores químicos, como as citocinas e os fatores de crescimento, controlam a proliferação ordenada e controlada das CTH. Esse processo mantém a taxa de células sanguíneas necessária para a homeostase (ORKIN; ZON, 2008).

Para sair do estado quiescente para o de divisão celular há a ocorrência de diversas vias bioquímicas associadas a transduções de sinais promovidas pelos estímulos acima citados. Neste mecanismo, há a ativação de vários genes relacionados ao crescimento e divisão celular, como mostra na figura 2 (ORKIN; ZON, 2008). Diversos genes são associados a manutenção de pluripotência, proliferação e destino celular. Dentre eles, pode-se citar Pou5f1 (também conhecido como Oct4), Sox2 e Nanog. Todos codificam para fatores de transcrição que ligam elementos promotores de genes-alvos. Muitos genes ativados ou inibidos são compartilhados para os 3 genes citados. Contudo, de forma geral, quando ligados, estes fatores de transcrição promovem a expressão gênica de um subconjunto de genes-alvo relacionados às células-tronco pluripotentes, e, de forma contrária, promovem a repressão de outro subconjunto de genes-alvo (MAY; WANG, 2023).

Outros fatores de transcrição estão associados ao processo de diferenciação celular. O gene Spi1 codifica o fator de transcrição denominado PU.1, envolvido na diferenciação inicial das células do sistema imunológico, entre outras funções (TUERXUN *et al.*, 2022). O fator de transcrição Gata-1, por ser altamente expresso nas células eritroides e megacariócitos, está associado a diferenciação da linhagem destas células (BASTIDA *et al.*, 2022). Gata-3 é outro membro da família dos genes GATA de fatores de transcrição, este, tem função no desenvolvimento de vários tipos celulares, particularmente no sistema hematopoético, nas células T (AKGUL *et al.*, 2022).

Figura 2 – Caracterização dos principais fatores regulatórios do processo de diferenciação da célula tronco hematopoética e progenitores hematopoéticos

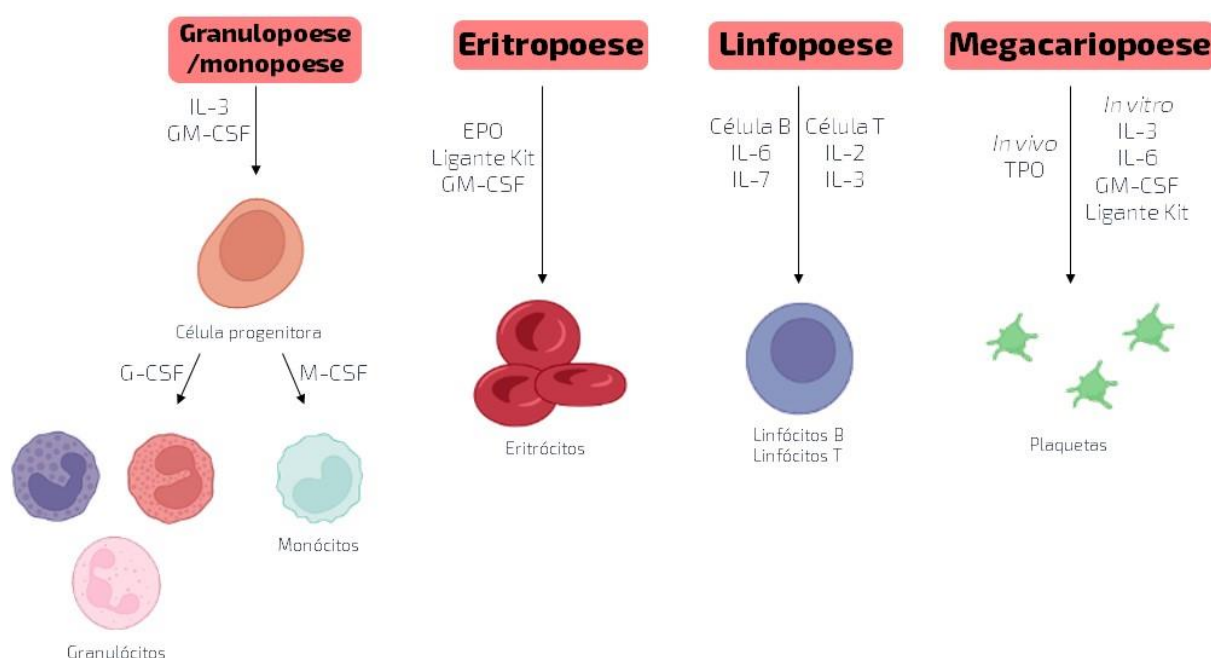


Fonte: Orkin e Zon (2008)

O processo da hematopoese é dividido em granulopoese/monopoese, linfopoese, eritropoese e megacariopoese. Os estímulos que regulam a granulopoese/monopoese variam dependendo da célula que se quer produzir. A citocina IL-3 e o GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* - fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos) têm função de atuar na proliferação de um amplo espectro dos precursores imaturos, em contrapartida, o G-CSF e M-CSF são associados à um desenvolvimento mais específico da linhagem granulocítica e monocítica, respectivamente. Em relação a regulação da eritropoese, o hormônio eritropoetina (EPO) tem papel fundamental neste processo. A produção de EPO é regulada pela tensão de oxigênio captada pelas células peritubulares no córtex renal. Em conjunto à EPO, o ligante Kit, IL-3 e o GM-CSF também auxiliam na regulação da produção de hemácias. A linfopoese é controlada principalmente por interleucinas. Quando a células e interesse é o linfócito, a citocina de forma geral que promove a diferenciação neste tipo celular é a IL-6, considerada pleotrópica, pois

também está envolvida com proliferação. Em sua subdiferenciação, quando são formados os linfócitos B, as citocinas em ação são a IL-7 e IL-6. Já, quando as citocinas expressas forem IL-2 e IL-3, a diferenciação produz linfócitos T. Em relação a proliferação de plaquetas, *in vitro*, observa-se o processo regulado por IL-3, IL-6, GM-CSF e ligante Kit. E *in vivo*, a megacariopoese é regulada pelo feedback negativo exercido pela quantidade de plaquetas circulantes no sangue periférico, sendo o principal estimulador a Trombopoetina (TPO) que é produzida principalmente no fígado e se liga aos receptores da família Mpl (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014) (figura 3).

Figura 3 - Esquema simplista de estímulos para as diferentes poeses.



Fonte: Adaptado de Zago; Falcão; Pasquini, 2014. Utilizando ferramentas do Biorender.

Para que todo este processo de diferenciação e proliferação celular ocorra, é preciso que haja o controle preciso do ciclo celular. De maneira orquestrada, o ciclo celular consiste na duplicação de uma célula em duas células filhas com o mesmo material genético. Com esta finalidade, as etapas do ciclo bem como seus controles devem ser muito bem definidos. O ciclo se divide em duas fases principais: I) Intérfase e II) Mitose. A fase de intérfase se divide em 3 etapas: I) Fase G1; II) Fase S; III) Fase G2. Esta fase pode ser compreendida como a preparação da célula para o processo de divisão propriamente dito. Enquanto a fase de Mitose é a divisão da célula em duas células filhas (PRADO, 2022). Contudo, há outra fase do ciclo conhecida como G0 em

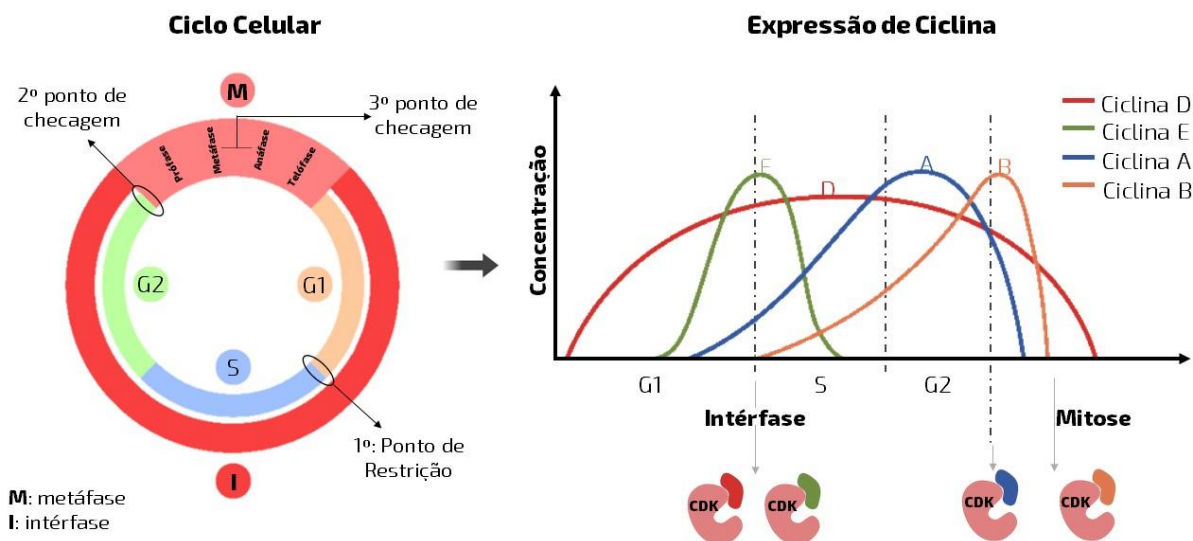
que as células entram em estado de inativação se as condições não favorecerem a duplicação celular, podendo ficar nesta etapa por longos períodos até que seja possível retomar às divisões (SCHNEIDER, 2007; RODRÍGUEZ-GÓMEZ; FRIAS-VÁZQUEZ, 2014).

Para que haja a promoção de todas as etapas e seja completo o ciclo celular, *checkpoints* foram estabelecidos pela célula com a finalidade de regular este ciclo. São 3 pontos de checagem principais ao longo de todo o ciclo: I) Transição G1/S, também chamado de ponto de restrição, em que são avaliados a quantidade de nutrientes, tamanho celular, presença dos nucleotídeos e é um processo dependente de mitógenos. Dado esse ponto, a célula tem o comando de dividir ou não; II) Transição G2/M é o ponto em que é verificado se o DNA foi duplicado correta e completamente. Ao finalizar essa checagem, a célula está apta a prosseguir para a fase de mitose; III) Transição Metáfase/Anáfase é o *checkpoint* de verificação do alinhamento dos cromossomos na placa metafásica, bem como se estão associados ao fuso mitótico. Avaliado este processo, a célula tem condições para terminar o processo de mitose (MATELLÁN; MONJE-CASAS, 2020), como representado na figura 4.

Este processo de regulação é dado por um complexo mecanismo molecular presente em cada *checkpoint*. As cinases dependentes de ciclina (CDKs) e suas subunidades específicas regulatórias, denominadas ciclinas, são as moléculas-chave de todo esse processo. As CDKs são enzimas que promovem a fosforilação de moléculas intracelulares com o objetivo de prosseguir com o ciclo celular. Contudo, elas se encontram inativadas no citoplasma, uma vez que seus níveis permanecem constantes ao longo do ciclo. Para ativá-las tem-se a produção, durante o período de ciclagem, das ciclinas, que regulam a atividade das CDKs. Ou seja, as ciclinas sofrem produção e degradação durante o ciclo. Para cada ponto de checagem há ciclinas específicas, que, como já mencionado, sofrem síntese e degradação ao longo de cada um destes. No primeiro *checkpoint*, algumas ciclinas podem ser exemplificadas, tais como: Ciclina E1 (codificada pelo gene *Ccne1*) (Zheng *et al.*, 2023) e Ciclina D1 e D2 (codificadas pelos genes *Ccnd1* e *Ccnd2*, respectivamente) (Qian *et al.*, 2021; Su *et al.*, 2023). Para o segundo ponto de checagem, um exemplo a ser mencionado é a Ciclina A. Da mesma maneira que o 3º ponto de verificação tem sua ciclina específica,

como a Ciclina B (SCHNEIDER, 2007; BENADIBA, 2008; MATELLÁN; MONJE-CASAS, 2020), como apresentado na figura 4

Figura 4 - Figura esquematizada do ciclo celular com suas duas fases (Intérfase e Mitose), bem como a determinação dos seus checkpoints; Síntese e degradação das ciclinas observadas pela concentração destas nos diferentes momentos do ciclo celular. Ademais, cada ciclina associada a uma CDK em seus respectivos checkpoints



Fonte: Adaptado de Schneider (2007); Matellán; Monje-Casas (2020); Rodríguez-Gómez e Frias-Vázquez (2014).

Outros mecanismos de controle do ciclo celular se dão por proteínas que inibem o complexo CDKs + ciclina. A proteína p21, da mesma maneira que a p27, regulam negativamente este complexo inibindo a ativação das CDKs pelas suas respectivas ciclinas. Todo este processo regula a progressão do ciclo celular em G1 e S, de forma a promover a parada da progressão do ciclo celular. Os genes que codificam para p21 e p27 (Cdkn1a e Cdkn1b, respectivamente) expressam sítios de ligação para p53, sendo esta, um regulador de transcrição destas proteínas. No momento em que a célula sofre um dano ao DNA, a proteína p53 é ativada e induz a expressão de p21 e p27 que inibem a ativação de CDKs (LIMA, 2013).

Em função de tudo já citado, compreendendo de maneira clara a importância das CTM na regulação da hematopoese, bem como os pontos importantes deste processo, como a diferenciação e o ciclo celular, é preciso lembrar que algumas doenças malignas acometem o sistema hematopoético. E para o tratamento destas, pode-se usar da radiação ionizante. Adicionalmente, é de suma importância lembrar o conceito de que as CTH têm habilidade de reconstruir a hematopoese de um indivíduo após submissão às terapias supressoras (radioterapia e quimioterapia).

2. Hipótese e Objetivos

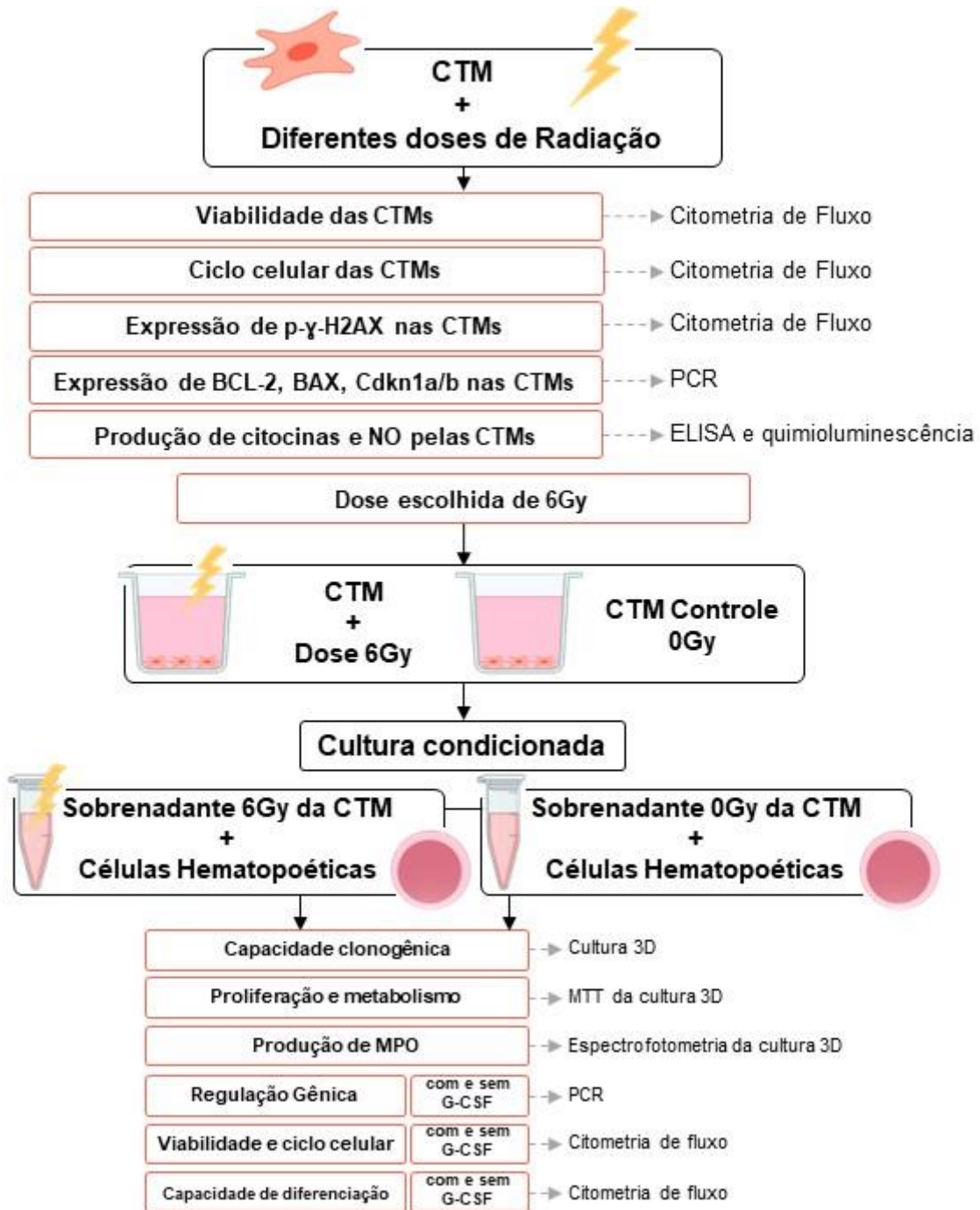
Algumas doenças hematológicas malignas que comumente afetam a MO utilizam a radioterapia como ferramenta terapêutica. Neste tratamento, a radiação ionizante atinge a MO com o objetivo de destruir as células malignas. Contudo, células do microambiente hematopoético também podem ser diretamente afetadas. Dessa forma, CTM saudáveis que participam da formação do microambiente hematopoético, formando ambientes adequados para a hematopoese, podem ser atingidas pela radiação ionizante, sofrer alterações, e comprometer os mecanismos fisiológicos de controle das células hematopoéticas. Esta afirmativa se torna importante em razão do que já se sabe sobre o efeito espectador: que as respostas biológicas podem ocorrer em células não diretamente irradiadas, mas que são influenciadas, de alguma forma, por sinais transmitidos por células irradiadas vizinhas. Assim sendo, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a influência da radiação nas CTM, bem como o efeito espectador na modulação da hematopoese, ou seja, avaliar a influência indireta que CTM irradiadas têm sobre a hematopoese, através da via de liberação de fatores solúveis.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito radiobiológico da radiação ionizante sobre as CTM;
- Analisar a viabilidade celular em CTM irradiadas;
- Analisar a senescência e ciclo celular das CTM irradiadas, bem como a expressão gênica de fatores associados ao controle do ciclo;
- Analisar o dano celular causado pela radiação através da quantificação da expressão de γ -H2AX em CTM irradiadas;
- Dosar fatores solúveis produzidos pelas CTM irradiadas;
- Avaliar o efeito espectador sobre capacidade clonogênicas de células hematopoéticas (C1498);
- Avaliar viabilidade, ciclo celular e proliferação celular de células hematopoéticas (C1498) frente ao efeito espectador;
- Avaliar o efeito espectador sobre a expressão de genes envolvidos no ciclo celular de células hematopoéticas (C1498);
- Avaliar o efeito espectador sobre aspectos imunofenotípicos das células hematopoéticas (C1498);

3. Material e Métodos

Figura 5 - Resumo gráfico da metodologia utilizada para o desenvolver do trabalho



Fonte: Autoria Própria, utilizando ferramentas do Biorender.

3.1. Células utilizadas neste estudo

Para o desenvolvimento do presente trabalho, dois tipos celulares foram utilizados. Neste tópico, estão descritas, de forma detalhada, cada uma destas células e suas principais características.

3.1.1. C₃H₁₀T_{1/2}

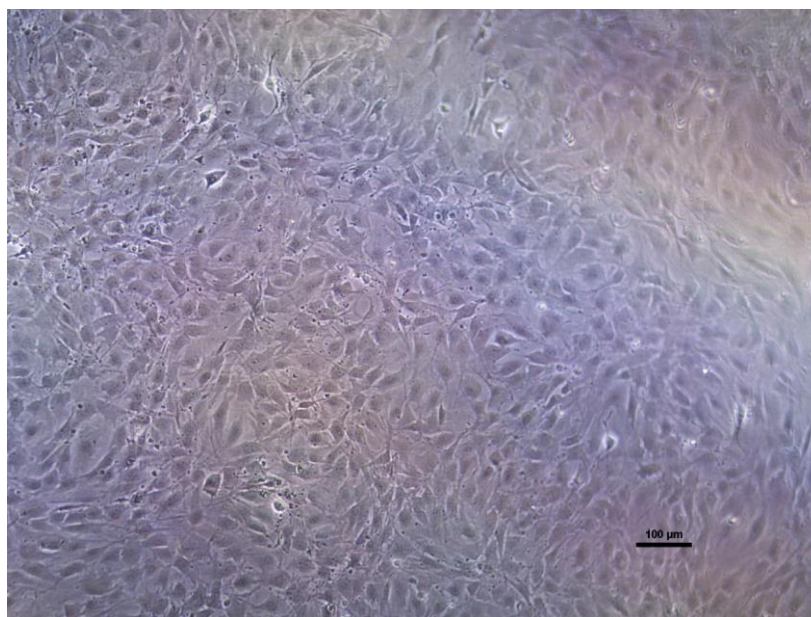
Linhagem celular obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC® CCL-226™), que apresenta morfologia fibroblastoide (figura 6), contudo, com funções de célula-tronco mesenquimal (CTM) (ATCC, Ficha de informação do produto; TANG; OTTO; LANE, 2004). Outras características estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Características da linhagem C₃H₁₀T_{1/2}

Categoria	Células Animais imortalizadas
Animal	Camundongo C3H (<i>Mus musculus</i>)
Doença	Sarcoma
Propriedade de crescimento	Aderente
Tecido	Embrionário

Fonte: Adaptado da Ficha Técnica do Produto ATCC.

