

**INTERAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCOS MESENQUIMAIS HUMANAS  
E SEUS DERIVADOS SOBRE CÉLULAS TUMORAIS DE ORIGEM  
HEMATOLÓGICO *IN VITRO***

**INTERACTION OF HUMAN MESENQUIMAL STEM CELLS AND  
THEIR PRODUCTS ON TUMOR CELLS OF HEMATOLOGICAL  
ORIGIN *IN VITRO***

**INTERACCION DE LAS CELULAS MADRE MESENQUIMALES  
HUMANAS Y SUS DERIVADOS SOBRE CELULAS TUMORALES DE  
ORIGEN HEMATOLOGICO *IN VITRO***

**Nathália Felipe Delgado<sup>1</sup>, nathaliafelipedelgado@gmail.com**  
**Debora Levy<sup>2</sup>**  
**Sérgio Paulo Bydlowski<sup>3</sup>**  
**Jorge Luis Maria Ruiz<sup>4</sup>**

**Resumo:** A utilização de células-tronco mesenquimais (CTM) ainda apresenta dúvidas em quanto a sua segurança, encontrando-se estudos controversos que mostram que as CTM podem aumentar ou inibir a proliferação de tumores. Este trabalho buscou identificar os efeitos dos meios condicionados (MC) derivados de CTM sob células tumorais hematológica. Utilizando ensaios de viabilidade celular, análise de morte celular por apoptose e análise de expressão de Citocinas mostramos que os MC de CTM causam efeito citostático da proliferação celular de células tumorais K562-Lucena.

**Palavras-chave:** Células-tronco Mesenquimais. Meio Condicionado. Células Tumorais. K562-Lucena.

**Abstract:** The use of mesenchymal stem cells (MTCs) is still uncertain related to its safety, the studies are controversial showing that MTCs may increase or inhibit tumor proliferation. This work aimed to identify the effects of conditioned media (MC) derived from CTM in hematological tumor cells. Using cell viability assays, apoptosis cell death analysis and cytokine expression analysis we show that CTM MCs cause cytostatic effect on tumor cells K562-Lucena cell proliferation.

**Keywords:** Mesenchymal Stem Cells. Conditioned Medium. Tumor Cells. K562-Lucena.

**Resumen:** El uso de células madre mesenquimales (CMM) presenta inseguranças, encontrándose estudios controvertidos que muestran que as CMM pueden aumentar o inibir la proliferación de tumores. Este trabajo buscó identificar los efectos de los medios condicionados (MC) derivados de CMM sobre células tumorales hematológicas. Utilizando ensayos de viabilidad celular, análisis de muerte celular por apoptosis y expresión de Citocinas mostramos que las CMM causan efecto citostático sobre el crecimiento de células tumorales K-562 Lucena.

**Palabras-clave:** Células madres mesenquimales. Medio condicionado. Células tumorales. K562-Lucena.

Envio 09/02/2018

Revisão 09/03/2018

Aceite 09/04/2018

<sup>1</sup> <http://lattes.cnpq.br/8460373665763103>

<sup>2</sup> <http://lattes.cnpq.br/9864396172877773>

<sup>3</sup> <http://lattes.cnpq.br/2153506219894492>

<sup>4</sup> <http://lattes.cnpq.br/3513496364751434>

## Introdução

Células-tronco (CT) são células indiferenciadas e, conforme o tecido de origem pode ser dividido em dois grupos: Células-Tronco Embrionárias (CTEs) e Células-Tronco Somáticas (CTSs). As CTEs são caracterizadas por serem células pluripotentes, pois são capazes de originar tipos celulares dos diferentes folhetos embrionários (mesoderme, ectoderme e endoderme). Já as CTSs são caracterizadas como células multipotentes, capazes de originar poucos tipos celulares diferenciados, geralmente de um único folheto embrionário (Taupin, 2006).