Figura 6 - Fotomicrografia da cultura celular da linhagem C₃H₁₀T_{1/2}. Aumento de 200x



Fonte: Autoria própria (2022)

3.1.2. C1498

Linhagem celular obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC® TIB-49™). Estas células foram originadas a partir de mutações espontâneas. Em 1941 foram isoladas de camundongos fêmeas C57BL/6 (H-2) e começaram a ser utilizadas como modelo de leucemia aguda (MOPIN; DRISS; BRINSTER, 2016).

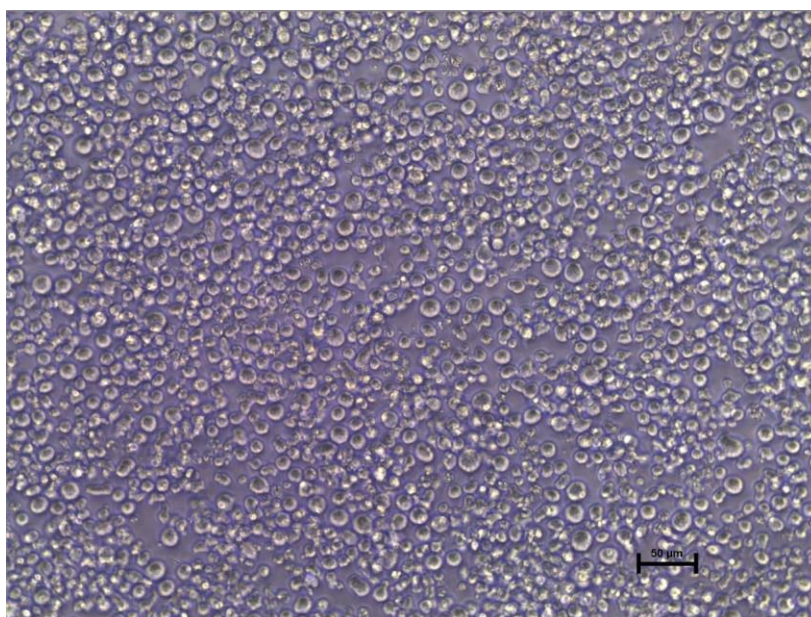
Atualmente, este modelo celular apresenta diversas características (tabela 2), dentre elas a morfologia semelhante ao linfoblasto (figuras 7 e 8), contudo, são células originadas de tecidos de leucemia mieloide aguda (LMA), podendo ser considerada uma célula mieloide (ATCC, Ficha de informação do produto; MOPIN; DRISS; BRINSTER, 2016). Entretanto, outros estudos demonstraram grande capacidade desta célula em apresentar um fenótipo de linfócito *natural killer* (NK), ou seja, com diferenciação linfóide (LABELLE; TRUITT, 2002).

Tabela 2 - Características da linhagem C1498

Categoria	Células animais imortalizadas
Animal	Camundongo C57BL/6J (<i>Mus musculus</i>)
Doença	Leucemia Mieloide aguda
Propriedade de crescimento	Suspensão

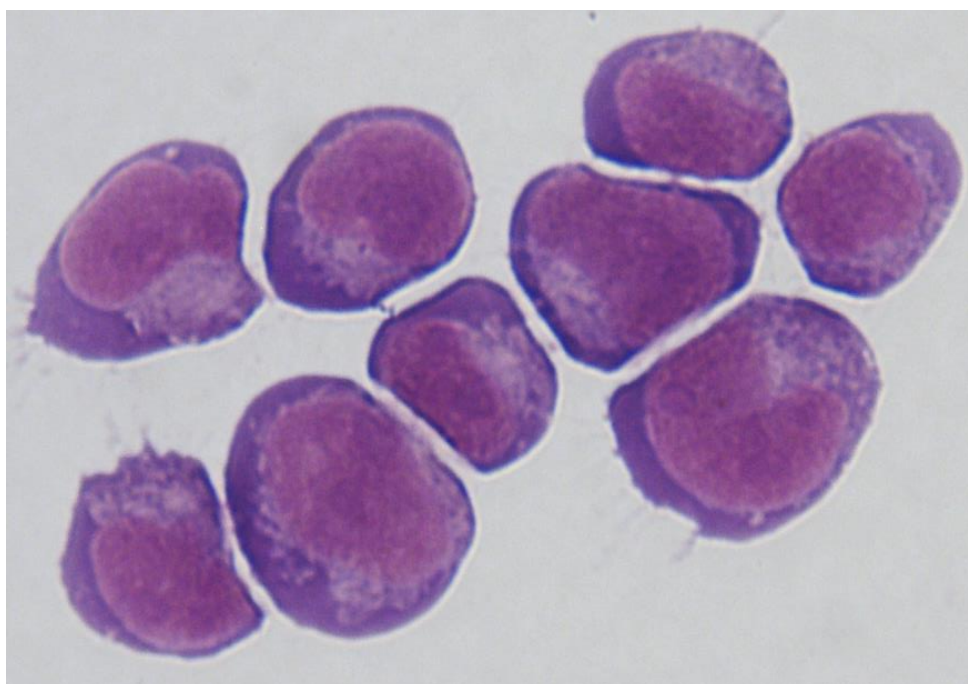
Fonte: Adaptado da Ficha Técnica do Produto ATCC

Figura 7 – Fotomicrografia da cultura celular da linhagem C1498. Aumento de 200x.



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 8 – Coloração de Roselfed do citocentrifugado da cultura de C1498 em meio DMEM. Aumento de 600x.



Fonte: Autoria própria (2022).

3.2. Cultivo das C₃H₁₀T_{1/2}

Para iniciar os experimentos, foram cultivadas CTM de linhagem C₃H₁₀T_{1/2}, descritas acima. Para esse cultivo, foi utilizado meio DMEM (Meio de Eagle modificado por Dulbecco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e tampão HEPES (2g/L) com pH final entre 7,2 e 7,4. Para garantir um cultivo estéril, foram adicionados ao meio penicilina 1% (100UI/mL) + estreptomicina (100mg/mL). Após a preparação da placa (12 poços), esta foi colocada em estufa de CO₂ 5% a 37°C. As células foram cultivadas até confluência de 80%.

3.3. Irradiação

As CTM plaqueadas foram irradiadas em aparelho de telecobaltoterapia ⁶⁰Co (modelo Alcian II da marca GGR-Varian, Palo Alto, CA, EUA) no Setor de Radioterapia Experimental da UNIFESP-EPM. As doses de radiação utilizadas foram de 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 e 20Gy (com taxa de dose de 55cGy/min), a fim de investigar qual a melhor dose para realização dos experimentos de avaliação do efeito espectador.

Visto isso, as CTM ($C_3H_{10}T_{1/2}$) foram irradiadas em campo de 10cm x 10cm a 80,5cm de distância. Uma placa de acrílico de 0,5cm de espessura foi utilizada como suporte para as placas de cultura e a irradiação foi realizada pela parte posterior (Gantry a 80cm e 180°) pelo fato de que as células ficam aderidas no fundo da placa. Posteriormente à irradiação, a cultura celular foi colocada novamente na estufa de CO_2 5% a 37°C, para realização dos experimentos futuros.

Como controle biológico dos experimentos, a fim de comparar a alteração que a irradiação promove, CTM ($C_3H_{10}T_{1/2}$) foram cultivadas de forma idêntica às já citadas, entretanto, não sofreram com a radiação. Estas células foram denominadas de CTM 0Gy.

3.4. Avaliação da viabilidade das CTM após irradiação por citometria de fluxo

Com a finalidade de analisar a viabilidade celular das CTM irradiadas, foi realizada uma análise através da marcação das células com Anexina-V e 7-AAD, por citometria de fluxo.

Os reagentes de Anexina-V e 7-AAD foram preparados conforme descrito na tabela 3:

Tabela 3 – Preparo de Anexina-V e 7-AAD referente a uma amostra.

Anexina-V	
Diluição	1:50
Tampão anexina	19,6 μ L
Anexina-V FITC	0,4 μ L
7-AAD	
Diluição	1:200
7-AAD	1 μ L
PBS (solução salina fosfato)	199 μ L

Para o teste, foi realizada tripsinização das CTM ($C_3H_{10}T_{1/2}$) irradiadas e não irradiadas, visto que estas células são aderentes ao plástico do material de cultura. As amostras foram lavadas com PBS (solução salina fosfato) e foram adicionados 20 μ L do reagente de anexina-V (que avalia a apoptose por se ligar na fosfatidilserina

externalizada durante o processo de morte celular). E as células ficaram incubadas por 20 minutos protegidas da luz.

Após este processo, foram adicionados 200µL do reagente de 7-AAD (que avalia morte por necrose por intercalar com as bases do DNA de células em processo de morte). Em seguida, foi realizada a leitura no citômetro FACS Canto II (FACScan®, BECTON DICKSON, San Jose, EUA).

Foram realizados controles sem marcação (com CTM cultivadas em meio DMEM); simples marcado para anexina-V e simples marcado 7-AAD. E as CTM 0Gy, como já descrito, foi utilizado como controle biológico do experimento.

3.5. Avaliação da senescência e ciclo celular das CTM irradiadas

Tendo em vista os resultados da metodologia anterior, foram escolhidas as doses de 4, 6 e 15Gy para continuar os experimentos. Sempre recordando que as CTM 0Gy são utilizadas como controle biológico.

Após irradiação, a célula pode sofrer com estresse e danos celulares, o que está sendo abordado neste estudo. E em decorrência desses processos uma resposta celular ativada é a senescência, ou seja, parada do ciclo celular de longo prazo. Para que fosse possível caracterizar a quantidade de células senescentes após a irradiação, foi utilizada a metodologia de identificação de β-galactosidase, enzima que tende a estar com maior atividade em células senescentes (HOOTEN; EVANS, 2017). Para tal, o *Senescence β-galactosidase kit (Cell Signaling Technology Inc, USA)*, foi utilizado seguindo todas as suas recomendações.

Com isso, para verificar se houve alteração no ciclo celular das CTM irradiadas, foi realizada a metodologia de citometria de fluxo. Para tal, o reagente de 7-AAD foi preparado conforme descrito na tabela 3. As CTM (C₃H₁₀T_{1/2}) foram tripsinizadas e lavadas com PBS. Após a lavagem, o *pellet* foi ressuspensão em 1mL de etanol 70% gelado e as amostras foram incubadas por 30 minutos. Foi realizada mais uma lavagem com PBS e o sobrenadante foi descartado. 10µL de RNase foram adicionados às amostras que foram incubadas por 10 minutos. Todo o material foi ressuspensão em 200 µL do reagente de 7-AAD e levado para a leitura no citômetro FACS Canto II (FACScan®, BECTON DICKSON, San Jose, EUA).

3.6. Expressão de Bcl-2, Bax e Cdkn1a/b nas CTM irradiadas por RT-PCR

Com o objetivo de avaliar mais informações relacionadas ao controle do ciclo celular das CTM irradiadas, foi realizada a avaliação da expressão de Bcl-2, Bax, Cdkn1a e Cdkn1b nestas células através da metodologia de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase - *polymerase chain reaction*) em tempo real.

Para esta finalidade, a partir de 24 horas do plaqueamento e irradiação, as células foram submetidas ao processo de extração de RNA.

3.6.1. Extração de RNA

Para o processo de extração de RNA, as células irradiadas e não irradiadas foram tripsinizadas e colocadas em microtubos tipo *ependorf* e centrifugadas por 10 minutos à 1000rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão com 1mL de PBS estéril. Foi realizada outra centrifugação para a lavagem.

O RNA das células foi extraído seguindo as recomendações do fabricante RNeasy® Mini Kit (50) (QIAGEN, *Germany*). Após a extração, o RNA foi imediatamente mensurado no equipamento *NanoVue Plus* (*GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido*). A identificação da absorvância dos ácidos ribonucleicos se dá sob luz UV com comprimento de onda de 260nm e a concentração de RNA total é dada em ng/μL. A pureza da extração foi avaliada pela razão A260nm/A280nm (valor da pureza deve se encontrar dentro do intervalo de 1,8-2,2, sendo 2,0 o valor alvo) (SAMBROOK, 2001).

Para posterior síntese de DNA complementar a partir do RNA extraído, o RNA foi armazenado a temperatura de -40°C, até a realização desta.

3.6.2. Síntese de DNA complementar (cDNA)

O processo de síntese do cDNA se deu a partir da utilização do *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Thermo Fisher Scientific*), que utiliza a enzima transcriptase reversa *MultiScribe™*. Este processo foi realizado a partir de 50ng/μL de RNA total (por amostra) em um volume de 30μL em água livre de DNase e RNase q.s.p. (quantidade suficiente para). A proporção dos reagentes utilizada para um total de 30μL/amostra está descrita na tabela 4, totalizando 60μL (amostra + reagentes).

Tabela 4 - Relação dos reagentes para síntese de cDNA, bem como suas respectivas quantidades referente a 1 amostra.

Mix de reagentes + amostra, para síntese de cDNA		
Reagente		Volume em μL
Água livre de DNase e RNase		9,6
10x RT Buffer		6
10x RT Randon primers		6
MultiScribe	Reverse	3
Transcriptase		
RNAse inhibitor		3
dNTP mix, 100mM		2,4
Amostra		30
Total		60

A reação foi feita seguindo as seguintes condições de ciclagem: incubação dos reagentes por 10 minutos a 25°C, aquecimento a 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos e resfriamento a 4°C. A eficácia do processo de transcrição foi considerada equivalente para todas as amostras.

O cDNA obtido foi armazenado a -40 °C até a realização da PCR em tempo real.

3.6.3. PCR em tempo real

A análise da expressão gênica foi feita pelo método de quantificação relativa, no qual foi utilizado um gene de referência como controle endógeno (Gapdh; Mm99999915_g1). Foi avaliada a expressão dos genes Bcl-2 (Mm00477631_m1), Bax (Mm00432051_m1), Cdkn1a (Mm00432448_m1) e Cdkn1b (Mm00438168_m1).

A determinação da expressão dos dados avaliados foi realizada por rt-PCR em tempo real utilizando o sistema *TaqMan*[®] (*Applied Biosystems, Carlsbad, EUA*) e os ensaios foram conduzidos no equipamento *A&B StepOne Plus Real-Time PCR System*[®] (*Applied Biosystems, Carlsbad, EUA*). Para a realização do rt-PCR foi utilizado um volume total de reação de 10 μ L (por amostra), volume este descrito na tabela 5:

Tabela 5 - Relação dos reagentes para realização do RT-PCR em tempo real, bem como suas respectivas quantidades.

Mix de reagentes + amostra, para RT-PCR	
Reagente	Volume em µL
TaqMan® Fast Universal Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA)	5
H ₂ O livre de DNase e RNase	3,5
Amostra	1
Iniciador (sense e antisense) – marcado com sonda FAM e referência passiva ROX	0,5
Total	10

O processo de ciclagem se deu nas seguintes condições: pré-incubação por 20 segundos a 95°C (para desnaturação das dupla-fitas de cDNA), seguido de 40 ciclos de 01 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C.

Os valores de Ct, que correspondem ao início de amplificação da reação de RT-PCR foram utilizados para a obtenção dos dados quantitativos da expressão gênica de cada amostra (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para tal, foi utilizada a fórmula de quantificação relativa:

$$\text{Taxa de expressão relativa} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct calibrador})} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

O ΔCt foi obtido pela subtração da média dos Cts do gene de interesse pela média dos Cts do controle endógeno, para normalização dos dados. Como calibrador, foi utilizada a média aritmética do ΔCt das CTM 0Gy (não irradiadas), empregada como base para resultados comparativos.

A normalização da expressão de cada gene se deu baseada na expressão do gene endógeno Gapdh (Mm99999915_g1) e os resultados foram expressos em valores relativos usando o limiar de ciclo (de acordo com o método $\Delta\Delta\text{Ct}$), como já descrito.

Como controle de qualidade, todas as reações foram realizadas em duplicata e para cada placa de reação foram utilizados controles negativos e realização do poço

“branco” para cada gene avaliado. Em que no “branco” não se tem a adição da amostra, e sim, de 1µL de água.

3.7. Expressão de γ -H2AX nas CTM irradiadas por citometria de fluxo

Com o objetivo de verificar dano ao DNA induzido pela radiação nas CTM, foi quantificada a expressão de γ -H2AX (serina 139 fosforilada). Esta, é uma histona fosforilada que representa uma resposta celular perante um dano ao DNA, ao passo que este resulte em quebra da dupla fita, sendo este um processo agudo da irradiação (RYBAK *et al.*, 2016).

Para esta análise, foi realizada tripsinização das CTM irradiadas e lavagem com PBS. Dado isso, para a marcação primária intracelular, as células foram fixadas com paraformaldeído (2%) durante 20 min, lavadas com glicina (0,1 M) e permeabilizadas com Triton X-100 (0,001%) durante 20 min, e o anticorpo anti- γ -H2AX conjugado com Alexa Fluor 647 (Anexo A) foi adicionado (diluído conforme instruções do fabricante), seguido do processo de incubação *overnight*. Em sequência, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em 200µL de PBS. A aquisição foi realizada por citometria de fluxo (FACS Canto II (FACSscan®, BECTON DICKSON, San Jose, EUA).

Toda a análise foi realizada após 3 horas da irradiação (por se tratar de um processo agudo da exposição à radiação), padronizado por curva dose resposta do trabalho de Nogueira-Pedro (2022) tanto nas células irradiadas com 4, 6 e 15Gy, quanto nas CTM 0Gy.

3.8. Separação do meio

Foi necessária a separação do meio das culturas de CTM irradiadas e não irradiadas visto que foi realizado experimento de dosagem de citocinas neste meio (vide tópico 3.9). Ademais, o efeito espectador neste estudo foi avaliado através do sistema de cultura condicionada de células hematopoéticas.

Para tal, foi utilizado o processo de filtração da cultura de CTM irradiadas em filtros de 0,22µm (MilliPore), para garantir que nenhuma célula estivesse presente no meio. Os sobrenadantes 4, 6 e 15Gy foram separados. Os sobrenadantes 0Gy também foi separado da mesma maneira, para se obter o grupo controle.

Os sobrenadantes foram congelados a -40°C para os posteriores experimentos.

3.9. Citocinas e NO produzidas pelas CTM irradiadas por ELISA

A fim de dosar os fatores solúveis (citocinas) e o óxido nítrico (NO) produzidas pelas CTM irradiadas, os quais possuem ação modulatória em relação a hematopoese, foram utilizados os sobrenadantes 4, 6 e 15Gy e 0Gy (como controle do experimento) para a dosagem das seguintes citocinas e fatores de crescimento: IL-6, TGF- β , HGF, G-CSF e M-CSF.

Toda a análise de citocinas foi realizada por metodologia de ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (*DouSet[®] ELISA, R&D Systems*), de acordo com as orientações do fabricante. E para a quantificação de óxido nítrico (NO) no sobrenadante das CTM irradiadas e não irradiadas, foi utilizada a técnica de quimioluminescência de alta sensibilidade na detecção da molécula, com uso do aparelho de análise NOA[™] 280 (*Sievers Instruments, Inc. Boulder, CO, USA*).

3.10. Sistema de cultura condicionada

Como já descrito no tópico 3.8 foi realizado um sistema de cultura condicionada para os demais experimentos. O sistema de cultura condicionada tem como objetivo promover o ambiente favorável para análise do efeito espectador mediado pela secreção de fatores solúveis (HALL, 2003).

Células de linhagem C1498 obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC[®] TIB-49[™]) foram utilizadas como modelo de célula hematopoética para a avaliação do efeito espectador. Estas células cultivadas em sistema de cultura condicionada com sobrenadante 6Gy foram descritas neste trabalho como Grupo 6Gy. Enquanto as células controle, as quais foram cultivadas seguindo o mesmo processo, entretanto, com sobrenadante 0Gy, foram denominadas neste estudo de Grupo 0Gy.

Como controle negativo do experimento, foram cultivadas células C1498 somente com meio DMEM, sendo essa cultura denominada Grupo DMEM.

Tendo isso, a tabela 6 foi montada para esclarecer o sistema de cultura condicionada utilizado neste trabalho, sendo também esquematizado de forma gráfica na figura 9.

Tabela 6 – Relação dos grupos de cultura condicionada.

Cultura Condicionada	
Grupo	Descrição
DMEM	5.10^5 células C1498 ⁽¹⁾ + 500µL de meio DMEM ⁽²⁾
DMEM + G-CSF	5.10^5 células C1498 ⁽¹⁾ + 500µL de meio DMEM ⁽²⁾ + G-CSF ⁽³⁾
6Gy	5.10^5 células C1498 ⁽¹⁾ + 500µL de sobrenadante 6Gy ⁽⁴⁾
6Gy + G-CSF	5.10^5 células C1498 ⁽¹⁾ + 500µL de sobrenadante 6Gy ⁽⁴⁾ + G-CSF ⁽³⁾
0Gy	5.10^5 células C1498 ⁽¹⁾ + 500µL de sobrenadante 0Gy ⁽⁵⁾
0Gy + G-CSF	5.10^5 células C1498 ⁽¹⁾ + 500µL de sobrenadante 0Gy ⁽⁵⁾ + G-CSF ⁽³⁾

⁽¹⁾ Células hematopoéticas da linhagem C1498, obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC® TIB-49™).

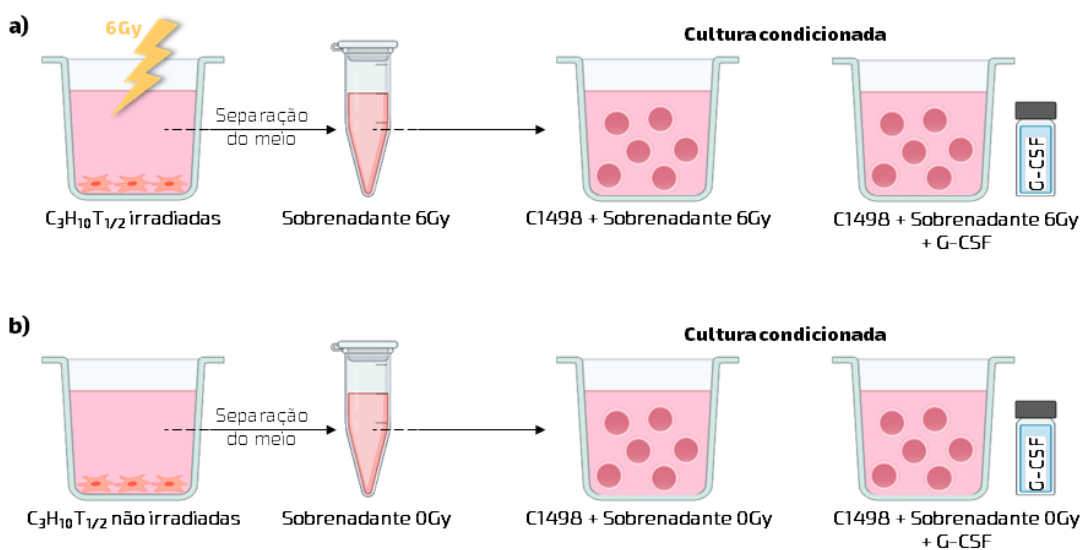
⁽²⁾ Meio de cultura DMEM 1:1 contendo baixa glicose (Cultilab, Campinas, Brasil), penicilina 1% (100UI/mL) + estreptomicina (100mg/mL), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB).

⁽³⁾ 50µL de *mouse* G-CSF (*Granulocyte colony-stimulating factor*), 75-125pg/mL (RD Systems®).

⁽⁴⁾ Sobrenadante de 24 horas de cultura de CTM (C₃H₁₀T_{1/2}) previamente irradiadas: Sobrenadante 6Gy.

⁽⁵⁾ Sobrenadante de 24 horas de cultura de CTM (C₃H₁₀T_{1/2}): Sobrenadante 0Gy.

Figura 9 – Esquema gráfico do sistema de cultura condicionada utilizado neste estudo.



Fonte: Autoria Própria, utilizando ferramentas do Biorender.

3.11. Avaliação do efeito espectador provocado pelas CTM irradiadas sobre a capacidade clonogênica de células hematopoéticas em cultura 3D

Com o objetivo de avaliar possível alteração na capacidade clonogênica das células C1498 frente ao efeito espectador, foi realizada cultura 3D na qual as células foram cultivadas em metilcelulose (MethoCult® M3134 – que apresentam adição de G-CSF), visto que alterações nos genes de ciclo celular foram encontradas. Este é um meio de cultura adequado para o crescimento de células progenitoras hematopoéticas para ensaios de unidades formadoras de colônia, contudo, como se trata de um meio incompleto, se fez necessária a adição de meios para suplementação deste (*STEAMCELLS Technologies*, Ficha de Informações do Produto).

Para esta cultura, foi necessário deixar o meio MethoCult® descongelando *overnight* a 2-8°C, como especificações do fabricante. Com o auxílio de seringa (5mL), foi transferido 3mL deste meio para um tubo Falcon de 15ml e suplementado com 500µL dos sobrenadantes 6Gy e 0Gy (em tubos diferentes) e um tudo com adição de DMEM. Após homogeneizados, foram adicionadas 200 células em cada tubo Falcon e, com auxílio novamente de uma seringa, todo o conteúdo do tubo foi colocado em um poço da placa de cultura de 6 poços. Sendo realizados assim, o plaqueamento dos grupos DMEM + G-CSF, 0Gy + G-CSF e 6Gy + G-CSF (descritos na tabela 6), haja vista que o meio MethoCult® M3134 contém G-CSF (*STEAMCELLS Technologies*, Ficha de Informações do Produto).

Em um poço vazio foi colocado água esterilizada para garantir a umidade apropriada para o crescimento das colônias. Após a preparação da placa, esta foi colocada em estufa de CO₂ 5% a 37°C.

Foi observado o crescimento das colônias e estas foram quantificadas em 14 dias.

Foi realizado um total de 3N em dias alternados para manter o perfil de experimentos independentes.

3.12. Efeito espectador em relação a proliferação das C1498 avaliado por metodologia de MTT em metilcelulose

O ensaio de MTT foi utilizado para avaliação da proliferação das células C1498 e viabilidade das colônias (PRÄBST et al, 2017) em meio de metilcelulose, frente aos meios condicionados. Para tal, em placas de 24 poços, 35 células foram plaqueadas com 500µL de meio de metilcelulose (MethoCult® M3134) + 83µL de meios condicionantes, com a metodologia equivalente a descrita no tópico 3.11.

Após 14 dias de incubação em estufa de CO₂ 5% a 37°C, foi realizado o experimento de MTT. Foram adicionados 500µL de meio DMEM nos cultivos em metilcelulose para promover a solubilidade do meio de cultura, e foram adicionados 100µL do reagente de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) 5mg/dL com concentração final de reagente no poço de 0,5mg/dL. As placas foram incubadas por 4 horas em estufa de CO₂ 5% a 37°C e, ao final, as amostras foram centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos, descartados os sobrenadantes e ressuspensos os cristais de formazan formados em 1mL de DMSO (dimetilsulfóxido). Após 30 minutos de incubação com o DMSO à 37°C com agitação, as amostras foram lidas no aparelho *Varioskan Flash (Thermo Scientific)* no comprimento de onda de 570nm.

3.13. Avaliação da produção de mieloperoxidase pelas células C1498 em cultura 3D frente ao efeito espectador

A fim de avaliar a produção de mieloperoxidase (MPO) das células hematopoéticas frente ao efeito bystander em cultura 3D, os grupos experimentais DMEM, 0Gy e 6Gy foram plaqueados em placa de 24 poços em meio de metilcelulose (MethoCult® M3134), em um total de 35 células em 500µL de meio de metilcelulose + 83µL de meios condicionantes, conforme descrito no tópico 3.11. A MPO é uma enzima expressa em maioria nos leucócitos granulares, como os neutrófilos e suas células precursoras (em menor quantidade). Contudo, outros leucócitos polimorfonucleares podem expressar esta enzima que está relacionada com a resposta imunológica inata (JESUS *et al.*, 2022). Após 14 dias, 500µL de PBS foram adicionados nos poços de amostras para promover solubilização da metilcelulose. 17µL do reagente de benzidina (0,3g de benzidina em 99ml de etanol PA + 0,18g de

nitroprussiato de sódio diluídos em 1mL de H₂O) + 33µL de H₂O₂ pura 10 volumes foram incorporados nas amostras diluídas. A aquisição dos resultados se deu por espectrofotometria no aparelho *Varioskan Flash (Thermo Scientific)* com o comprimento de onda de 470nm. Como controle do experimento, foi realizado o poço “branco”.

3.14. Efeitos das CTM irradiadas sobre o ciclo celular e viabilidade das C1498

Com a finalidade de avaliar o ciclo celular e viabilidade das células hematopoéticas C1498 frente ao efeito espectador de CTM irradiadas, foi realizada a metodologia de citometria de fluxo.

Todos os grupos experimentais descritos na tabela 6 foram utilizados para esta etapa.

3.14.1. Ciclo celular

24 horas antes do plaqueamento, as células C1498 foram submetidas ao período de carência com meio DMEM 0,5% SFB. Para análise do ciclo celular, as culturas celulares foram lavadas 1x com PBS 2% SFB e o *pellet* ressuspenso em 200µL de Triton X 0,1% (+ 0,1% de citrato de sódio em PBS) + 20µL de RNase (4g). As amostras foram incubadas por 25 minutos. Após o tempo, foram adicionados 8µL de iodeto de propídio (PI) + incubação de 5 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura no citômetro FACS Canto II (FACScan®, *BECTON DICKSON, San Jose, EUA*).

Foram realizados controles sem marcação (com C1498 cultivadas em meio DMEM) e simples marcado PI. E o grupo 0Gy foi utilizado como controle biológico do experimento.

3.14.2. Viabilidade

A análise de viabilidade foi realizada através da marcação com Anexina-V e PI (reagente que se liga em duplas fitas de DNA a partir do momento em que este consegue adentrar as células pelos poros formados pelo processo de morte celular). Para tal, as células C1498 foram lavadas 1x com PBS 2% SFB e ressuspendidas em 50µL de tampão anexina + 3µL de anexina-V e incubadas por 30 minutos ao abrigo

da luz. Foram adicionados 8µL de PI e, em seguida, foi realizada a leitura no citômetro FACS Canto II (FACScan®, BECTON DICKSON, San Jose, EUA).

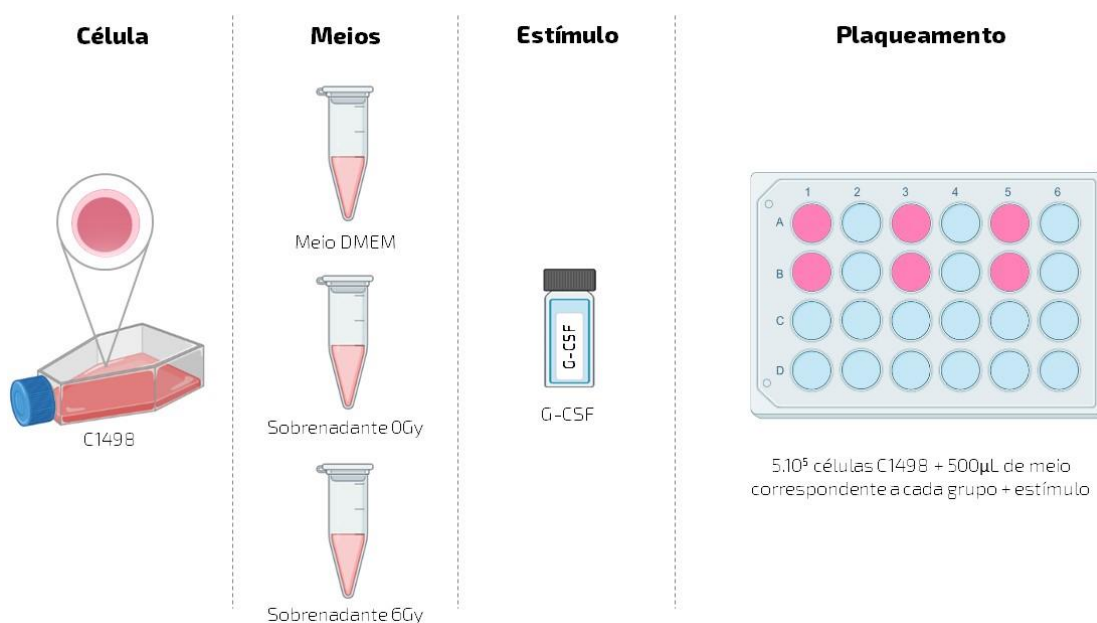
Foram realizados controles sem marcação (com C1498 cultivadas em meio DMEM); simples marcado para anexina-V e simples marcado PI. E o grupo 0Gy foi utilizado como controle biológico do experimento.

3.15. Avaliação do efeito das CTM irradiadas sobre a regulação gênica de células hematopoéticas por RT-PCR

De forma complementar às metodologias já descritas, sendo evidenciadas diferenças entre as culturas condicionadas com sobrenadante 0Gy e 6Gy, foi realizada a análise de transcrição gênica para genes específicos de controle do ciclo celular, pluripotência e diferenciação celular.

Para esta avaliação da regulação das CTM irradiadas sobre aspectos da hematopoese, com relação ao efeito espectador, foram utilizadas as células hematopoéticas de linhagem C1498. Um ensaio de cultura condicionada foi realizado, baseado no já exposto na tabela 6, em placas de 24 poços. Foram plaqueados um total de 6 N (contendo os 6 grupos cada) em dias alternados para manter o perfil de ensaios independentes, como esquematizado na figura 11.

Figura 10 – Esquema de plaqueamento de 1N.



Fonte: Autoria Própria, utilizando ferramentas do Biorender.

A partir de 24 horas do plaqueamento, as células foram submetidas ao processo de extração de RNA e, posteriormente, ao processo de síntese de cDNA como descrito nos tópicos 3.6.1 e 3.6.2, respectivamente.

3.15.1. PCR em tempo real

A análise da expressão gênica foi feita pelo método de quantificação relativa, no qual foi utilizado um gene de referência como controle endógeno (Gapdh; Mm99999915_g1). Foi avaliada a expressão dos genes Ccnd1 (Mm00432359_m1), Ccnd2 (Mm00438070_m1), Ccne1 (Mm01266311_m1), Cdkn1a (Mm00432448_m1), Cdkn1b (Mm00438168_m1), Sox2 (Mm03053810_s1), Nanog (Mm02019550_s1), Pou5f1 (Mm03053917_g1), Gata1 (Mm02019550_s1) e Gata3 (Mm02019550_s1), Sfp1 (Mm02019550_s1).

A determinação da expressão dos dados avaliados foi realizada por RT-PCR igualmente descrito no item 3.6.3.

3.16. Avaliação do efeito espectador provocado pelas CTM irradiadas sobre a expressão de marcadores de linhagem de células C1498

A fim de se avaliar se o efeito espectador promove alteração imunofenotípicas nas células hematopoéticas (C1498), foi realizada citometria de fluxo. Os grupos experimentais 0Gy e 6Gy (com e sem G-CSF) descritos na tabela 6 foram avaliados.

Como início desta etapa, as amostras foram lavadas 1x com PBS 2% SFB, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 200µL de PBS 2% SFB. Foram adicionados todos os anticorpos de superfície nas diluições de 1:100 para aqueles de concentração de 0,5mg/mL e 1:40 para aqueles de concentração 0,2mg/mL, cada qual em seu respectivo tubo determinado pelo painel descrito na tabela 8, com a descrição de cada anticorpo presente no ANEXO A.

Tabela 7 – Painel de anticorpos utilizados para diferenciação celular por imunofenotipagem

Painel 1	Painel 2	Painel 3	Painel 4
CD11b	Ly6C	B220	CD3
Ly6G	CD115		
F4/80	MAC-3		

Fonte: Autoria Própria, adaptado de Mopin, Driss e Brinster (2016).

As amostras foram mantidas incubadas por 1 hora no gelo ao abrigo da luz. Dado este período, estas foram lavadas 1 vez com PBS suplementado com 2% de SFB e ressuspensas com 200µL de PBS 2% de SFB e lidas por citometria de fluxo.

Para todos os painéis foram realizados os controlos sem marcação e simples marcados para todos os anticorpos utilizados.

3.17. Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos ao teste de normalidade e classificados em paramétricos ou não paramétricos pela aderência à curva Gaussiana. Foi adotado o nível de significância de 5% com intervalo de confiança de 95% e, a partir das análises estatísticas de One-way ANOVA, foi realizado teste complementar de Dunnet, para análises de 3 ou mais variáveis. Já, para comparações entre 2 variáveis foi aplicado Teste *T de Student*. A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa *GraphPad Prism (Software Inc, San Diego, EUA)*.

4. Resultados alcançados

4.1 A irradiação modula negativamente a viabilidade de CTM

Quando avaliadas as células-tronco mesenquimais após o processo de irradiação nas doses de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 e 20Gy foram observadas alterações na viabilidade celular.

Foi visto que as doses de 0.5 a 4Gy não promoveram aumento significativo em relação à apoptose quando comparadas ao grupo controle de CTM 0Gy, diferentemente das doses de 6 a 20Gy, as quais apresentaram diferenças que corroboram com o aumento do processo apoptótico das células irradiadas (6Gy $p=0.0175$; 8Gy $p=0,0175$; 10Gy $p=0,0031$; 15Gy $p=0,0032$; 20Gy $p<0,0001$). Dessa forma, a porcentagem de células viáveis se apresenta de forma inversamente proporcional às células em processo apoptótico. Com isso, baseado nas análises estatísticas acima descritas, e como já esperado, a significância da diferença de células viáveis e o controle só se dá a partir da dose de 6Gy (6Gy $p=0.0407$; 8Gy $p=0,0059$; 10Gy $p<0,0001$; 15Gy $p<0,0001$; 20Gy $p<0,0001$) (figura 11).

Doravante a esses dados foi possível entender que a viabilidade das CTM irradiadas é dependente da dose de radiação e que somente a partir de 6Gy se tem significância estatística. Com isso, foi possível delinear o começo da escolha da dose para avaliação do efeito espectador.

A dose a ser escolhida foi aquela em que as células sofreram com radiação ionizante e apresentaram marcadores de danos. Entretanto, grande parte da sua cultura permaneceu viável para que esta pudesse produzir fatores que promovessem o efeito espectador.

Dado isso, as doses escolhidas para as demais análises nas CTM irradiadas foram de 4, 6 e 15Gy, a fim de se estreitar à apenas uma. A dose de 4Gy foi escolhida por ser a última dose em que não apresentou diferença com o controle. Nesta mesma linha de pensamento, a dose de 6Gy foi a segunda dose escolhida por começar a apresentar diferença estatística, entretanto grande parte de suas células ainda permanecem viáveis. E para a comparação com uma dose mais elevada, foi escolhida

a dose de 15Gy. A dose de 20Gy não foi escolhida pelo fato de muitas células entrarem em apoptose e não ser relevante para cumprir com o objetivo do estudo.

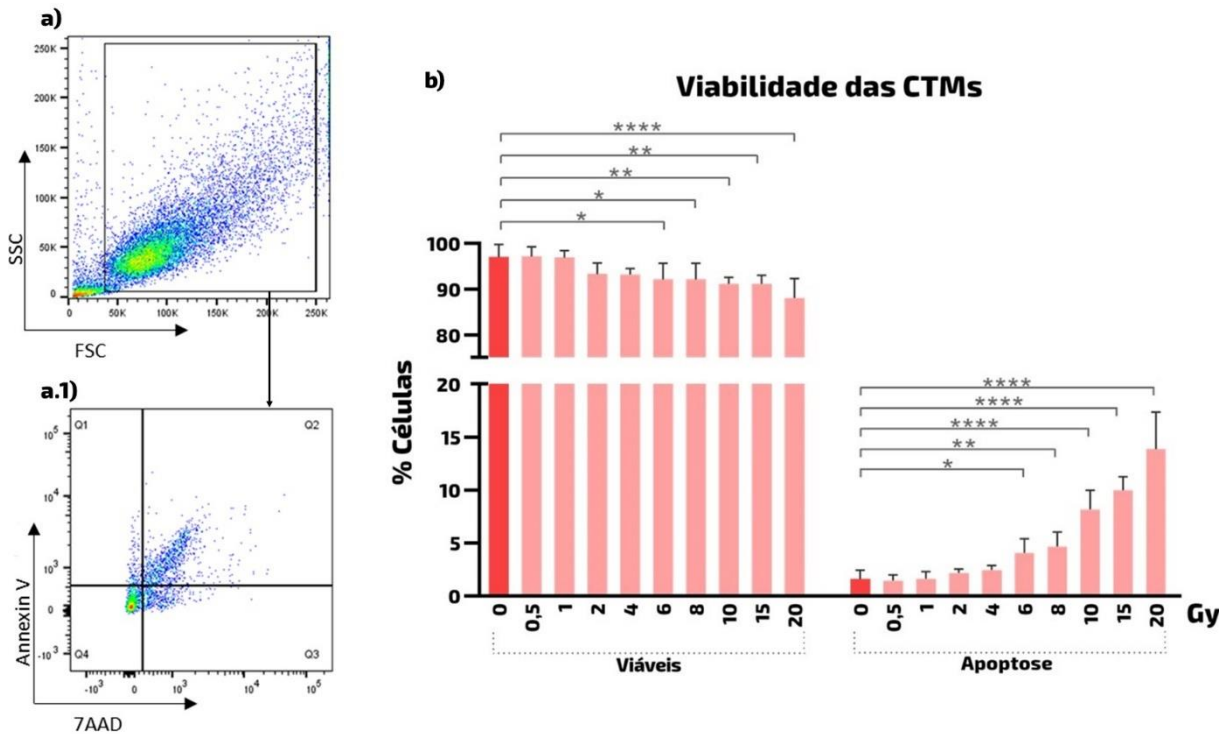


Figura 11- Avaliação da viabilidade celular das CTM após 24h do processo de irradiação. Os dados são expressos como a média \pm SD de 6 experimentos independentes. (a) e (a.1) Estratégia de análise dos dados adquiridos no citômetro de fluxo. (b) Viáveis: Porcentagem de células viáveis em diferentes doses de radiação ionizante, ou seja, sem marcação de Anexina-V e 7-AAD; Apoptose: Porcentagem de células em apoptose após a irradiação com diferentes doses, em que estas células são positivas tanto para Anexina-V quanto 7-AAD. Em que * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.2 Ciclo celular e senescência das CTM sofrem alteração com a irradiação

Quando analisada a senescência das CTM irradiadas, foi possível observar diferença estatística entre a dose de 6Gy e o controle ($p=0,0086$) bem como a de 15Gy com o controle ($p=0,0315$). Corroborando com o dado acima descrito em que a dose de 4Gy não apresenta diferenças em relação as CTM não irradiadas ($p=0,9134$) (figura 12c)

Contudo, a análise de ciclo celular revelou diferença em todas as doses de irradiação. Em relação a porcentagem de células na fase G0/G1, conforme há um aumento de dose, maior a relação de células nesta fase (valor de 'p' em comparação como o controle: 4Gy $p=0,03$; 6Gy $p=0,0059$; 15Gy $p=0,0002$). Tendo isso, de forma inversamente proporcional foi observada a diminuição de células nas fases S/G2/M

ao passo que a dose de radiação aumenta (valor de 'p' em comparação como o controle: 4Gy $p=0,0477$; 6Gy $p=0,0026$; 15Gy $p=0,0001$) (figura 12b).