Na medula óssea (MO) são encontradas duas populações de CTSs, a primeira população é de células-troncos hematopoiéticas (CTHs), responsáveis de dar origem as células sanguíneas e a segunda população são de células-tronco mesenquimais (CTMs), que são responsáveis a dar origem a seus derivados mesenquimais, por exemplo, estroma medular e adipócitos, e também exercem função de sustentação as células estromais da MO. (Fukuchi *et al.*, 2004). Além da MO, as CTMs são encontradas em uma diversidade de tecidos tais como: tecido adiposo, sangue periférico, polpa dental em tecidos adultos; e nos tecidos fetais e perinatais, como o sangue do cordão umbilical, o líquido amniótico e a geléia de Wharton (Hass *et al.*, 2011). Dentre de suas principais características destacam-se a capacidade de auto-renovação e de diferenciação em diversos tipos celulares, (Janz *et al.*, 2013) exercendo assim, uma função regenerativa de tecidos lesionados. As CTMs são fáceis de isolar, e apresentam alta capacidade de proliferação e um potencial elevado de diferenciação celular (Hwang, 2009). Essas características das CTMs têm atraído interesses no seu uso terapêutico na medicina regenerativa. (Janz *et al.*, 2013; Hwang, 2009; Battiwalla & Hematti, 2009).

Friedenstein *et al.* em 1974, introduziram o conceito de células tronco mesenquimais (CTMs). Perceberam que as células da medula óssea em cultura em monocamadas eram aderentes ao plástico e a população celular se desenvolvia em um formato de espícula (Janz *et al.*, 2013) e as denominou como unidades de colônias formadoras de fibroblastos (UFC-F). – (Janz *et al.*, 20013). Em cultivo celular essas células UFC-F ficavam de dois a quatro dias inativas, passado esse período começavam aceleradamente a se proliferarem. Conforme essas células ficavam maior tempo em cultivo, apresentavam uma aparência fibroblastoide. Células

clonais derivadas de UFC-F individuais foram induzidas a diferenciação em laboratório, resultando células de osso, cartilagem e elementos estromais (Castro-Malaspina *et al.* 1980; Friedenstein *et al.*, 1974). Com esse resultado, as UFC-F passaram a ser denominadas de células-tronco mesenquimais (CTMs), porque continham habilidade de diferenciação celular do tipo mesenquimal (Friedenstein *et al.*, 1974).

Em 2005, o Comitê de Células Tronco Mesenquimais e Teciduais da Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT – do inglês, *International Society for Cellular Therapy*) propôs três critérios mínimos para a classificação de CTM. A primeira é que MSCs são isoladas de uma população de células mononucleares com base à sua aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico, A segunda é que as expressões de CD105, CD73 e CD90 estejam presentes, e que CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR não sejam expressos em mais de 95% das células em cultura. Por fim, que as células possam ser diferenciadas em osso, gordura e cartilagem (Friedenstein *et al.*, 1974; Janz *et al.*, 2009).

Uma questão importante a ser abordada em relação à biologia das CTMs *in vitro* é a idade do doador. Estudos demonstraram que no cultivo celular de doadores com maior idade, as CTMs apresentavam uma menor taxa de proliferação deste nas primeiras passagens (Silva, 2009). A maioria dos estudos relacionados à habilidade de diferenciação das CTMs de acordo com a idade do doador propõe que ao aumento da idade do doador há uma queda nas células positivas para fosfatase alcalina em UFU-F. Entretanto, um grupo de pesquisadores não constatou diferenças quanto a idade do doador para o potencial de diferenciação ostogênica e adipogênica *in vitro*, nem de diferenciação ostogênica *in vivo* (Silva, 2009).

Uma investigação evidenciou que o potencial condrogênico das CTMs sofre uma redução conforme a idade (Silva, 2009). Outro estudo relacionou a suscetibilidade de transformação de CTMs em cultura e verificou se suas propriedades biológicas continuavam adequadas para terapia celular. O resultado mostrou uma variabilidade na proliferação e na vida útil das células. Células de pacientes maiores não apresentaram anormalidade cromossômica e nenhuma ação da enzima telomerase, e os telômeros encurtaram durante o período de cultura. (Silva, 2009). A conclusão na pesquisa foi que as CTMs derivadas de medula óssea podem ser manuseadas *in vitro*, pois não proporcionam riscos de ocorrer transformações malignas, e sendo assim, resultam ideais para serem usadas em terapias celulares (Silva, 2009)

No conceito de senescência replicativa nas CTMs isoladas de origem humana uma pesquisa estudou os efeitos moleculares da senescência replicativa nas passagens tardias. Para tal, fizeram análises de naturezas morfológicas, imunofenotípicas e de diferenciação das CTMs *in vitro*. Os resultados constataram entre as passagens 7 e 12 haviam alterações morfológicas e dos marcadores específicos. Houve também, uma redução da proliferação de células adipogênicas e um acréscimo do potencial osteogênico. Foi observado também modificações na expressão gênica global ao decorrer dos subcultivos das CTMs (Wagner *et al.*, 2008).