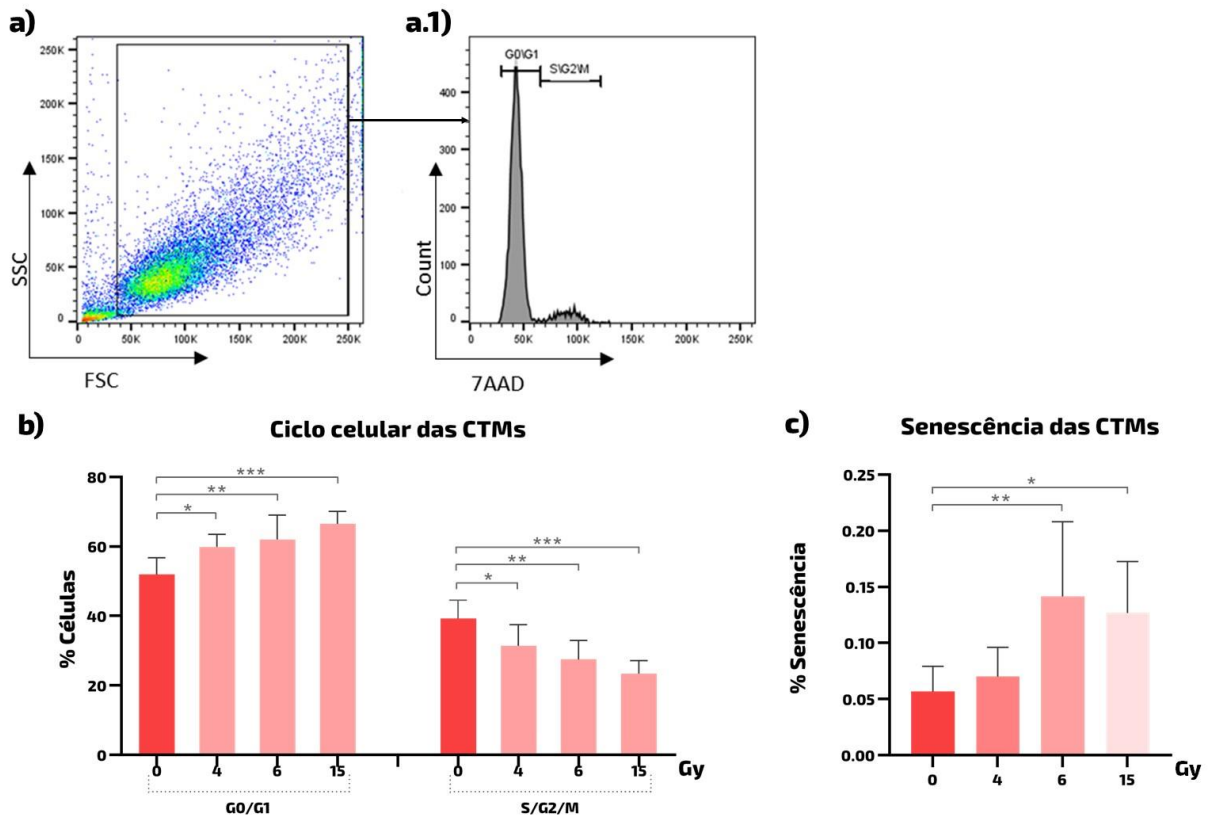


Figura 12 – Avaliação do ciclo celular e senescência das CTM após 24 horas do processo de irradiação. Os dados são expressos como a média \pm SD de 6 experimentos independentes. (a) e (a.1) Estratégia de análise dos dados adquiridos no citômetro de fluxo. (b) Representa a porcentagem de células em G0/G1 e S/G2/M após irradiação com as doses de 4, 6 e 15Gy, e comparação com o controle biológico 0Gy. (c) Porcentagem de células senescentes após irradiação com diferentes doses (4, 6 e 15Gy), tendo como controle biológico, as CTM não irradiadas (0Gy). Em que * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

4.3 A radiação promove alteração na expressão gênica de Bax e Cdkn1a de CTM

Como resultado, pôde-se observar que houve diferença estatística na expressão de Bax (figura 13a) quando comparada a dose de 6Gy com o controle ($p=0,0027$), bem como a de 15Gy com o controle ($p=0,0071$). Em contraponto, a expressão de Bcl-2 nas células irradiadas não apresentou diferença digna de nota quando comparadas ao controle 0Gy (figura 13b) (4Gy $p=0,1379$; 6Gy $p=0,8058$; 15Gy $p=0,3247$). Tendência observada de forma semelhante à expressão de Cdkn1b, em que não houve diferenças significantes entre as doses estudadas quando comparadas ao grupo controle (4Gy $p=0,9976$; 6Gy $p=0,1079$; 15Gy $p=0,5084$) (figura 13d). No entanto, a expressão gênica de Cdkn1a apresentou diferença estatística

quando comparadas as doses de 6Gy com o controle, bem como a de 15Gy com o controle (4Gy $p=0,9806$; 6Gy $p=0,0229$; 15Gy $p=0,003$) como pode ser observado na figura 13c.

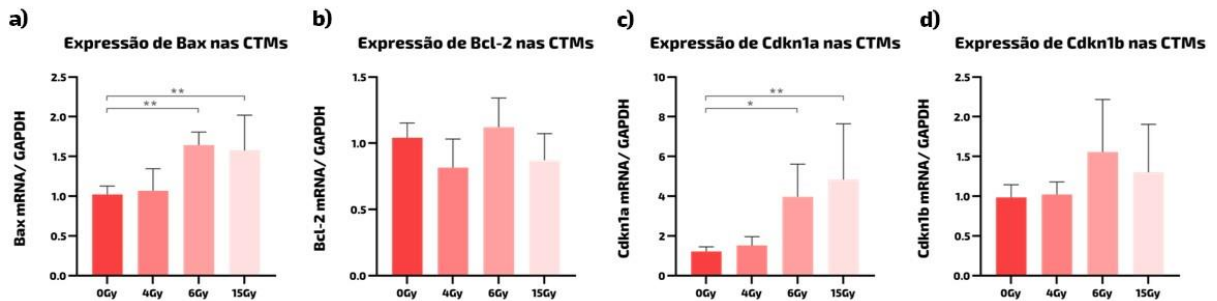


Figura 13 – Expressão dos genes relacionados ao controle de apoptose nas CTM após 24h de irradiação. Os dados são expressos como a média \pm SD de 6 experimentos independentes. (a) Expressão de Bax mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH. (b) Expressão de Bcl-2 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH. (c) Expressão de Cdkn1a mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH. (d) Expressão de Cdkn1b mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH. Com destaque para a dose de 6Gy que foi escolhida para o decorrer do estudo. Em que * $p<0,05$; ** $p<0,01$.

4.4 Expressão de γ -H2AX nas CTM aumenta diretamente com o aumento da dose de radiação

A expressão de γ -H2AX apresentou diferença estatística nas doses de 6 e 15Gy quando em comparação com a CTM 0Gy (figura 14) (4Gy $p=0,3288$; 6Gy $p=0,0021$; 15Gy $p=0,001$).

Ou seja, foi demonstrado que as células que sofreram com radiação ionizante podem apresentar danos no seu DNA dependentes da dose, disponibilizando mais informações que corroboram com os experimentos já realizados, em que as CMTs irradiadas com 4Gy não sofrem com a radiação e somente há diferenças estatísticas a partir da dose de 6Gy.

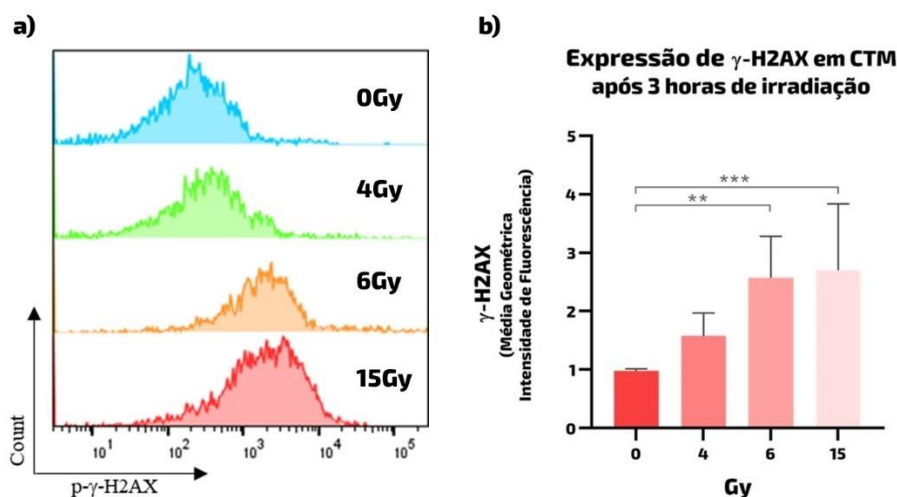


Figura 14 – Quantificação de γ -H2AX nas CTM após 3 horas de irradiação. Com destaque para a dose de 6Gy que foi escolhida para o decorrer do estudo. Os dados são expressos como a média \pm SD de 6 experimentos independentes. (a) Estratégia de análise com representação em histograma referente à marcação com o anticorpo anti-p- γ -H2AX das doses de 0, 4, 6 e 15Gy. (b) Representação gráfica do resultado da média geométrica da intensidade de fluorescência de todos os experimentos independentes. Em que * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Entretanto, quando comparado o dano de 6Gy com o de 15Gy através do Teste *T de Student*, pôde-se observar que não houve diferença estatística ($p=0,8138$). Tendo em vista isso, somado aos resultados de viabilidade, ciclo celular, senescência e expressão gênica (Bax, Bcl-2, Cdkn1a/b) foi possível escolher a dose de 6Gy para ser utilizada nos experimentos para avaliação do efeito espectador.

Em outras palavras, a dose de 6Gy foi escolhida por ser uma dose em que há danos ao DNA com menor taxa de apoptose, promovendo uma cultura com células capazes de produzir fatores solúveis, que atuam como principal via do efeito espectador. Corroborando com o pensamento de dose ideal para a continuidade deste estudo.

4.5 A produção de IL-6 pelas CTM é diminuída com a irradiação

Como já descrito, os fatores solúveis são ferramentas fundamentais para promoção do efeito espectador da radiação. Dado isto, as citocinas e NO avaliados foram analisados e apenas a produção de IL-6 apresentou diferença estatística significativa quando comparadas as doses de irradiação com o controle 0Gy (4Gy $p=0,02$; 6Gy $p=0,0279$; 15Gy $p=0,0589$) (figura 15).

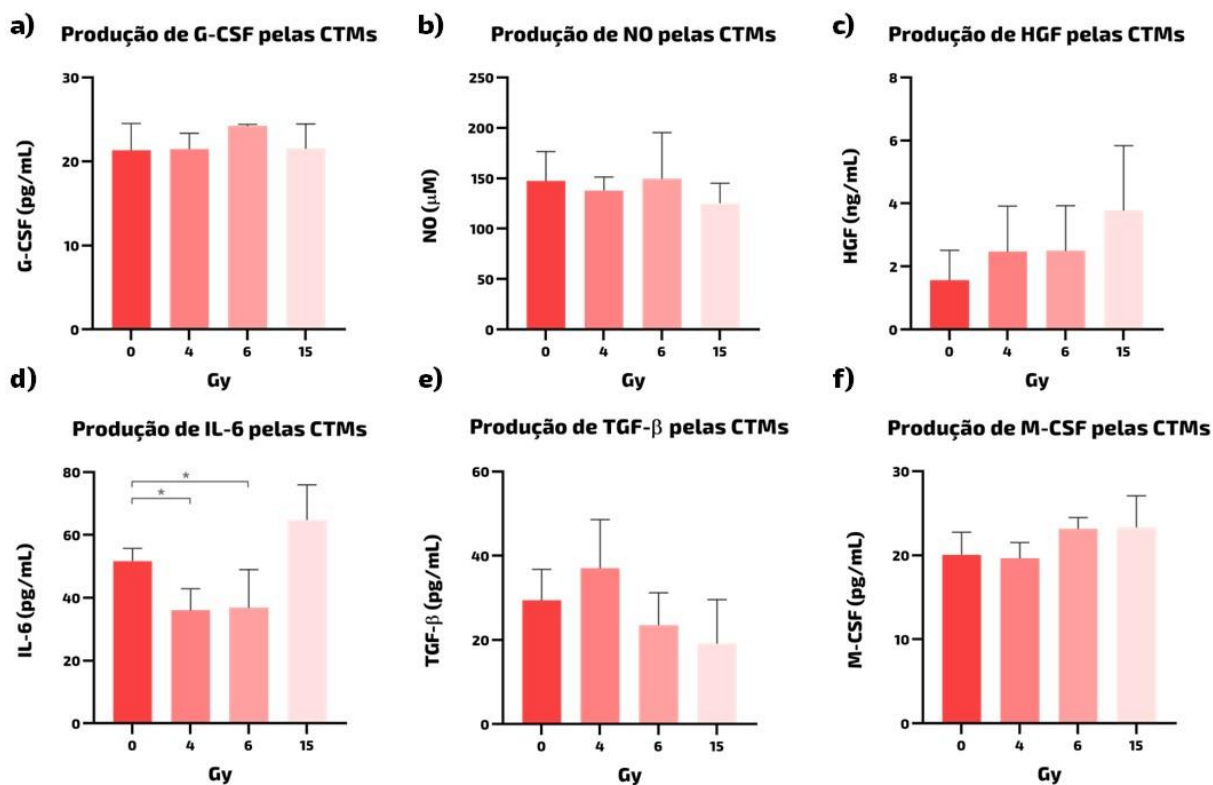


Figura 15 – Relação das citocinas e NO produzidos pelas CTM irradiadas, após 24h. Os dados são expressos como a média \pm SD de 6 experimentos independentes. (a) Níveis de produção em pg/mL de G-CSF pelas CTM irradiadas. (b) Níveis de produção em μ M de NO pelas CTM irradiadas. (c) Níveis de produção em pg/mL de HGF pelas CTM irradiadas. (d) Níveis de produção em pg/mL de IL-6 pelas CTM irradiadas. (e) Níveis de produção em pg/mL de TGF- β pelas CTM irradiadas. (f) Níveis de produção em pg/mL de M-CSF pelas CTM irradiadas. Em que * $p < 0,05$.

4.6 CTM irradiadas modulam negativamente a capacidade clonogênica de células hematopoéticas

Como início dos resultados relacionados ao efeito espectador promovendo alterações na hematopoese, dados os 14 dias do ensaio, as colônias foram contadas com auxílio da microscopia óptica invertida.

Em relação ao número de colônias por grupo, foi observada uma queda no grupo 6Gy em relação ao grupo 0Gy. Ao aplicar o teste estatístico *T de Student* para determinar a presença de diferença entre os dois grupos, foi demonstrado um valor de $p = 0,054$ (figura 16).

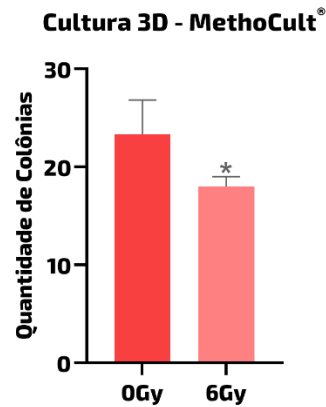


Figura 16 – Contagem do número de colônias celulares originadas a partir do plaqueamento de C1498 em meio MethoCult® após 14 dias de experimento. Os dados são expressos como a média \pm SD de 3 experimentos independentes. Representação gráfica da comparação entre os grupos 0Gy e 6Gy, em relação a todas as culturas realizadas, aplicando o teste T de Student. Em que $*p < 0,05$.

Ao analisar as colônias em relação ao tamanho e aspecto, diferenças foram dignas de nota. Comparando o grupo 0Gy em relação ao grupo 6Gy foi possível definir que as colônias formadas são mais densas em 0Gy, aspecto esse observado de forma contrária nas culturas do grupo 6Gy, como pode ser verificado na figura 17. Esse processo pode indicar alteração na capacidade proliferativa das células frente ao efeito espectador.

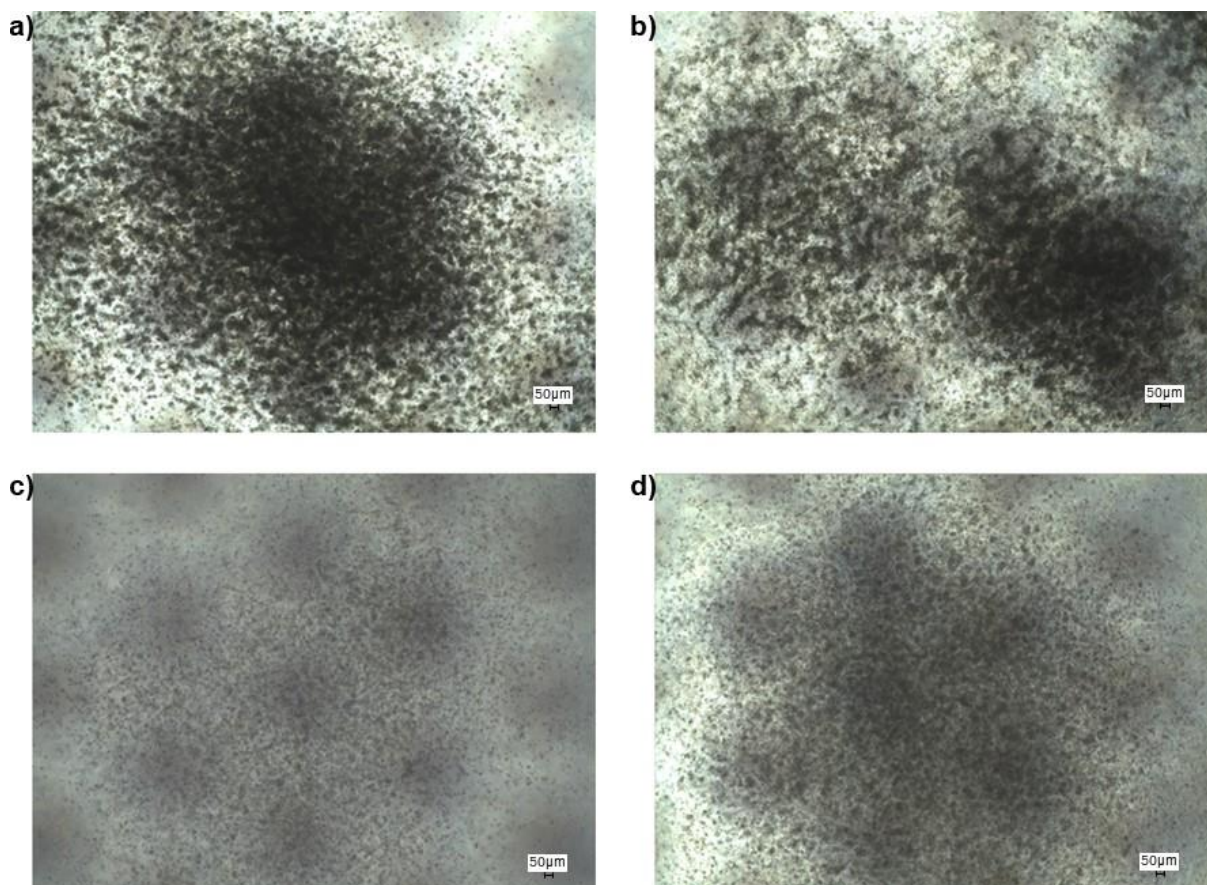


Figura 17 – Fotos representativas da cultura de C1498 em metilcelulose (MethoCult®) em 14 dias de experimento. As fotos foram apresentadas no aumento de 40x. (a) e (b) representam as culturas com sobrenadante 0Gy, enquanto (c) e (d) registram as culturas condicionantes com sobrenadante 6Gy.

4.7 Proliferação e metabolismo das células hematopoéticas em cultura 3D tendem a diminuir sob o efeito espectador

De forma complementar à técnica realizada no tópico anterior, o ensaio de MTT realizado nas culturas de C1498 em metilcelulose demonstrou uma queda visível na proliferação e metabolismo celular no grupo 6Gy em relação ao controle 0Gy, como pode ser observado na figura 18. Contudo, essa diminuição não se caracterizou estatisticamente significativa.

MTT em cultura 3D - MethoCult®

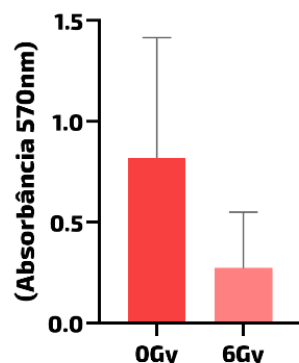


Figura 18 – Dados de absorbância, em nm, das colônias após o ensaio de MTT da cultura 3D em metilcelulose (MethoCult®). Os dados são expressos como a média \pm SD de 3 experimentos independentes. Representação gráfica da comparação entre os grupos 0Gy e 6Gy, em relação a todas as culturas realizadas, aplicando o teste T de Student.

4.8 Efeito das CTM irradiadas modula a produção de MPO pelas C1498 em cultura 3D

A investigação quanto a produção de MPO das células C1498 cultivadas em meio de metilcelulose juntamente com os sobrenadantes condicionantes, na comparação dos dois grupos experimentais 0Gy e 6Gy, não demonstrou diferenças dignas de atenção ($p=0,2159$), de modo a ser observado na figura 19. Contudo, ao admitir que a quantidade de MPO produzida pelas colônias seria proporcional ao MTT, foi realizada uma padronização para os valores esperados de MPO no grupo 6Gy, levando em consideração os valores encontrados do MTT e MPO do grupo 0Gy. Por conseguinte, foi realizada a comparação entre os valores esperados de MPO para o grupo 6Gy e os valores obtidos pelo experimento (figura 20). Nesta análise o valor de MPO de 6Gy foi significativamente maior que o esperado ($p=0,0082$).

MPO em cultura 3D - MethoCult®

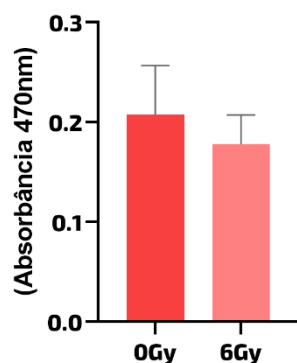


Figura 19 - Dados de absorbância, em nm, das colônias após o teste de MPO da cultura 3D em metilcelulose (MethoCult®). Os dados são expressos como a média \pm SD de 3 experimentos independentes. Representação gráfica da comparação entre os grupos 0Gy e 6Gy, em relação a todas as culturas realizadas, aplicando o teste T de Student.