As células tumorais podem atuar como tecido danificado, recrutando células-tronco. É conhecido que comportamento do tumor e sua progressão não estão relacionados simplesmente com as células tumorais, mas também com uma diversidade de células e moléculas não tumorais como células do sistema imunológico, células estroma mesenquimal, citocinas, fatores de crescimento etc. (Melzer *et al.*, 2016) fazem parte do microambiente e afetam o comportamento do tumor, pois interagem por meios diretos e indiretos fazendo que as células tumorais mudem suas propriedades. Tendo isso em vista, pesquisas têm sido desenvolvidas relacionadas às células não tumorais que vivem no microambiente do tumor com o intuito de compreender seu funcionamento para serem usados como alvos terapêuticos (Melzer *et al.*, 2016; Sun *et al.*, 2014).

127

Vários estudos reportaram que as CTMs provenientes da medula óssea incrementam o crescimento *in vivo* das células tumorais de cólon, linfoma e melanoma e que contribuem para a sobrevivência de células de linfoma folicular. (Ame-Thomas, 2007; Zhu *et al.*, 2009; Djouad, 2003). Controversamente, outros grupos tem reportado que fatores derivados de células-tronco podem induzir a diferenciação do tumor ou a morte direta das células tumorais, como foi demonstrado principalmente *in vitro* (Zhu *et al.*, 2009; Ramasamy, *et al.*, 2007; Marleau *et al.*, 2012; Qiao *et al.*, 2008). As CTMs derivadas de tecido adiposo inibem a proliferação de células de leucemia primária. Este efeito é mediado pela proteína solúvel DKK-1, que é regulado pelo fator de transcrição Nanog (Zhu *et al.*, 2009). Também suprimiram tumores pancreáticos mediante a alteração na progressão do ciclo celular em cultivos *in vitro*, onde foi encontrado um incremento na fase G1 conduzindo à parada nesta fase do ciclo celular (Cousin *et al.*, 2009).

Como já mencionado, células não tumorais e tumorais têm interações direta e indireta que causam distintos tipos de comunicação intracelular. E as CTMs que estão

no microambiente do tumor exercem uma ação sobre o sistema imune. Os estudos dos mecanismos de ação das CTMs indicam que estas têm a capacidade de produzir a anergia do sistema imune. Este efeito imunorregulador parece ser mediado através do contato célula-célula e mediante a liberação de mediadores solúveis que condicionam o microambiente no qual estas células se encontram. (Kode *et al.*, 2009) Além disso, as CTMs apresentam uma atividade imunogênica mínima ou quase ausente (Ponte *et al.*, 2007).

Nas células T as CTMs atenuam as respostas dos antígenos específicos, tanto das células T *naive* quanto das células T de memória, esse fato acontece de maneira independente de células dendríticas (Krampera *et al.* 2002). Um estudo submeteu os meio condicionado (MC) de CTMs durante um período de 24-48 a diversos imunossaios. O ensaio de linfócitos mistos apresentou efeitos imunossupressores que inibiram TNF- $\alpha$  e INF das células T afetando assim, o reconhecimento e a expansão das células T (Caplan, 2007).

As CTMs humanas em co-culturas com as células B indicaram uma parada do ciclo celular na fase G0/G1, ou seja, houve uma inibição da proliferação de células B. Além disso, as CTMs afetaram as características quimiotáticas das células B, mas não interfere na produção de citocinas (Corcione *et al.*, 2006). *In vitro* as CTMs excitam a secreção de anticorpos das células B e dependendo do nível dessa estimulação das CTM nas células B, pode haver um aumento ou uma diminuição de anticorpos (Rasmusson *et al.*, 2007).