Relação 6Gy MPO - MTT

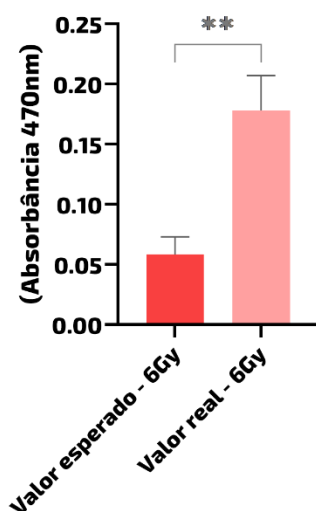


Figura 20 – Dados das comparações dos valores de absorbância esperado de MPO em relação aos valores de MTT e os valores obtidos após a realização do experimento. O cálculo do valor esperado de MPO utilizou como base os valores de MPO em relação aos de MTT da cultura do grupo 0Gy. A partir deste ponto, foi calculado como estimativa os valores de MPO que a cultura 6Gy poderia apresentar com base nos resultados de MTT. Dado isso, o valor esperado foi comparado ao valor obtido no experimento e obtida uma diferença significativa de aumento de produção da enzima em relação a proliferação e metabolismo celular. Em que $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

Dado este ponto, os resultados dos experimentos realizados com as células hematopoéticas C1498 serão demonstrados, separadamente, em dois grandes blocos: sem estímulo de G-CSF e com estímulo de G-CSF.

4.9 Efeito espectador não altera significativamente o ciclo celular e viabilidade de células hematopoéticas em ambiente não estimulado com G-CSF

Quando analisada a viabilidade das células hematopoéticas C1498 frente ao efeito espectador, os seguintes parâmetros foram determinados: células viáveis; células mortas por necrose; células mortas por apoptose. Dentro destes parâmetros, foi possível verificar que quando comparados os grupos e interesse, sendo estes o 0Gy (controle biológico) e o 6Gy, não foi observada diferenças estatisticamente significativas, como demonstrado na figura 21b.

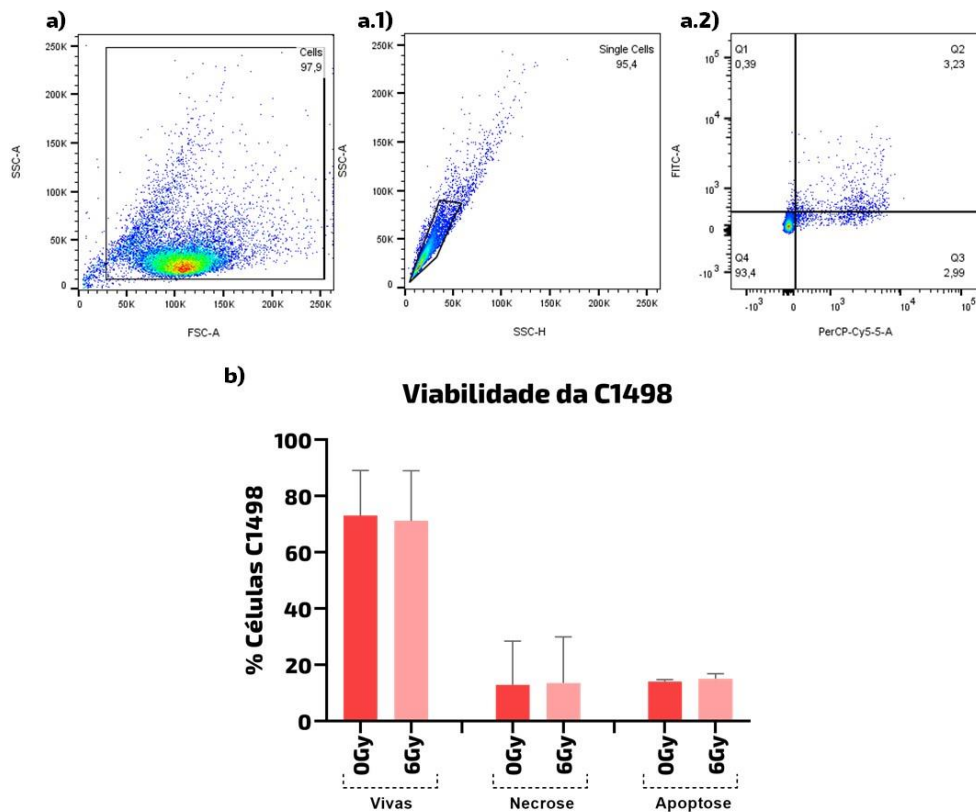


Figura 21 - Avaliação da viabilidade celular das C1498 após 24h do processo de cultura condicionada. Os dados são expressos como a média \pm SD de 3 experimentos independentes. (a), (a.1) e (a.2) Estratégia de análise dos dados adquiridos no citômetro de fluxo. (b) Viáveis: Porcentagem de células viáveis nos diferentes grupos experimentais, ou seja, sem marcação de Anexina-V e PI; Necrose: Porcentagem de células em necrose marcadas com PI; Apoptose: Porcentagem de células em apoptose positivas tanto para Anexina-V quanto PI.

Em relação aos dados de ciclo celular das C1498 em culturas condicionantes, a comparação entre os grupos 0Gy e 6Gy não demonstrou diferenças estatisticamente significantes quando comparadas entre si ($p=0,9751$) (figura 22b).

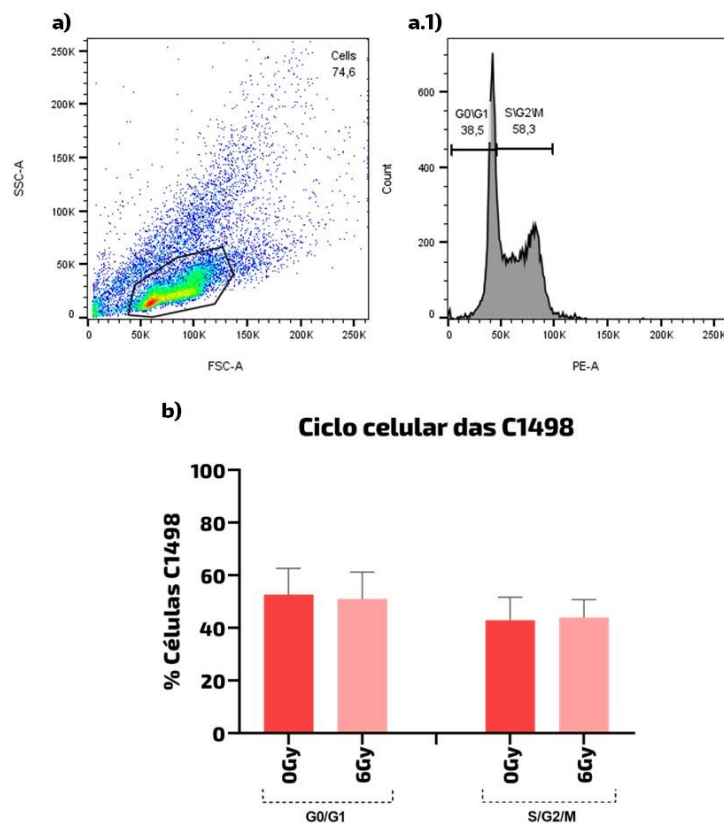


Figura 22 – Avaliação do ciclo celular das C1498 após 24 horas do processo de cultura condicionada. Os dados são expressos como a média \pm SD de 3 experimentos independentes. (a) e (a.1) Estratégia de análise dos dados adquiridos no citômetro de fluxo. (b) Representa a porcentagem de células em G0/G1 e S/G2/M após cultura condicionada.

4.10 Efeito espectador não promove modulação significativa na expressão gênica de células hematopoéticas em cultura não estimulada com G-CSF

Após a análise estatística de Teste *T de student*, que visou comparar o Grupo 0Gy sem estímulo com o Grupo 6Gy sem estímulo, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação a expressão gênica de todos os genes avaliados. Contudo, alguns genes demonstraram tendências de diminuição ou aumento da expressão quando realizada a comparação.

Quando avaliada a expressão gênica dos genes que codificam para componentes de regulação do ciclo celular, como *Ccnd1* que codifica para ciclina D1, *Ccnd2* que codifica para ciclina D2, *Ccne1* que codifica para ciclina E, *Cdkn1a* que codifica para proteína p21, bem como *Cdkn1b* que codifica para proteína p27, é possível observar uma tendência de diminuição na expressão de *Ccnd1*, *Ccne1* e *Cdkn1b*, como mostra a figura 23a, 23c e 23e, respectivamente.

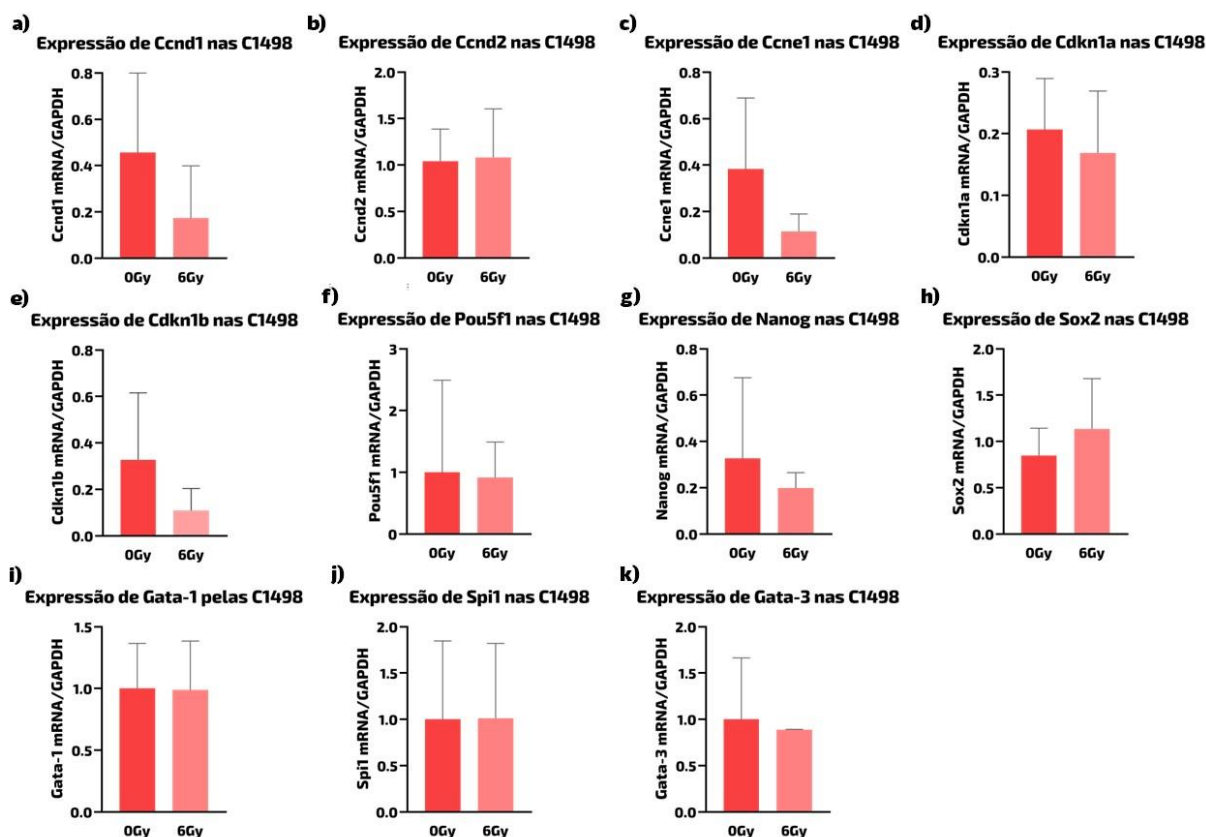


Figura 23 – Expressão de genes associados ao ciclo celular na C1498 submetida ao sistema de cultura condicionada com os sobrenadantes 6Gy e 0Gy sem estímulo de G-CSF. Os dados são expressos como a média \pm SD de 4 experimentos independentes. (a) Expressão de Ccnd1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (b) Expressão de Ccnd2 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (c) Expressão de Ccne1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (d) Expressão de Cdkn1a mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (e) Expressão de Cdkn1b mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada; (f) Expressão de Pou5f1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (g) Expressão de Nanog mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (h) Expressão de Sox2 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada; (i) Expressão de Gata-1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (j) Expressão de Spi1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (k) Expressão de Gata-3 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada.

A expressão de fatores de transcrição mediada pela codificação dos genes Pou5f1, Sox2 e Nanog, associados a pluripotência de células-tronco, determinação do destino celular e proliferação, renovação e pluripotência celular, respectivamente, não apresentou diferenças estatísticas (figura 23f, 23g e 23h, respectivamente).

Fatores associados a diferenciação mielóide e linfóide B, bem como de desenvolvimento eritroide, Spi1 e Gata-1 respectivamente, não foram estatisticamente diferentes quando comparados os grupos 0Gy e 6Gy. Da mesma maneira, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão de Gata-3, gene

associado ao desenvolvimento de células T. Dados estes observados na figura 23i 23j e 23k.

4.11 Efeito espectador não modula a diferenciação das células hematopóéticas em ambiente não estimulado com G-CSF

Os resultados de imunofenotipagem como observado na figura 24b, demonstram que as células C1498 são negativas para Ly6G e positivas para CD11b. Esta positividade também pode ser observada na figura 24c, juntamente com a negatividade de F4/80.

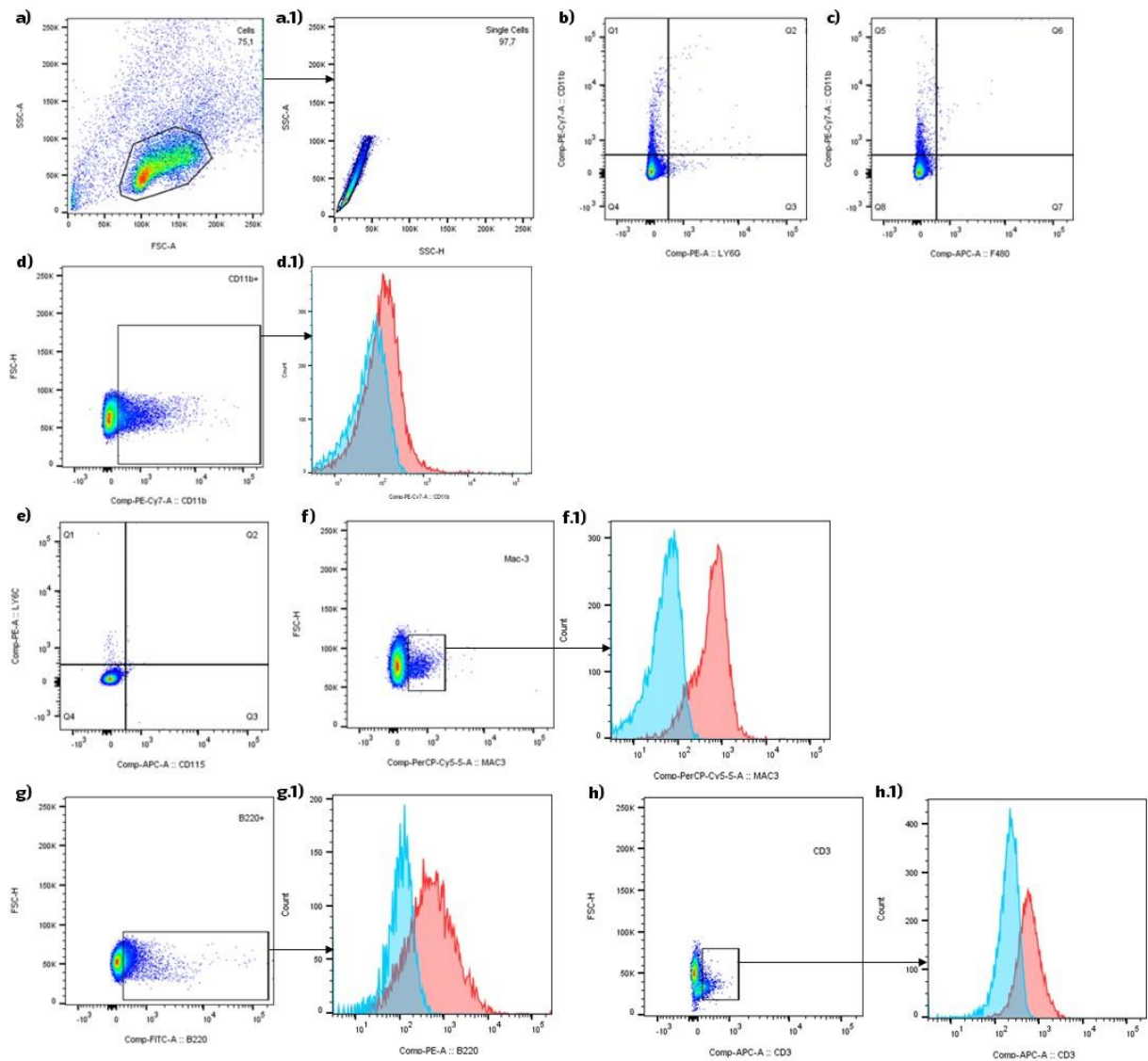


Figura 24 – Estratégia de análise para as amostras de imunofenotipagem, tanto com e sem estímulo, para todos painéis. (a) seleção da população estudada; (a.1) exclusão dos dublets; (b) Verificação da expressão de CD11b x Ly6G; (c) Verificação da expressão de CD11b x F4/80; (d) seleção da população positiva para CD11b; (d.1) comparação da expressão de CD11b da amostra (histograma vermelho) com o controle sem marcação (histograma

azul); (e) Verificação da expressão de CD115 x Ly6C; (f) Seleção da população positiva para Mac-3; (f.1) Comparação da expressão de Mac-3 da amostra (histograma vermelho) com o controle sem marcação (histograma azul); (g) Seleção da população positiva para B220; (g.1) Comparação da expressão de B220 da amostra (histograma vermelho) com o controle sem marcação (histograma azul). (h) seleção da população positiva para CD3; (h.1) comparação da expressão de CD3 da amostra (histograma vermelho) com o controle sem marcação (histograma azul);

Para os marcadores de superfície Ly6C e CD115 também foi observada a ausência de expressão nas células C1498, como demonstrada na figura 24e. Entretanto, para este painel, foi identificada a positividade para Mac-3. Os marcadores B220 e CD3 também se fizeram positivos neste tipo celular. Por conseguinte, os marcadores que se mostram positivos para C1498 foram avaliados frente ao efeito espectador. No que tange a porcentagem de células C1498 marcadas com CD11b, frente aos sobrenadantes 0 e 6Gy não foram observadas diferenças significativas entre os grupos 0Gy e 6Gy ($p=0,49$). A porcentagem de células positivas para Mac-3 também não foi alterada pelo efeito espectador ($p=0,4405$). A relação de células que expressam o marcador de B220, bem como a expressão de CD3, também não foi alterado ($p=0,2471$ e $p=0,3740$, respectivamente), como demonstrados na figura 25.

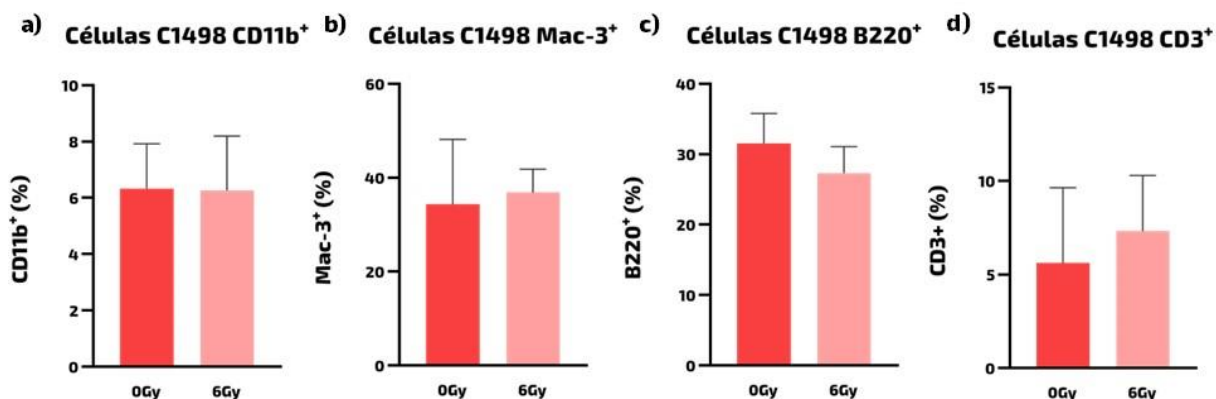


Figura 25 – Expressão de marcadores de superfície associados com a diferenciação celular da C1498 submetida ao sistema de cultura condicionada com os sobrenadantes 6Gy e 0Gy sem estímulo de G-CSF. Os dados são expressos como a média \pm SD de 3 experimentos independentes. (a) % de células CD11b⁺ em relação ao total de células; (b) % de células B220⁺ em relação ao total de células; (c) % de células CD3⁺ em relação ao total de células;

4.12 Células hematopoéticas tem seu ciclo celular modulado negativamente pelo efeito espectador em ambiente estimulado com G-CSF

Tendo como base a mesma estratégia de *gates* descrita na figura 21 do tópico 4.9, bem como os mesmos padrões de estratégia analítica, ao compilar os dados de viabilidade das C1498 frente às culturas condicionadas estimuladas com G-CSF, não

foram encontradas diferenças estatísticas quando comparados os Grupos 0Gy + G-CSF e 6Gy +G-CSF ($p=0,1951$) (figura 26).

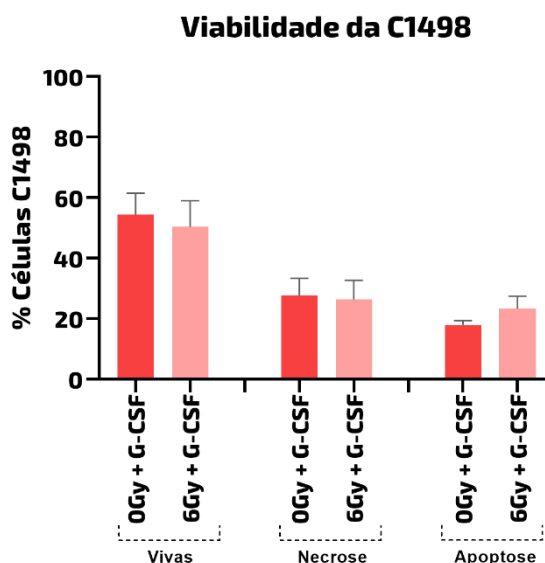


Figura 26 - Avaliação da viabilidade celular das C1498 após 24h do processo de cultura condicionada estimulada com G-CSF. Os dados são expressos como a média \pm SD de 3 experimentos independentes. Viáveis: Porcentagem de células viáveis nos diferentes grupos experimentais, ou seja, sem marcação de Anexina-V e PI; Necrose: Porcentagem de células em necrose marcadas com PI; Apoptose: Porcentagem de células em apoptose positivas tanto para Anexina-V quanto PI.