As CTMs agem nas propriedades das células dendríticas regulando a diferenciação, maturação e na funcionalidade dessas células. Na maturação atuam bloqueando a sua diferenciação em monócitos e nos precursores da medula óssea. Além do mais, durante a maturação as células dendríticas impedem o acréscimo da expressão de CD1A, CD40, CD80, CD86 e HLA-DR mantendo-as em um estado de imaturação (Gur-Wahnon *et al.*, 2007). Gur-Wahnon *et al.* sugeriam que as CTMs são capazes de instigar um fenótipo supressório ou inibitório nas células dendríticas. Isto foi comprovado quando fizeram procedimentos experimentais em camundongos, que concluiu que as CTMs se comportavam como agentes protetoras contra a da Doença do Enxerto-Contra-Hospedeiro (DECH).

Uma interação indireta entre as CTMs e as células tumorais é pelo exossomas Um trabalho relatou que os exossomas provenientes de células tumorais da próstata estimulam as

CTM a se diferenciar em osteócitos e em miofibroblastos, além de ter a ação pro-angiogênicos, dessa forma estimulando o desenvolvimento de tumores (Melzer *et al.*, 2016). Uma pesquisa observou que os exossomas oriundos do cordão umbilical humano e da geléia de Wharton tinham efeitos antitumorais em células tumorais da bexiga, pois estimulavam a parada do ciclo celular e induziam a apoptose, tanto *in vitro* como *in vivo* (Melzer *et al.*, 2016).

Outra interação pesquisada verificou a ativação dos receptores de superfície das CTM poderiam inibir a ação tumoral. A ativação do receptor do tipo Toll 4 (TLR4) das CTMs com a estimulação de um lipopolissacárido (LPS), secretavam mediadores pró-inflamatórios tais como, citocinas IL-17, IL-3, macrófagos proteína inflamatória-1 beta (MIP1b), e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Experimentos realizados *in vitro* demonstraram que quando o receptor tipo Toll 4 (TLR4) das CTM quando ativados são capazes de promover ação inflamatória nos tumores de pulmão e de ovário, resultando que as CTM, com o TLR4 ativado, resultam danosas à progressão tumoral (Sun *et al.*, 2014).

Atualmente, as CTMs têm relevância predominantemente nos transplantes, particularmente no transplante de medula óssea após quimioterapia em pacientes oncológicos. As CTMs formam parte do estroma que sustenta a hematopoiese que, após quimioterapia, encontra-se danificado. Estudos em animais demonstraram que o transplante conjunto de células-tronco hematopoiéticas (CTHs) e CTMs podem reparar o tecido e gerar um microambiente propício para a hematopoiese, melhorando assim o resultado do transplante (Devine & Hoffman, 2000; Kim *et al.*, 2013; Pontikoglou, 2011; Le Blanc, 2007). Além disso, as CTM apresentarem uma vantagem de regulação do sistema imune, (Janz *et al.*, 2013) que possibilita evitar a rejeição do tecido ou órgão transplantado pelo hospedeiro (Hwang, 2009) dessa forma pode reduzir a doença do enxerto contra hospedeiro, na qual é responsável pelo os fracassos nos transplantes (Hwang, 2009).

Existem relatos controversos na literatura indicando que as CTMs podem aumentar *in vitro* e *in vivo* a proliferação de linhagens tumorais e em outros casos inibi-la. Esses comportamentos das CTMs estão relacionados ao ambiente na qual se encontram e também de acordo com sua origem. Para uma melhor elucidação da interação das CTMs com câncer, faz-se necessário estudos mais aprofundados sobre esse tema. Tendo em vista a importância de se estudar mais a relação CTMs e células tumorais, a presente pesquisa teve como objetivo analisar

os efeitos dos meios condicionados produzidos pelas CTMs de diferentes fontes sob células tumorais de linhagem hematológica para determinar o tipo de interação existente.

### Metodologia

**Culturas celulares.** Com o intuito de comparar a heterogeneidade das CTMs de diferentes origens utilizaram-se três linhagens de CTMs isoladas no Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). As CTMs utilizadas foram CTMs derivadas de geléia de Wharton (CU), líquido amniótico (LA) e tecido adiposo (TA).

Isolaram-se estas células pela capacidade de aderência em plástico, foram expandidas, caracterizadas e congeladas em nitrogênio líquido até o momento de utilizá-las. Três amostras de cada linhagem foram descongeladas e expandidas *in vitro*, cultivadas em meio  $\alpha$ -MEM (Sigma-Aldrich®, EUA), suplementadas com 20% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), penicilina 100U/ml e com estreptomicina 100  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich®, EUA) e acondicionadas em incubadora a 37 °C com atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% (Thermo Forma, EUA).

Para a linhagem de célula tumoral hematológica utilizou-se no estudo a linhagem comercial K562-Lucena (LMC resistente a vincristina). Estas células foram cultivadas em meio RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Brasil), penicilina 100U/ml e com estreptomicina 100  $\mu$ g/ml (Sigma-Aldrich®, EUA) mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> (Thermo Forma, EUA).

**Meios condicionados (MC).** Os meios condicionados (MC) de CTMs foram obtidos de culturas de CTMs de geléia de Wharton (CU), líquido amniótico (LA) e tecido adiposo (TA). Quando as células atingiram 80% de confluência, o meio foi trocado e 10 mL de  $\alpha$ -MEM 10% de SFB foram adicionados. Após 24 h de incubação, o MC foi separado, centrifugado e filtrado (0,45  $\mu$ M). O pH e a osmolaridade foram corrigidos, e os MCs alíquotados e estocados a -20 °C até o momento de uso.

**Ensaio de proliferação celular.** A fim de analisar os efeitos dos MCs na proliferação celular na linhagem tumoral realizou-se o ensaio de proliferação celular por MTT.

Células de tumores hematológicos cultivados em meio de  $\alpha$ -MEM foram semeadas em placas de 96 poços (Corning, EUA) com  $1 \times 10^3$  células por poço. Incubaram-se as células com concentrações de MCs de diferentes origens (de 0.01% a 100 %) por 24 horas. Após 24 horas acrescentou-se 10  $\mu$ L de solução MTT e, após 4 h, os cristais de formazan foram dissolvidos com dimetilsulfóxido (DMSO) e determinou-se a viabilidade celular por quantificação da absorbância a 570 nm e 630 nm em espectrofotômetro (Spectramax Paradigm® Molecular Devices, LLC) (Peres *et al.*, 2008).

**Análise de morte celular por apoptose.** A indução de morte celular por apoptose foi estudada utilizando o *kit Annexin-V/PI* (BD Pharmigem, USA) que detecta exteriorização de fosfatidilcolina em células apoptóticas. Em placas de 96 poços plaquearam-se as células tumorais K562-Lucena ( $1 \times 10^4$  cel/poço) que foram tratadas por 24 h com os MCs, na concentração determinada nos experimentos de viabilidade celular que induz a menor viabilidade. As células foram incubadas com 1  $\mu$ L de anexina V e 0,5  $\mu$ L de iodeto de propídio (PI) e incubadas protegidas da luz. As placas foram adquiridas por microscopia de fluorescência no ImageXpress® Micro XL (Molecular Devices, LLC).

131

**Análise de expressão de citocinas.** A fim de analisar a presença de citocinas nos MCs foi utilizado o kit Human Cytokine Array Kit, Panel A (R&D Systems) que possibilita detectar até 36 citocinas, quimosinas e proteínas de fase aguda. O experimento foi realizado seguindo as instruções do fabricante.

**Análise estatística.** Os dados foram avaliados mediante ANOVA, seguido do teste Post-hoc Bonferroni (GraphPad Prism 5®). Os resultados serão expressos como média  $\pm$  DP em triplicata considerando um valor de  $p < 0,05$  estatisticamente significativo.