O mesmo padrão de análise do tópico 4.9 se repete quando analisados os dados de ciclo celular das C1498, entretanto, neste momento, com culturas condicionadas estimuladas com G-CSF. Um novo dado se mostrou relevante quando comparados os grupos 0Gy + G-CSF e 6Gy + G-CSF, no qual a porcentagem de células na fase S/G2/M do grupo 6Gy + G-CSF se apresenta estatisticamente menor que o outro grupo ($p=0,0289$) (figura 27).

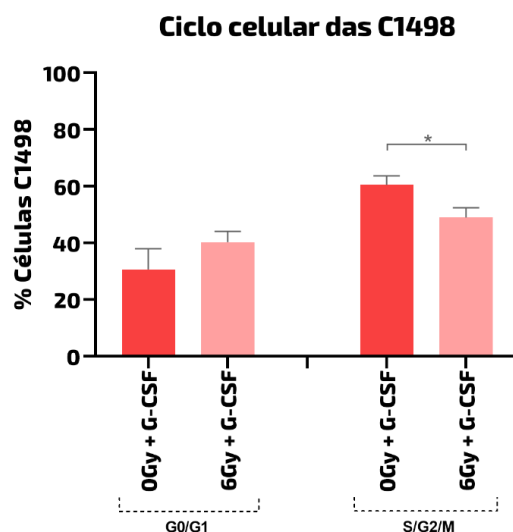


Figura 27 – Avaliação do ciclo celular das C1498 após 24 horas do processo de cultura condicionada estimulada com G-CSF. Os dados são expressos como a média \pm SD de 3 experimentos independentes. Representa a porcentagem de células em G0/G1 e S/G2/M após cultura condicionada estimulada com G-CSF. Em que $*p < 0,05$.

4.13 Expressão gênica de células hematopoéticas frente ao efeito espectador sofre modulação de Ccnd-1 e Gata-3 em ambiente estimulado com G-CSF

Decorrida a análise estatística, tendo como finalidade a comparação entre os grupos 0Gy+G-CSF e 6Gy+G-CSF, foram encontradas diferenças estatisticamente relevantes em relação a expressão gênica de Ccnd1 e Gata-3.

Do mesmo modo interpretativo do tópico 4,10, foram analisadas as expressões gênicas das ciclinas e proteínas reguladoras do ciclo celular, contudo, neste momento, com o diferencial do estímulo com G-CSF. Neste ponto, foi observada diferença estatística na codificação do gene Ccnd1 (figura 28a). Todavia, os genes Ccnd2 e Ccne1, mesmo não apresentando diferenças estatisticamente significativas, demonstraram tendência de diminuição de suas expressões no grupo 6Gy+G-CSF, quando comparadas com seu grupo 0Gy+G-CSF, como apontado na figura 28b e 28c.

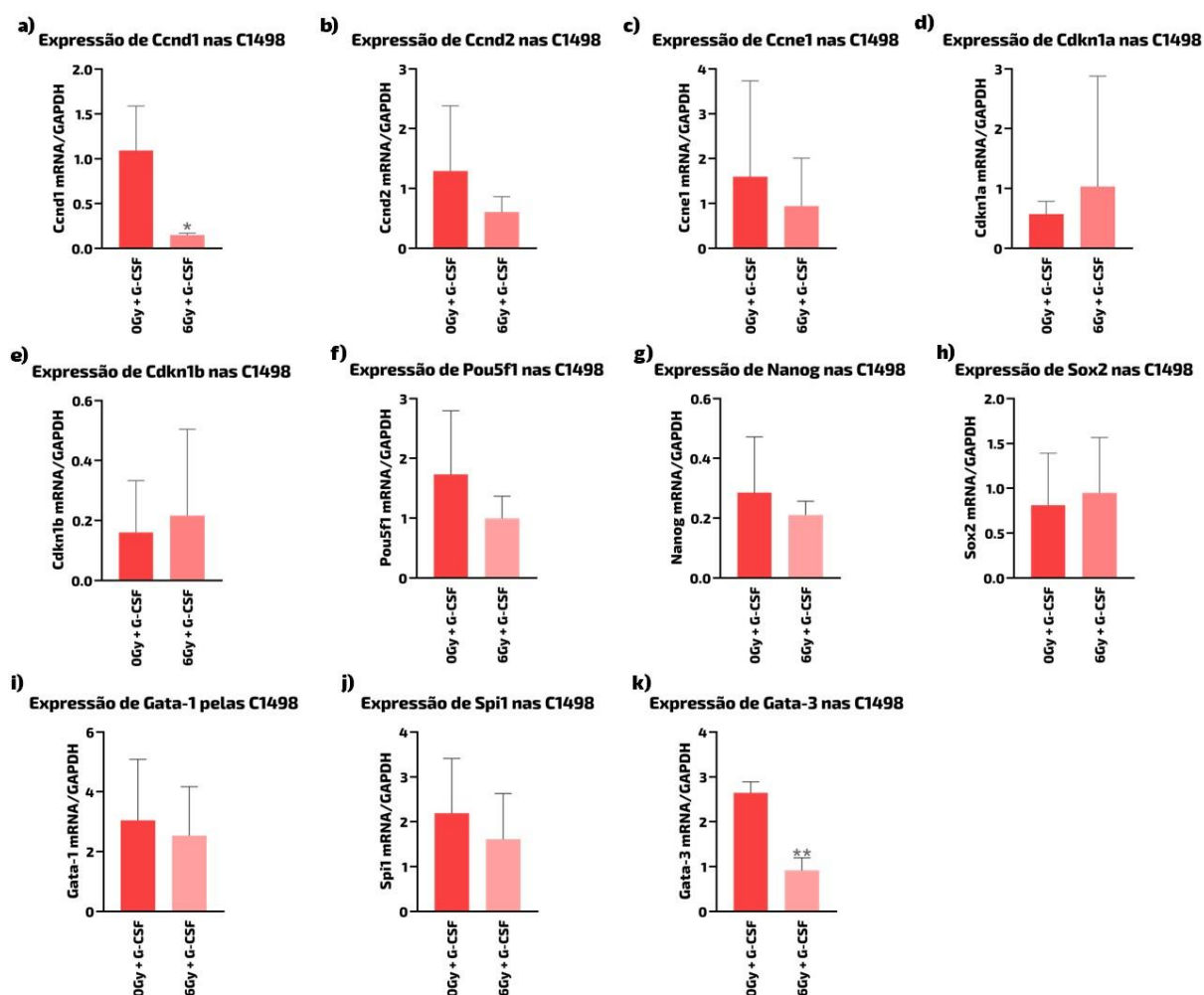


Figura 28 - Expressão de genes associados ao ciclo celular na C1498 submetida ao sistema de cultura condicionada com os sobrenadantes 6Gy e 0Gy com estímulo de G-CSF. Os dados são expressos como a média \pm SD de 4 experimentos independentes. (a) Expressão de Ccnd1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (b) Expressão de Ccnd2 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (c) Expressão de Ccne1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (d) Expressão de Cdkn1a mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (e) Expressão de Cdkn1b mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada; (f) Expressão de Pou5f1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada; (g) Expressão de Nanog mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (h) Expressão de Sox2 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada; (i) Expressão de Gata-1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (j) Expressão de Spi1 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. (k) Expressão de Gata-3 mRNA em relação ao gene endógeno GAPDH na cultura condicionada. Em que * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Em relação a expressão de Pou5f1, Nanog e Sox2 não foram observadas diferenças estatisticamente significante, do mesmo modo da cultura sem estímulo como apontado no tópico 4.10 (figura 28f, 28g e 28h, respectivamente).

No que se refere ao fatores Spi1 e Gata-1 o padrão de expressão gênica se mantém, não sendo expressas diferenças estatisticamente significativas (figura 25j e

28i, respectivamente). Contudo, ao comparar os grupos em relação ao gene Gata-3 foi notória a diferença observada, em que o grupo 6Gy + G-CSF apresenta menor expressão em relação ao controle (figura 28k).

Após as análises de todas as expressões gênicas, comparando os grupos 0Gy (controle) e 6Gy, tanto sem quanto com estímulo de G-CSF, foi possível a elaboração de um *heat map* (figura 29). Este tipo de gráfico auxilia na visualização e interpretação de dados moleculares (RYAN *et al.*, 2020), com isso, fica mais clara toda interpretação já construída nos tópicos 4.10 e 4.13.

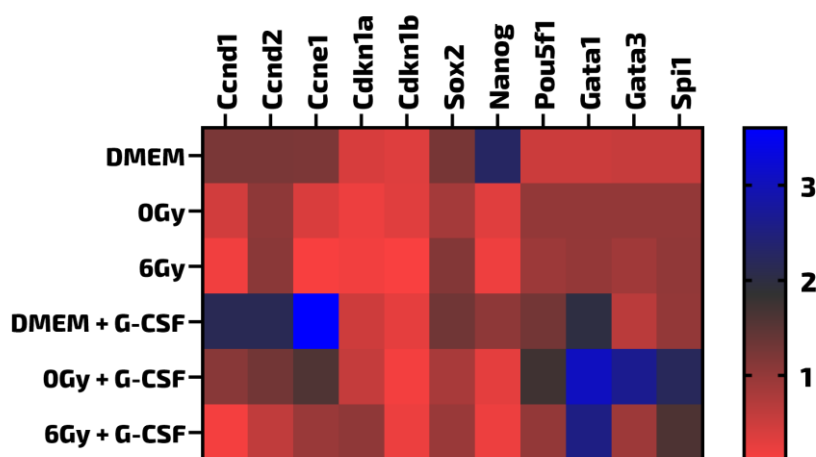


Figura 29 – Heat map elaborado com os dados já apresentados de 4 experimentos independentes (grupos 6Gy e 0Gy sem estímulo) juntamente com os dados dos 4 experimentos independentes dos grupos com G-CSF. Na escala, a cor azul claro representa a maior expressão do determinado gene, enquanto a cor rosa claro é determinante do contrário.

4.14 CTM irradiadas modulam negativamente a diferenciação linfóide das C1498 através do efeito espectador, em culturas com G-CSF

Utilizando das mesmas estratégias de análises descritas na figura 24, tomando como verdadeiro, novamente, a negatividade de Ly6G, F4/80, CD115 e Ly6C, foram realizadas as análises de imunofenotipagem das C1498 nos grupos 0Gy + G-CSF e 6Gy + G-CSF.

A porcentagem de células hematopóéticas positivas para CD11b, Mac-3 e B220, mantiveram-se no padrão dos grupos não estimulados, não apresentando diferenças estatísticas quando comparados os grupos experimentais ($p=0,2757$, $p=0,2831$, $p=0,4145$ e $p=0,1710$, respectivamente) (figura 30a, 30b e 30c). Todavia, a porcentagem de células positivas para CD3 se destacou quando analisado o grupo

6Gy + G-CSF. Foi evidenciada diminuição da diferenciação linfoide no grupo em que há modulação pelo sobrenadante irradiado, quando comparado com o controle biológico ($p=0,0486$), como observado na figura 30d.

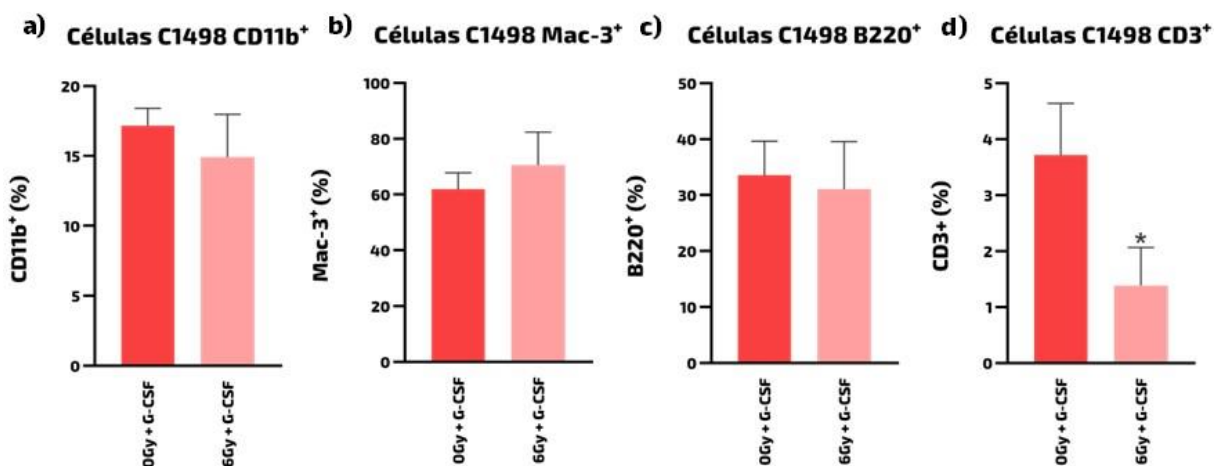


Figura 30 – Expressão de marcadores de superfície associados com a diferenciação celular da C1498 submetida ao sistema de cultura condicionada com os sobrenadantes 6Gy e 0Gy sem estímulo de G-CSF. Os dados são expressos como a média \pm SD de 3 experimentos independentes. (a) % de células CD11b⁺ em relação ao total de células; (b) % de células Mac-3⁺ em relação ao total de células; (c) % de células B220⁺ em relação ao total de células; (d) % de células CD3⁺ em relação ao total de células. Em que * $p < 0,05$.

4. Discussão

A radiação ionizante há tempos tem sido utilizada como uma ferramenta diagnóstica e terapêutica especialmente no tratamento do câncer. Na terapia, o objetivo da radiação é causar um dano irreversível ao DNA levando à célula tumoral à morte por apoptose. Neste contexto, há um grande desafio para a radiobiologia, uma vez que se têm observado um efeito em que as alterações genéticas e bioquímicas não se aplicam restritamente às células diretamente atingidas pela radiação, mas também, às células adjacentes às células-alvo, as quais apresentam alterações similares as células irradiadas, efeito esse chamado de “efeito do espectador” (BASKAR, 2010; MANCINI, 2023; MORAES, 2018; PELLIZZON, 2020).

Dessa forma, a radioterapia (processo terapêutico que se utiliza da radiação ionizante) pode ser empregada no tratamento de pacientes portadores de neoplasias hematológicas. Esse processo radioterápico tem como foco, principalmente, as células malignas da MO (GIORDANI *et al.*, 2004; MANCINI, 2023). Entretanto, na MO o microambiente medular também pode ser afetado, de forma focada ou não, afetando células que compõem esse microambiente, com destaque para as CTM que desempenham papel importante na sustentação da hematopoese e na imunorregulação (SANTOS *et al.*, 2019). Assim, a utilização da radiação não afeta somente as células malignas presentes na MO, bem como o tecido normal também pode ser atingido (BASKAR, 2010).

Tendo isso, este estudo pesquisou sobre o efeito da irradiação nas CTM e se as células viáveis após esse processo teriam alteração na secreção de seus fatores, o que poderia modular células adjacentes, pelo efeito espectador. Como comentado, este efeito se caracteriza pelos danos gerados indiretamente pela radiação nas células adjacentes às células diretamente atingidas (MORAES, 2018; PELLIZZON, 2020). E, os mecanismos completos desses efeitos secundários da radiação ainda são pontos pouco elucidados (YAHYAPOUR *et al.*, 2018).

Com isso, para se iniciar os experimentos, após a realização da cultura de CTM, estas foram submetidas à irradiação com diferentes doses. Doses de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15 e 20Gy foram utilizadas a fim de encontrar a dose ideal que corroborasse com os objetivos deste estudo.

A dose escolhida teve como principal ponto: CTM que sofreram com a radiação e apresentaram danos ao DNA, contudo, suas culturas permaneceram em maioria viáveis. Essas características foram essenciais para se estudar o efeito espectador pela via de liberação de fatores solúveis. E, durante o processo de escolha da dose, foram avaliadas a viabilidade celular, senescência, ciclo celular, expressão de genes associados ao controle do ciclo e a fosforilação de histonas, nas CTM, visto que estes parâmetros sofrem modulação através da radiação ionizante (WU *et al.*, 2017).

Na avaliação de viabilidade após o processo de irradiação, as CTM apresentaram resistência até a dose de 4Gy. A partir da dose de 6Gy a morte celular foi diretamente proporcional ao aumento da dose. A morte celular por apoptose é a mais importante quando se trata da indução por radiação ionizante (CARVALHO; VILLAR, 2018). A partir disso, as doses de 4, 6 e 15Gy foram escolhidas para continuidade das análises. A dose de 4Gy foi escolhida por ser a última dose em que não se apresenta diferença com o controle. Nesta mesma linha de pensamento, a dose de 6Gy foi a segunda dose escolhida por começar a apresentar diferença estatística, entretanto grande parte de suas células ainda permaneceram viáveis. E para a comparação com uma dose mais elevada, foi escolhida a dose de 15Gy. Ademais, a dose de 20Gy não foi escolhida como comparativo de alta dose devido promoção de elevada morte celular, o que tornaria inviável o estudo, visto que foi preciso que células estivessem vivas para produção de fatores solúveis e promoção do efeito espectador.

A senescência e alteração do ciclo celular são outros pontos alterados em uma célula quando esta é exposta à radiação ionizante (SCHMITT *et al.*, 2007). Essas alterações são importantes para parar a proliferação celular caso algum dano não seja reparado e a célula não tenha entrado em apoptose.

Visto isso, as CTM, submetidas a irradiação, apresentaram diferenças na senescência nas doses de 6 e 15Gy em relação ao controle. Hooten e Evans (2017) descreveram que as células em resposta ao estresse e/ou dano celular induzem a parada do ciclo celular de longo prazo, ou seja, indução de senescência, corroborando com os dados encontrados nesta análise. Quando avaliado o ciclo celular, todas as doses escolhidas de 4, 6 e 15Gy apresentaram diferença estatística em relação ao controle, corroborando com a premissa de que as células irradiadas tendem a

estacionar o seu ciclo celular para promover ativação dos mecanismos de reparo do DNA e evitar a proliferação do material genético aberrante. Outros estudos, como de Schneider (2007), mostram que as células expostas à algum tipo de estresse podem regular negativamente o ciclo celular, inibindo as CDKs. Nogueira-Pedro *et al.* (2022) também demonstraram que CTM irradiadas têm alteração no ciclo celular e no processo de senescência ao passo que as doses de radiação são elevadas. Isso atesta os dados encontrados no presente estudo.

Dentro do ciclo celular, os genes Bax e Bcl-2 que têm funções pró-apoptótica e anti-apoptótica, respectivamente (RAMEZANI *et al.*, 2019), foram avaliados nas CTM irradiadas, como também os genes Cdkn1a e Cdkn1b. Foram observadas alterações na expressão de Bax nas doses de 6 e 15Gy, estes dados nesse gene pró-apoptótico vão ao encontro com o descrito nos resultados de viabilidade das CTM após a irradiação, em que há maior processo apoptótico nas células com doses acima de 6Gy. Em adição, quando avaliada a expressão do gene Cdkn1a, que codifica para a proteína p21 reguladora do ciclo celular, foi observada uma *up* regulação, com diferença estatisticamente significativa acima da dose de 6Gy, indicando ser este um ponto importante para a regulação negativa do ciclo celular das CTM irradiadas demonstrada anteriormente. O gene Cdkn1b, que codifica para a proteína p27, outro ponto de regulação do ciclo celular (HALPERIN *et al.*, 2023), quando quantificada sua expressão, não apresentou diferença estatística, bem como o Bcl-2.

O dano no DNA provocado pela irradiação, visto que este ponto foi essencial para a continuidade dos experimentos, foi avaliado através da dosagem de γ -H2AX nas CTM irradiadas (4, 6 e 15Gy). Este, além de ser um marcador precoce de danos ao DNA, promove o recrutamento de mecanismos de reparo e se relacionam à senescência e ciclo celular (HOOTEN; EVANS, 2017; NOGUEIRA-PEDRO, 2022). A análise deste marcador mostrou alterações significativas nas doses de 6 e 15Gy, quando comparadas aos controles, entretanto, sem diferença quando comparadas entre si. Os dados de γ -H2AX suplementam todos os outros já mostrados de ciclo celular e senescência, visto que a fosforilação de histonas é um dano agudo, o qual ativa mecanismos de reparo no DNA, necessitando assim de parada do ciclo celular. Com isso, a parada no ciclo celular, que pode evoluir para senescência, é proporcional à fosforilação de histonas.

Todos esses dados apresentados evidenciam que a CTM é radiobiologicamente resistente até a dose de 4Gy e que começa a apresentar diferenças estatísticas a partir da dose de 6Gy. Com isso, ao passo que se aumenta a dose de radiação ionizante, os marcadores de lesão, alterações no ciclo celular e senescência são evidenciadas. Ou seja, há uma maior resposta ao dano celular, como também descrito em outros estudos (HOOTEN; EVANS, 2017).

Por conseguinte, caracterizadas as alterações nas CTM a partir da exposição à radiação ionizante, foi escolhida a dose de 6Gy para os experimentos relacionados à avaliação do efeito espectador. A escolha desta dose foi baseada por esta promover danos no DNA com menor taxa de apoptose, sendo capaz de continuar viável e produzir fatores que possam atuar como via de ação do efeito espectador (BALDUZZI *et al.*, 2010; HODNY *et al.*, 2010), como já explicado anteriormente.

Como já descrito em outros momentos, a via de liberação de fatores solúveis é a via estudada neste trabalho, com isso, neste estudo foram quantificados: G-CSF, HGF, IL-6, TGF- β e a produção de NO também foi avaliada nas CTM irradiadas (4, 6 e 15Gy). Não foram observadas diferenças significativas na maioria destes produtos dosados. Entretanto, foi destacada a diminuição da produção de IL-6 quando as CTM são irradiadas com 4 e 6Gy.

A família da IL-6 está envolvida na diferenciação, sobrevivência, proliferação e apoptose das células com ela estimulada. Os membros desta família possuem características pró e anti-inflamatórias, e muitos são descritos como componentes importantes no processo de hematopoese. A IL-6 está envolvida na diferenciação e sobrevivência das CTH, bem como na linfopoese (HEINRICH *et al.*, 2003; ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2014). Dado isso, alterações na produção dessa citocina poderiam comprometer o processo de hematopoese. Hipótese testada na continuidade do estudo pelo método de cultura condicionada com células hematopoéticas.

Frente ao exposto, para avaliação do efeito espectador em células hematopoéticas (C1498), foram realizados sistemas de culturas condicionadas, sendo estas estimuladas ou não com G-CSF. Tendo isso, alterações promovidas pelo efeito espectador na capacidade clonogênica foram analisadas neste estudo. Mothersill e Seymour (2006) relatam que o efeito espectador promove, de forma adaptativa,

alterações na proliferação celular. No presente trabalho, quando as células hematopoéticas foram submetidas ao processo de cultura 3D condicionada com os sobrenadantes 0Gy e 6Gy, o número de colônias formadas foi menor quando a cultura era condicionada com sobrenadante 6Gy. Ademais, as colônias de C1498 formadas apresentaram fenótipos diferentes. As do grupo 0Gy se apresentaram de forma mais densa em relação as do grupo 6Gy. Estas análises podem indicar que o efeito espectador promove alteração na proliferação celular, o que fez necessário o prosseguimento com outras metodologias que comprovassem e explicassem tais resultados. Relacionada a cultura 3D, vale ressaltar que o meio de cultura de metilcelulose utilizado era suplementado com G-CSF na fabricação, evidenciando aqui o efeito espectador mediado pelos sobrenadantes condicionantes somados ao estímulo de crescimento. Este fator de estímulo proliferativo foi escolhido por estar relacionado à diferenciação granulocítica. E esta era a vertente direcionada para este estudo, visto que as células C1498 são modelos de LMA, por mais que possam ser diferenciadas em células linfoides.

De modo a integralizar ainda mais os dados de proliferação expostos, foram realizadas análises de citometria de fluxo para viabilidade e ciclo celular das C1498. Neste contexto, o efeito espectador promoveu alteração na viabilidade das C1498 tanto em um ambiente não estimulado com G-CSF, quanto estimulado. Para realização desta análise, a forma interpretativa se deu sobre 3 vertentes: células viáveis; células em necrose e células em apoptose. Foi escolhido diferenciar os tipos de morte celular visto que no processo apoptótico as células recebem um estímulo para iniciá-lo, sendo este um dano ao DNA ou a proteínas reguladoras importantes, sem ativação do sistema imunológico, com a participação de processos bioquímicos dependentes de enzimas. Em contrapartida, no processo necrótico, as células sofrem com danos principalmente à membrana celular, o que a leva a morte e destruição com liberação do seu conteúdo citoplasmático, ativando vias do sistema imune (D'ARCY, 2019). Nesta avaliação, o grupo 6Gy não estimulado não apresentou aumento das células em apoptose quando comparado com o controle biológico (Grupo 0Gy). E, da mesma maneira, a morte por apoptose se tornou evidente, demonstrando diferenças significativas entre o grupo 0Gy + G-CSF e 6Gy + G-CSF, em que o segundo apresenta maior porcentagem de células neste tipo de morte. Os dados de necrose não se fizeram interessantes uma vez que se mantêm com a mesma taxa de

proporção em todos os grupos analisados. Quando comparadas as mortes, percebe-se que a diferença entre os grupos somente na morte por apoptose demonstra o efeito espectador agindo de modo a controlar os processos bioquímicos, enzimáticos e de controle gênico das células hematopoéticas C1498.

Acerca do ciclo celular, de modo esperado, os sobrenadantes condicionantes promoveram diminuição da ciclagem das células hematopoéticas. Ao analisar os grupos não estimulados, 0 e 6Gy não apresentaram diminuição das células em S/G2/M, quando comparados entre si. Outrora, ao ser adicionado estímulo para proliferação (G-CSF), as CTM irradiadas com a dose de 6Gy promoveram maior parada do ciclo celular das células C1498, do que as CTM não irradiadas, com diferença estatisticamente significativa. Deste modo, corroborando com os dados de proliferação e formação de colônias acima descritos, se fez válida a observação de que, quando é induzida a proliferação (por G-CSF), os fatores solúveis produzidos pelas CTM irradiadas reduzem a capacidade proliferativa e de ciclagem de células hematopoéticas.

Dentre estes fatores solúveis, como já descrito nesta discussão, a IL-6 torna-se ponto importante de interpretação visto todas suas funções já esclarecidas. A sinalização da família de IL-6 para diferenciação, e principalmente a proliferação, se dá por ativação das vias de JAK-STAT e MAPK (HEINRICH *et al.*, 2003). Por conseguinte, a menor produção e liberação de IL-6 pelas CTM irradiadas (com dose de 6Gy) pode ser considerado ponto relevante nas alterações de proliferação das células C1498 discutidas neste estudo.

A avaliação de possíveis alterações na modulação gênica nas C1498 promovidas pelo efeito espectador foi outra vertente analisada neste trabalho. Relacionada à genes associados ao controle do ciclo celular e proliferação, tendo em vista todo o exposto, a avaliação teve por objetivo elucidar se as alterações encontradas na proliferação e ciclo celular foram moduladas à nível transcricional. Em seguimento, foram observadas diferenças mais significativas quando o sistema de cultura condicionada (grupos 0Gy e 6Gy) estava sendo exposto ao estímulo com G-CSF. A diferença estatística observada se deu no gene *Ccnd1* (Grupo 6Gy + G-CSF) em relação ao grupo 0Gy + G-CSF. Este gene codifica para ciclina D1, que é um importante regulador do ciclo celular, fazendo parte do *checkpoint* da fase G1 para

fase S. (MATELLÁN; MONJE-CASAS, 2020). Com isso, a diminuição da expressão desse gene resultou em diminuição de células que conseguiram progredir no ciclo celular (passar da fase G1 para a fase S), corroborando com a diminuição das células C1498 nas fases S/G2/M quando estimuladas com G-CSF, em ambiente espectador. Contudo, não apenas o gene *Ccnd1* pode ser considerado para tal alteração. A *down* regulação gênica de *Ccnd2* e *Ccne1* no grupo 6Gy + G-CSF, e discreto aumento de *Cdkn1a* e *Cdkn1b*, por mais que não se deram de forma estatisticamente significativa, podem ser descritos como auxiliares do processo de diminuição da ciclagem das células hematopoéticas (C1498), juntamente com a alteração em *Ccnd1*. De modo a ser interpretado que o efeito espectador frente a regulação gênica altera, segundo o presente estudo, a expressão gênica da ciclina D1.

Outras pesquisas descrevem a importância do efeito espectador promovido pela radiação frente à hematopoese, principalmente em relação as CTH (HU *et al.*, 2021; SHEN *et al.*, 2012). Contudo, estes estudos não caracterizam somente uma célula presente no microambiente como principal desencadeadora deste efeito. Nestas pesquisas, camundongos são irradiados e submetidos ao TMO, tendo todo microambiente medular atuando como fonte do efeito espectador, e as células hematopoéticas espectadoras sendo as CTH transplantadas. Entretanto, as modulações nas células hematopoéticas descritas nestes trabalhos vão ao encontro dos efeitos caracterizados no presente estudo.

Os trabalhos de HU *et al.* (2021) se embasaram na caracterização do denominado efeito espectador promovido pela radiação em células hematopoéticas CD34⁺ purificadas do cordão umbilical humano, sendo a primeira pesquisa atual a se aprofundar sobre esta temática em células hematopoéticas humanas transplantadas. Enquanto o estudo de Shen *et al.* (2012) avalia o efeito espectador promovido pela radiação em CTH de camundongos F1 (CD45.1⁺/CD45.2⁺) adquiridos do *The Jackson Laboratory ou Taconic Farms*. Contudo, ambos estudos denotam a importância de se aprofundar na temática efeito espectador promovido pela radiação, principalmente em âmbito de TMO com regime de condicionamento contendo irradiação de corpo total (TBI - *Total Body Irradiation*). Em ambos os artigos há uma modulação negativa de diversos processos da produção sanguínea promovido pelo efeito espectador, o que demonstra a importância de um maior número de pesquisas com qualidade sobre esse tema. Em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa de Hu *et al.*,

também foi demonstrada diminuição na capacidade de restabelecimento da hematopoese, repovoamento de células hematopoéticas de camundongos transplantadas em modelos irradiados, demonstrando modulação negativa pelo efeito espectador. No contexto geral, este efeito promove redução da reconstituição medular pelas células hematopoéticas a longo prazo, bem como a diminuição da capacidade de formação de colônias de células progenitoras hematopoéticas humanas e de camundongos.

Em relação à capacidade clonogênica das células hematopoéticas humanas, o estudo de Hu *et al.* (2021) demonstra que o processo clonal das células hematopoéticas transplantadas nos camundongos, foi diferente nos camundongos irradiados em comparação aos controle. Foi descrito que nos animais irradiados, 1 em cada 2979 células iniciaram o processo clonal, enquanto nos animais controle, 1 em cada 1416 células. De modo a caracterizar com mais propriedade esta alteração na capacidade clonogênica, o estudo demonstra que o efeito espectador promove aumento da apoptose destas células, o que resulta em um enxerto prejudicado à longo prazo.

No que se refere à diferenciação celular, contudo, ainda dentro do contexto de expressão gênica, o gene Gata-3 também apresentou diferença estatística quando a cultura condicionada era submetida ao estímulo com G-CSF. Este gene se apresentou menos expresso no grupo 6Gy + G-CSF quando comparado com o controle biológico. Este gene é pertencente à família GATA de fatores de transcrição e está associado principalmente a diferenciação de células T (AKGUL *et al.*, 2022). Wan (2014) descreve que, de acordo com alguns estudos, a ativação do gene Gata-3 está associada ao desenvolvimento de linfócitos T, bem como à maturação e função destas células. Embora esta sinalização ainda seja pouco compreendida, há pesquisas que descrevem que a ativação de Gata-3 interfira na sinalização Notch, de grande importância para o desenvolvimento destes linfócitos (RADTKE; MACDONALD; TACCHINI-COTTIER, 2013; WAN, 2014). Frente ao exposto, se fez possível a interpretação de que as células hematopoéticas submetidas ao efeito espectador promovido pela radiação, em ambiente estimulado, teria menor regulação do desenvolvimento para células linfoides. Para tal confirmação, a realização do painel de imunofenotipagem foi de suma importância.

A menor expressão de Gata-3 como direcionamento para a imunofenotipagem, muda a visão primária desta pesquisa. Como pormenorizado anteriormente, era esperado que as células C1498 sofressem alterações relacionadas ao perfil granulocítico. Entretanto, a regulação negativa de Gata-3 trilhou outra vertente para continuidade dos experimentos. Neste contexto, o painel de diferenciação visava identificar se realmente haveria menor diferenciação linfoide das células hematopoéticas.

A expressão dos marcadores de superfície Ly6G, F4/80, CD115 e Ly6C nas células C1498 foi negativa, sendo utilizados apenas os marcadores CD11b, Mac-3, B220 e CD3 para a interpretação da diferenciação celular. CD11b se relaciona com a marcação de células granulocíticas (SCHMID *et al.*, 2018); Mac-3 está associado ao processo monocítico (JUNG *et al.*, 2017); B220 está relacionado às células B (LEE *et al.*, 2021) e, quando avaliada a porcentagem de células positivas para estes marcadores, de forma individual, em todos os grupos experimentais, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas, demonstrando que o efeito espectador promovido pelas CTM irradiadas não modula a diferenciação em: granulócitos, monócitos e linfócitos B. Todavia, como esperado pela alterações em Gata-3, a porcentagem de células CD3⁺ foi alterada pelo efeito espectador.

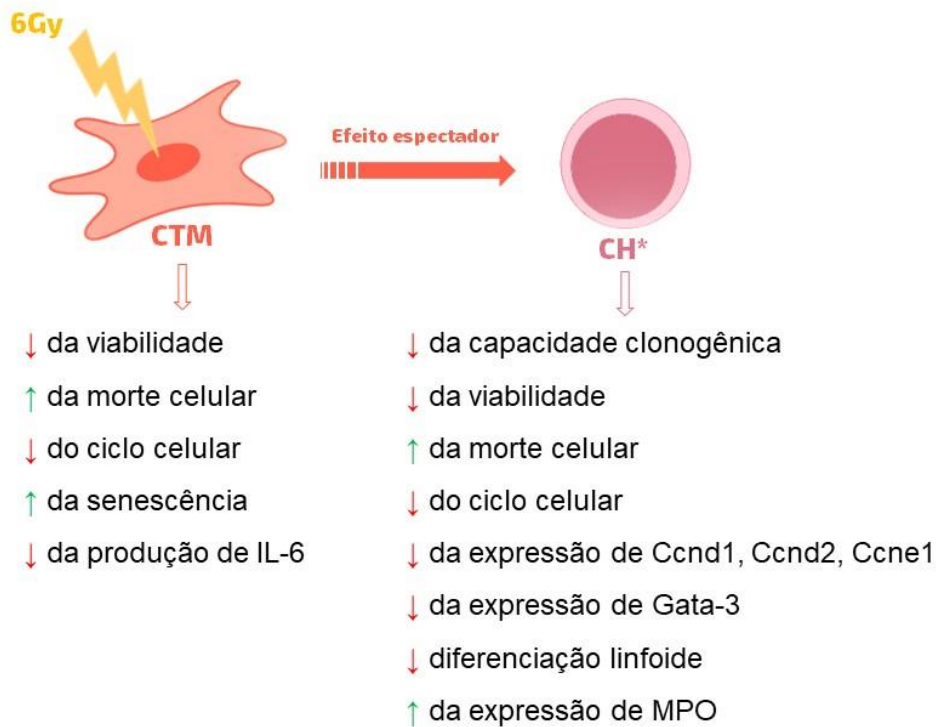
O *cluster of differentiation 3*, denominado também como CD3, é um marcador de superfície utilizado para diferenciar os linfócitos do tipo T. Ao expressar na membrana CD3, a célula pode ser considerada linfócito T (Linf T), podendo ser Linf TCD4 ou Linf TCD8 (NATALINI *et al.*, 2021). Tendo isso, ao realizar a marcação das células C1498 que estavam em cultura condicionada, foi observada diminuição estatisticamente significativa da diferenciação linfoide nestas células no grupo 6Gy + G-CSF quando comparadas com o controle biológico. Entretanto, esta diferença não foi observada quando as culturas não apresentavam estímulo de proliferação. Associado ao resultado de *down* regulação de Gata-3, este resultado evidencia, de forma clara, que as CTM irradiadas com dose de 6Gy são capazes de diminuir a diferenciação de células hematopoéticas na linhagem linfoide.

De modo a caracterizar a menor expressão de Gata-3 que, por conseguinte, acarreta alterações na diferenciação linfoide, a IL-6 pode ter grande papel. Como descrito anteriormente, além da menor produção desta citocina pelas CTM irradiadas

poder estar relacionada a diminuição de proliferação e ciclo celular, seu papel pode ter grande influência, também, na diferenciação linfóide, visto que a IL-6 é uma grande reguladora da linfopoese.

Como processo de caracterização celular, a marcação de MPO se torna de grande importância visto que esta enzima está presente somente nos granulócitos, bem como seus precursores e progenitores (JESUS *et al.*, 2022). Neste âmbito, quando realizadas as medidas de absorvância das amostras de cultura 3D frente a produção de MPO, em relação ao MTT, diferenças estatísticas foram dignas de nota. A cultura celular, de forma completa, apresentou maior produção de MPO no Grupo 6Gy. Vale ressaltar que o aumento de MPO em cultura 3D não significa um aumento de diferenciação granulocítica, uma vez que não foi caracterizado este perfil nesta cultura celular, podendo representar apenas um aumento de produção desta enzima pelas células hematopoéticas frente ao efeito espectador.

De forma breve, os dados apresentados nesse trabalho indicam que há, verdadeiramente, alterações nas C1498 desencadeadas pelo efeito espectador promovido pelas CTM irradiadas com dose de 6Gy (figura 31), comprovadas por diferentes metodologias que se complementam entre si. Contudo, o presente trabalho não só caracteriza alguns efeitos, como também abre alternativas para novas pesquisas frente à esta temática. Foram demonstradas alterações na hematopoese promovidas pelo efeito espectador somente quando havia estímulo proliferativo. Estes resultados podem indicar que as células hematopoéticas, em um ambiente que tenham modulação por CTM irradiadas, quando requisitadas para proliferar e se diferenciar, teriam comprometimento de seu metabolismo.



*em ambiente estimulado com G-CSF

Figura 31 – Resumo gráfico dos principais resultados obtidos neste trabalho. Quando as CTM (células-tronco mesenquimais) são irradiadas com dose de 6Gy, apresentam diminuição da viabilidade, por conseguinte, aumento da morte celular; diminuição da ciclagem; aumento da senescência e diminuição da produção de interleucina 6. Estas CTM irradiadas modulam negativamente, através do efeito espectador (em ambiente estimulado), as CH (células hematopoéticas), as quais apresentam as seguintes alterações: diminuição da capacidade clonogênica; diminuição da viabilidade e aumento da morte celular; diminuição da expressão; diminuição da diferenciação linfóide; aumento da produção de MPO em cultura 3D.

Embora o presente estudo tenha caracterizado diversos efeitos espectadores provocados pelas CTM irradiadas em células hematopoéticas, algumas limitações são evidentes. Uma limitação metodológica que pode ser caracterizada neste trabalho é o tipo celular hematopoético utilizado como ferramenta de representação da célula hematopoética: C1498. Como pormenorizado no material e métodos, esta é célula uma imortalizada, originada de um tecido neoplásico de LMA que pode apresentar tanto um fenótipo mieloide quanto linfóide, em que as características fenotípicas não representam de modo completo uma célula-tronco/progenitora hematopoética saudável. Todavia, esta limitação foi contornada por se conhecer suas alterações e padrões, favorecendo o processo de escolha das metodologias para analisá-las, tornando fidedignos todos os resultados obtidos frente a sua utilização. Muitos estudos foram utilizados no decorrer desta discussão como forma de comparação de resultados, contudo, como já descrito, estes trazem o efeito espectador promovido pela radiação em ambiente medular completo, não apenas caracterizando o papel das

células-tronco mesenquimais. Este tipo de limitação pode ser interpretado de duas vertentes, a primeira, dificultando o processo de discussão dos resultados, e a segunda como ponto positivo na importância de realizar o presente trabalho, visto que não há muitas pesquisas nesta área.

O aprofundamento da literatura em compreender os processos regulatórios da CTM tanto na hematopoese quanto na imunorregulação, vem se tornando cada vez mais necessário, visto que esta célula está presente em diversos tecidos e, uma vez alterada, pode comprometer diversos processos fisiológicos.

5. Conclusão

As CTM são radiobiologicamente resistentes até a dose de 4Gy, apresentando alterações significativas somente acima de doses de 6Gy. Com isso, CTM irradiadas com 6Gy, todavia, viáveis, promovem a modulação de células hematopoéticas, de forma indireta, denominado efeito espectador. Este efeito nas células de linhagem hematopoética demonstraram ser capazes de modular a capacidade clonogênica, bem como promover alterações gênicas em *Ccnd1* e *Gata-3*, alterando o ciclo celular, diferenciação linfóide e produção de MPO destas células. Alterações estas obtidas somente em ambiente em que o efeito espectador age juntamente ao estímulo proliferativo.

Referências

AKASHI, K.; *et al.* Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 64, p. 1-12, 1999. ISSN 0091-7451 (Print) 0091-7451 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11232274>

AKGUL, Mahmut *et al.* GATA3 expression in clear cell adenocarcinoma of the lower urinary tract: a potential diagnostic pitfall. **Diagnostic Pathology**, [S.L.], v. 17, n. 1, 1 nov. 2022. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s13000-022-01269-6>.

ANJOS, Adriana R. dos; ALVARES-SILVA, Márcio; BORELLI, Primavera. Matriz Extracelular e Leucemia. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 22, n. 3, p. 404-412, dez. 2000. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842000000300007>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/j3fbdzBcSRtYgRPTVn3jLxC/?lang=pt>. Acesso em: 13 fev. 2022.

BALDUZZI, M., O. Sabora, *et al.* (2010). "Modulation of the bystander effects induced by soluble factors in HaCaT cells by different exposure strategies." **Radiat Res** **173**(6): 779-88.

BASKAR, R. (2010). "Emerging role of radiation induced bystander effects: Cell communications and carcinogenesis." **Genome Integr** **1**(1): 13.

BASTIDA, José *et al.* A Novel GATA1 Variant in the C-Terminal Zinc Finger Compared with the Platelet Phenotype of Patients with A Likely Pathogenic Variant in the N-Terminal Zinc Finger. **Cells**, [S.L.], v. 11, n. 20, p. 3223, 14 out. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11203223>.

BENADIBA, Marcel. **Análise da expressão de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, apoptose, angiogênese, invasão e migração de células C6 in vitro e in vivo após tratamento com ácido-gama-linolênico (GLA) e com um novo complexo dirutênico contendo ibuprofeno (Ru-lbp)**. 2008. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Instituto de Ciências Biomédicas, Biologia Celular e Tecidual, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

BERTANHA, Matheus. Perspectivas de uso de células-tronco em cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, [S.L.], v. 15, n. 3, p. 173-175, set. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1677-5449.006516>

BRAGA, Karla Márcia da Silva *et al.* CITOMETRIA DE FLUXO: histórico, princípios básicos e aplicações em pesquisa. **Enciclopédia Biosfera**, [S.L.], v. 13, n. 23, p. 304-319, 22 jun. 2016. Centro Científico Conhecer. http://dx.doi.org/10.18677/enciclopedia_biosfera_2016_027.

BRYDER, D.; ROSSI, D. J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. **Am J Pathol**, v. 169, n. 2, p. 338-46, Aug 2006. ISSN 0002-9440 (Print) 0002-9440 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16877336>

CARVALHO, Ana Carolina Souza Ramos de. **Estudo da proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoéticas provenientes de sangue de cordão umbilical na presença e ausência de mitógenos**. 2008. 86 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Biotecnologia, Universidade de São Paulo, Instituto Butantã, Ipt, São Paulo, 2008.

CARVALHO, Heloisa de Andrade; VILLAR, Rosangela Correa. Radiotherapy and immune response: the systemic effects of a local treatment. **Clinics**, [S.L.], v. 73, 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.6061/clinics/2018/e557s>.

CARVALHO, Ismar de Souza; POLIVANOV, Helena; FERNANDES, Antonio Carlos Sequeira. A utilização do ácido periódico de Schiff (PAS) na definição de estruturas sedimentares biogênicas do terciário Brasileiro. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S.L.], v. 60, n. 2, p. 203-204, abr. 1988.

CHIPMAN, J. K., A. Mally, *et al.* (2003). "Disruption of gap junctions in toxicity and carcinogenicity." **Toxicol Sci** **71**(2): 146-53

CHOTINANTAKUL, Kamonnaree; LEEANANSAKSIRI, Wilairat. Hematopoietic Stem Cell Development, Niches, and Signaling Pathways. **Bone Marrow Research**, [S.L.], v. 2012, p. 1-16, 30 jul. 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/270425>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmr/2012/270425/>. Acesso em: 13 fev. 2022.

D'ARCY, Mark s. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biology International**, [S.L.], v. 43, n. 6, p. 582-592, 25 abr. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cbin.11137>.

DEANS, R. J.; MOSELEY, A. B. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. **Exp Hematol**, v. 28, n. 8, p. 875-84, Aug 2000. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10989188> >

DELOCH, Lisa *et al.* Modern Radiotherapy Concepts and the Impact of Radiation on Immune Activation. **Frontiers In Oncology**, [S.L.], v. 6, p. 0-0, 20 jun. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2016.00141>.

FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, v. 4, n. 5, p. 267-74, Sep 1976. ISSN 0301-472X (Print) 0301-472X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/976387> >.

GIORDANI, Adelmo José *et al.* Verificação das doses de radiação absorvidas durante a técnica de irradiação de corpo inteiro nos transplantes de medula óssea, por meio de dosímetros termoluminescentes. **Radiologia Brasileira**, [S.L.], v. 37, n. 5, p. 343-349, out. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-39842004000500008>.

GRUBBÉ, E. H., "Who was the First to Make Use of the Therapeutic Qualities of the X-Ray?", *Radiological Review* XXII (1933)184-187.

HALL, Eric J.. THE BYSTANDER EFFECT. **Health Physics**, [S.L.], v. 85, n. 1, p. 31-35, jul. 2003. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00004032-200307000-00008>.

HALPERIN, Reut *et al.* Germline CDKN1B variant type and site are associated with phenotype in MEN4. **Endocrine-Related Cancer**, [S.L.], v. 30, n. 1, 1 jan. 2023. Bioscientifica. <http://dx.doi.org/10.1530/erc-22-0174>.

HARADA, K., T. Nonaka, *et al.* (2009). "Heavy-ion-induced bystander killing of human lung cancer cells: role of gap junctional intercellular communication." **Cancer Sci** **100**(4): 684-8.

HEINRICH, Peter C. *et al.* Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemical Journal**, [S.L.], v. 374, n. 1, p. 1-20, 15 ago. 2003. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20030407>.

HOCKING, A. M.; GIBRAN, N. S. Mesenchymal stem cells: paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. **Exp Cell Res**, v. 316, n. 14, p. 2213-9, Aug 15 2010. ISSN 1090-2422 (Electronic) 0014-4827 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20471978>

HODNY, Z., S. Hubackova, *et al.* (2010). "Cytokines shape chemotherapy-induced and 'bystander' senescence." *Aging (Albany NY)* **2**(7): 375-6

HU, Linping *et al.* Radiation-induced bystander effects impair transplanted human hematopoietic stem cells via oxidative DNA damage. **Blood**, [S.L.], v. 137, n. 24, p. 3339-3350, 17 jun. 2021. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood.2020007362>

JESUS, Rômulo Pereira de *et al.* Myeloperoxidase Inhibitors as Anti-Inflammatory Drug Candidates. **Revista Virtual de Química**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 669-682, 2022. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220022>.

JUNG, Mira *et al.* IL-10 improves cardiac remodeling after myocardial infarction by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. **Basic Research In Cardiology**, [S.L.], v. 112, n. 3, 24 abr. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00395-017-0622-5>.

KASSEM, M.; ABDALLAH, B. M. Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. **Cell Tissue Res**, v. 331, n. 1, p. 157-63, Jan 2008. ISSN 1432-0878 (Electronic) 0302-766X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17896115> >.

KONDO, M.; WEISSMAN, I. L.; AKASHI, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. **Cell**, v. 91, n. 5, p. 661-72, Nov 28 1997. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9393859>

LABELLE, James L.; TRUITT, Robert L.. Characterization of a Murine NKT Cell Tumor Previously Described as an Acute Myelogenous Leukemia. **Leukemia & Lymphoma**, [S.L.], v. 43, n. 8, p. 1637-1644, jan. 2002. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/1042819021000002974>.

LEE, Wei *et al.* Resident vs nonresident multipotent mesenchymal stromal cell interactions with B lymphocytes result in disparate outcomes. **Stem Cells Translational Medicine**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 711-724, 28 jan. 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1002/sctm.20-0289>.

LI, J., M. He, *et al.* (2013). "Alpha particle-induced bystander effect is mediated by ROS via a p53-dependent SCO2 pathway in hepatoma cells." *Int J Radiat Biol.*

LIMA, Caroline Rocha de Oliveira. **CLASSIFICAÇÃO MORFOLÓGICA, CRITÉRIOS DE MALIGNIDADE, EXPRESSÃO GÊNICA DE C-MYC E IMUNOISTOQUÍMICA DE C-MYC, p53, p21 E p27 NO TUMOR VENÉREO TRANSMISSÍVEL CANINO**. 2013. 125 f. Tese (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

LIU, Zhao-Jun; ZHUGE, Ying; VELAZQUEZ, Omaidia C.. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. **Journal Of Cellular Biochemistry**, [S.L.], v. 106, n. 6, p. 984-991, 15 abr. 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.22091>.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

MANCINI, Natália. **Quando usar radioterapia para leucemia**. 2023. Disponível em: <https://revista.abrale.org.br/quando-usar-radioterapia-para-leucemia/>. Acesso em: 10 mar. 2023.

MARTA, Gustavo Nader. Radiobiologia: princípios básicos aplicados à prática clínica. **Diagn Tratamento**, [s. l], v. 19, n. 1, p. 45-47, Não é um mês valido! 2014. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/1413-9979/2014/v19n1/a3970.pdf>. Acesso em: 02 mar. 2022.

MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, Lina María; VERGARA-YANEZ, Daniela; HERRERA-ALMANZA, Laura. Células madre mesenquimatosas y sus diferentes usos. **Ciencia y**

Salud, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 45-55, 14 jun. 2021. Instituto Tecnológico de Santo Domingo (INTEC). <http://dx.doi.org/10.22206/cysa.2021.v5i2.pp45-55>.

MATELLÁN, Laura; MONJE-CASAS, Fernando. Regulation of Mitotic Exit by Cell Cycle Checkpoints: lessons from *saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 195, 12 fev. 2020. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/genes11020195>.

MAY, B.; WANG, J.. **POU5F1 (OCT4), SOX2, NANOG repress genes related to differentiation**. 2023. Disponível em: <https://reactome.org/content/detail/R-HSA-2892245>.

MAYANI, H.; GUILBERT, L. J.; JANOWSKA-WIECZOREK, A. Biology of the hemopoietic microenvironment. **Eur J Haematol**, v. 49, n. 5, p. 225-33, Nov 1992. ISSN 0902-4441 (Print) 0902-4441 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1473584>

MEIRELLES, Lindolfo da Silva; CAPLAN, Arnold I.; NARDI, Nance Beyer. In Search of the In Vivo Identity of Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, [S.L.], v. 26, n. 9, p. 2287-2299, 19 jun. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2007-1122>.

METCALF, D. The 1993 Burnet Lecture. The colony stimulating factors--discovery to clinical use. **Australas Biotechnol**, v. 4, n. 6, p. 337-40, Nov-Dec 1994. ISSN 1036-7128 (Print) 1036-7128 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7765828>

MONTEIRO, Betânia Souza; ARGOLO NETO, Napoleão Martins; CARLO, Ricardo Junqueira del. Células-tronco mesenquimais. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 238-245, fev. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782010000100040>.

MOPIN, Alexia; DRISS, Virginie; BRINSTER, Carine. A Detailed Protocol for Characterizing the Murine C1498 Cell Line and its Associated Leukemia Mouse Model. **Journal Of Visualized Experiments**, [S.L.], n. 116, 14 out. 2016. MyJove Corporation. <http://dx.doi.org/10.3791/54270>.

MORAES, Matheus Coelho. **EFEITOS DAS RADIAÇÕES ELETROMAGNÉTICAS EM CÉLULAS T: DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS VIAS ASSOCIADAS AO**

MECANISMO DE MANUTENÇÃO DO GENOMA. 2018. 56 f. TCC (Doutorado) - Curso de Física, Instituto de Matemática Estatística e Física, Rio Grande, 20018.

MOREIRA, Fabiana Leandro *et al.* Avaliação dos aspectos citológicos e laboratoriais da leucemia linfóide aguda. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 1-8, 20 maio 2021. Revista Eletronica Acervo Saude. <http://dx.doi.org/10.25248/reas.e7171.2021>.

MOTHERSILL, C. and C. B. SEYMOUR (2004). "Radiation-induced bystander effects-implications for cancer." *Nat Rev Cancer* **4**(2): 158-64.

MOTHERSILL, Carmel; SEYMOUR, Colin. Radiation-Induced Bystander Effects: evidence for an adaptive response to low dose exposures?. **Dose-Response**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 283-290, 1 out. 2006. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.2203/dose-response.06-111.mothersill>.

MOTHERSILL, Carmel; SEYMOUR, Rebecca J.; SEYMOUR, C. B.. Bystander Effects in Repair-Deficient Cell Lines. **Radiation Research**, [S.L.], v. 161, n. 3, p. 256-263, mar. 2004. Radiation Research Society. <http://dx.doi.org/10.1667/rr3136>.

NAJAFI, M *et al.* The Mechanisms of Radiation-Induced Bystander Effect. **Journal Biomedical Physics & Engineering**, [s. l.], v. 4, n. 4, p. 163-172, dez. 2014.

NATALINI, Ambra *et al.* OMIP-079: cell cycle of cd4+ and cd8+ naïve/memory t cell subsets, and of treg cells from mouse spleen. **Cytometry Part A**, [S.L.], v. 99, n. 12, p. 1171-1175, 19 out. 2021. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.24509>.

NELSON, G., J. WORDSWORTH, *et al.* (2012). "A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence." *Aging Cell* **11**(2): 345-9.

NELSON, G., J. WORDSWORTH, *et al.* (2012). "A senescent cell bystander effect: senescence-induced senescence." *Aging Cell* **11**(2): 345-9.

NOGUEIRA-PEDRO, Amanda *et al.* Direct ionizing radiation and bystander effect in mouse mesenchymal stem cells. **International Journal Of Radiation Biology**, [S.L.], v. 98, n. 11, p. 1619-1629, 22 abr. 2022. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/09553002.2022.2063960>.

ORKIN, Stuart H.; ZON, Leonard I.. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. **Cell**, [S.L.], v. 132, n. 4, p. 631-644, fev. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025>.

PELLIZZON, Antonio Cassio Assis. Lattice radiation therapy – its concept and impact in the immunomodulation cancer treatment era. **Revista da Associação Médica Brasileira**, [S.L.], v. 66, n. 6, p. 728-731, jun. 2020. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.66.6.728>.

PEREIRA, Lygia da Veiga. A importância do uso das células tronco para a saúde pública. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 07-14, fev. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-81232008000100002>

PRÄBST, K. *et al.* (2017). Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. In: Gilbert, D., Friedrich, O. (eds) **Cell Viability Assays**. Methods in Molecular Biology, vol 1601. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_1

PRADO, Caroline Aliane de Souza. **Alterações sistêmicas na assinatura do ciclo celular de pacientes com COVID-19**. 2022. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Fisiopatologia e Toxicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

QIAN, Yu *et al.* Hypermethylation of Cyclin D2 Predicts Poor Prognosis of Hepatitis B Virus-Associated Hepatocellular Carcinoma after Hepatectomy. **The Tohoku Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 254, n. 3, p. 233-243, 2021. Tohoku University Medical Press. <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.254.233>. AKASHI, K.; *et al.* Lymphoid development from stem cells and the common lymphocyte progenitors. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 64, p. 1-12, 1999. ISSN 0091-7451 (Print) 0091-7451 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11232274>

QUESENBERRY, P. J.; DOONER, G.; DOONER, M.; COLVIN, G. The stem cell continuum: considerations on the heterogeneity and plasticity of marrow stem cells. **Stem Cell Rev**, v. 1, n. 1, p. 29-36, 2005. ISSN 1550-8943 (Print) 1550-8943 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17132872>

RADTKE, Freddy; MACDONALD, H. Robson; TACCHINI-COTTIER, Fabienne. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. **Nature Reviews Immunology**,

[S.L.], v. 13, n. 6, p. 427-437, 13 maio 2013. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3445>.

RAMEZANI N, *et al.* **Evaluation of Bcl-2 and Bax Expression in the Heart of Diabetic Rats after Four Weeks of High Intensity Interval Training.** 2019; 13 (1) :15-20 doi:10.29252/mlj.13.1.15

Resolução CNEN 114/2011 (Alteração do item 5.4.2.1) Publicação D.O.U. em 01.09.2011. Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica.

RIOS, M.; WILLIAMS, D. A. Systematic analysis of the ability of stromal cell lines derived from different murine adult tissues to support maintenance of hematopoietic stem cells in vitro. **J Cell Physiol**, v. 145, n. 3, p. 434-43, Dec 1990. ISSN 0021-9541 (Print)

RODRÍGUEZ-GÓMEZ, Alfredo de Jesús; FRIAS-VÁZQUEZ, Sara. Mitosis and its regulation. **Acta Pediátrica de México**, [s. l.], v. 1, n. 35, p. 55-68, jul. 2014.

ROSENFELD, G. Corante pancreático para hematologia e citologia clínica: nova combinação dos componentes de May-Grunwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 329-335, 1947.

RYAN, Michael C. *et al.* Interactive Clustered Heat Map Builder: an easy web-based tool for creating sophisticated clustered heat maps. **F1000Research**, [S.L.], v. 8, p. 1750, 19 mar. 2020. F1000 Research Ltd. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.20590.2>.

RYBAK, Paulina *et al.* Low level phosphorylation of histone H2AX on serine 139 (γH2AX) is not associated with DNA double-strand breaks. **Oncotarget**, [S.L.], v. 7, n. 31, p. 49574-49587, 6 jul. 2016. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.10411>.

SAMBROOK, Joseph. Capítulo 7 Extração, purificação e análise de mRNA de células eucariótica. In: SAMBROOK, Joseph; RUSSELL, David W. *Clonagem molecular: um manual de laboratório*. 3. ed. New York, 2001.

SANTOS, Guilherme Galvão dos *et al.* The influence of protein malnutrition on biological and immunomodulatory aspects of bone marrow mesenchymal stem

cells. **Clinical Nutrition**, [S.L.], v. 36, n. 4, p. 1149-1157, ago. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.clnu.2016.08.005>.

SANTOS, Mirella Meireles Ferreira dos *et al.* LEUCEMIA MIELOIDE, AGUDA E CRÔNICA: DIAGNÓSTICOS E POSSÍVEIS TRATAMENTOS. **Revista Saúde em Foco**, n. 11, p. 279-294, 2019.

SCHMID, Michael C. *et al.* Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. **Nature Communications**, [S.L.], v. 9, n. 1, 19 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-07387-4>.

SCHMITT, Estelle *et al.* DNA-damage response network at the crossroads of cell-cycle checkpoints, cellular senescence and apoptosis. **Journal Of Zhejiang University Science B**, [S.L.], v. 8, n. 6, p. 377-397, maio 2007. Zhejiang University Press. <http://dx.doi.org/10.1631/jzus.2007.b0377>.

SCHNEIDER, Lolita. **EXPRESSÃO GÊNICA E PROTÉICA DE p53 E p21 EM FIBROADENOMA E TECIDO MAMÁRIO NORMAL ADJACENTE**. 2007. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Fisiologia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Ufrgs, Porto Alegre, 2007.

SCHOFIELD, C.; ASHWORTH, A. Why have mortality rates for severe malnutrition remained so high? **Bull World Health Organ**, v. 74, n. 2, p. 223-9, 1996. ISSN 0042-9686 (Print) 0042-9686 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8706239>

SEMENOVA, Ekaterina A. *et al.* Genome-Wide Association Study Identifies CDKN1A as a Novel Locus Associated with Muscle Fiber Composition. **Cells**, [S.L.], v. 11, n. 23, p. 3910, 2 dez. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/cells11233910>.

SHEN, H., H. Yu, *et al.* (2012). "An acute negative bystander effect of gamma-irradiated recipients on transplanted hematopoietic stem cells." **Blood** **119**(15): 3629-37.

SHEN, Hongmei *et al.* An acute negative bystander effect of γ -irradiated recipients on transplanted hematopoietic stem cells. **Blood**, [S.L.], v. 119, n. 15, p. 3629-3637, 12

abr. 2012. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-08-373621>.

SILVA, Júnior José da. **Modelagem Computacional Aplicada ao Tratamento de Câncer Via Medicina Nuclear**. 2014. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Modelagem Computacional em Ciência e Tecnologia, Universidade Federal Fluminense, Volta Redonda, 2014.

SOARES, Letícia Lorryne da Silva; ARGOLO NETO, Napoleão Martins; CARVALHO, Maria Acelina Martins de. Análise citogenética de células-tronco mesenquimais em cultivo prolongado: uma revisão. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, Piauí, v. 5, n. 1, p. 20-23, 2020.

SOUZA, Verônica Ferreira de *et al.* Células-tronco: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, [S.L.], v. 2, n. 2, p. 251-256, 1 jan. 2003. Universidade Federal da Bahia. <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v2i2.4292>. Disponível em: <https://periodicos.ufba.br/index.php/cmbio/article/view/4292/3154>.

SU, Yi *et al.* CCND1-Induced Autophagy Contributes to Lymph Node Metastasis in Endometrial Cancer. **Hormone And Metabolic Research**, [S.L.], v. 55, n. 06, p. 413-419, 5 abr. 2023. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/a-2044-9227>.

SUDA, T.; SUDA, J.; OGAWA, M. Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 81, n. 8, p. 2520-4, Apr 1984. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6585813>

TANG, Qi-Qun; OTTO, Tamara C.; LANE, M. Daniel. Commitment of C3H10T1/2 pluripotent stem cells to the adipocyte lineage. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 101, n. 26, p. 9607-9611, 21 jun. 2004. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0403100101>.

TESTA, N. G.; DEXTER, T. M. Haemopoietic growth factors and haematological malignancies. **Baillieres Clin Endocrinol Metab**, v. 4, n. 1, p. 177-89, Mar 1990. ISSN 0950-351X (Print) 0950-351X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2202288>

TUERXUN, Kedeye *et al.* Cytokine responses to LPS in reprogrammed monocytes are associated with the transcription factor PU.1. **Journal Of Leukocyte Biology**, [S.L.], v. 112, n. 4, p. 679-692, 13 mar. 2022. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.3a0421-216r>.

VITURI, C. L. *et al.* Alterations in proteins of bone marrow extracellular matrix in undernourished mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 8, p. 889-95, Aug 2000. ISSN 0100-879X (Print) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10920430>

WAN, Yisong Y.. GATA3: a master of many trades in immune regulation. **Trends In Immunology**, [S.L.], v. 35, n. 6, p. 233-242, jun. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2014.04.002>.

WEISSMAN, I. L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 157-68, Jan 7 2000. ISSN 0092-8674 (Print) 0092-8674 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647940>

WEISSMAN, I. L.; SHIZURU, J. A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. **Blood**, v. 112, n. 9, p. 3543-53, Nov 1 2008. ISSN 1528-0020 (Electronic) 0006-4971 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948588>

WU, Qiuji *et al.* Modulating Both Tumor Cell Death and Innate Immunity Is Essential for Improving Radiation Therapy Effectiveness. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 8, 26 maio 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.00613>.

YAHYAPOUR, Rasoul *et al.* Mechanisms of Radiation Bystander and Non-Targeted Effects: implications to radiation carcinogenesis and radiotherapy. **Current Radiopharmaceuticals**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 34-45, 4 abr. 2018. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/1874471011666171229123130>.

ZAGO, Marco Antônio; FALCÃO, Roberto Passetto; PASQUINI, Ricardo. **Tratado de Hematologia**. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Atheneu, 2014. 899 p.

ZHENG, Xingyu *et al.* CCNE1 is a predictive and immunotherapeutic indicator in various cancers including UCEC: a pan-cancer analysis. **Hereditas**, [S.L.], v. 160, n.

1, p. 0-0, 24 mar. 2023. Springer Science and Business Media LLC.
<http://dx.doi.org/10.1186/s41065-023-00273-0>.

Anexo A – Lista dos anticorpos utilizados para diferenciação das C1498 por imunofenotipagem

- Anti- γ -H2AX (clone: 20E3, lote: 9719, Cell Signaling Technology Inc, USA)
- Anti-Ly6G PE (clone: RB6-8C5, lote: 8312751, BD Biosciences);
- Anti-CD11b PECy7 (clone: MI/70, lote: 7199852, BD Biosciences);
- Anti-F4/80 APC (clone: BM8, lote: E07285-1638, eBioscience);
- Anti-MPO FITC (clone: 2D4, lote: GR345088-4, Abcam);
- Anti-MAC-3 PerCP (clone M3/84, lote: 0314297, BD Biosciences);
- Anti-Ly6C PE (clone: HK1.4, lote: B195688, BioLegend);
- Anti-CD115 APC (clone: T38-320, lote: 1225422, BD Biosciences);
- Anti-B220 FITC (clone RA3-6B2, lote: E00307, eBioscience).
- Anti CD3 FITC (clone 145-2021, lote: 30663, BD Biosciences).