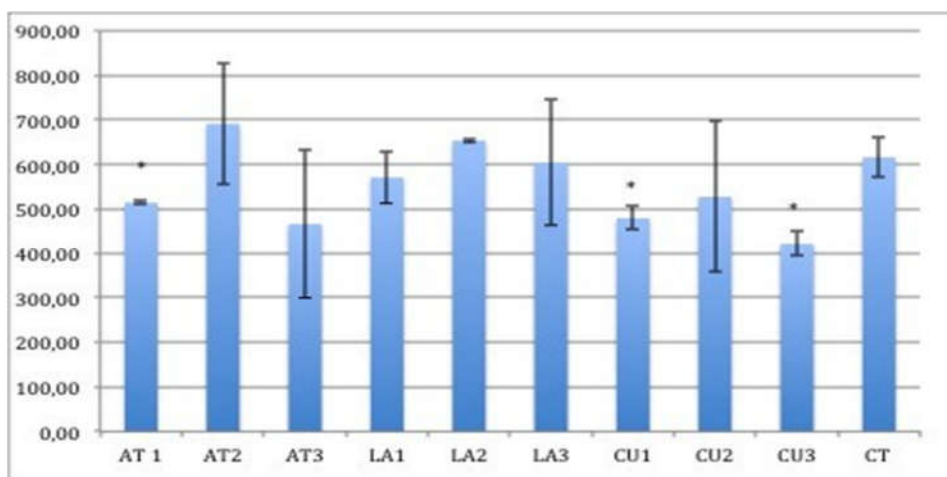
## Resultados

Os resultados do experimento de viabilidade celular por MTT permitiram determinar que alguns meios condicionados apresentaram efeito inibidor na proliferação celular nas células K562-Lucena.

O gráfico 1 mostra o número total de células K562-Lucena após incubação durante 24 h com meio condicionado das três linhagens de CTMs. Os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) de três experimentos diferentes. Foi encontrada diferença estatística em duas amostras de CU e uma de tecido adiposo. As linhagens estudadas de CTM de cada origem apresentam alta variabilidade entre elas, e maior ainda entre linhagens de CTM com origem diferente. Além disso, na maioria dos tratamentos foi observado uma diminuição no número de células viáveis, indicando que o MC tem um efeito negativo sobre a proliferação celular das células K562-Lucena.

132

Gráfico 1: Análise de viabilidade celular em células K562-Lucena após 24 h de incubação com meio condicionado das três linhagens de CTMs. Os dados são apresentados como Média $\pm$ DP de três experimentos e os asteriscos indicam diferença estatística com  $p \leq 0,05$ .

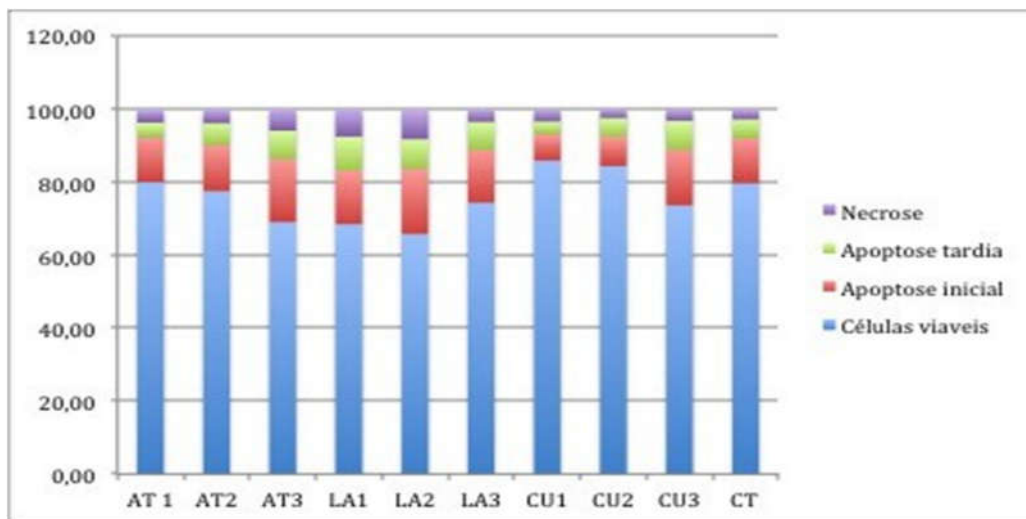


Fonte: dados do autor.

O análise de morte celular por apoptose (gráfico 2) não mostrou diferenças estatisticamente significativas com o controle.

A continuação foram avaliados os mediadores solúveis secretados pelas CTMs e as próprias células tumorais utilizando um microarranjo de Citocinas. O resultado é apresentado na figura 1. Foi encontrada uma grande diferença no conjunto de Citocinas secretadas no meio condicionado de células-tronco mesenquimais.

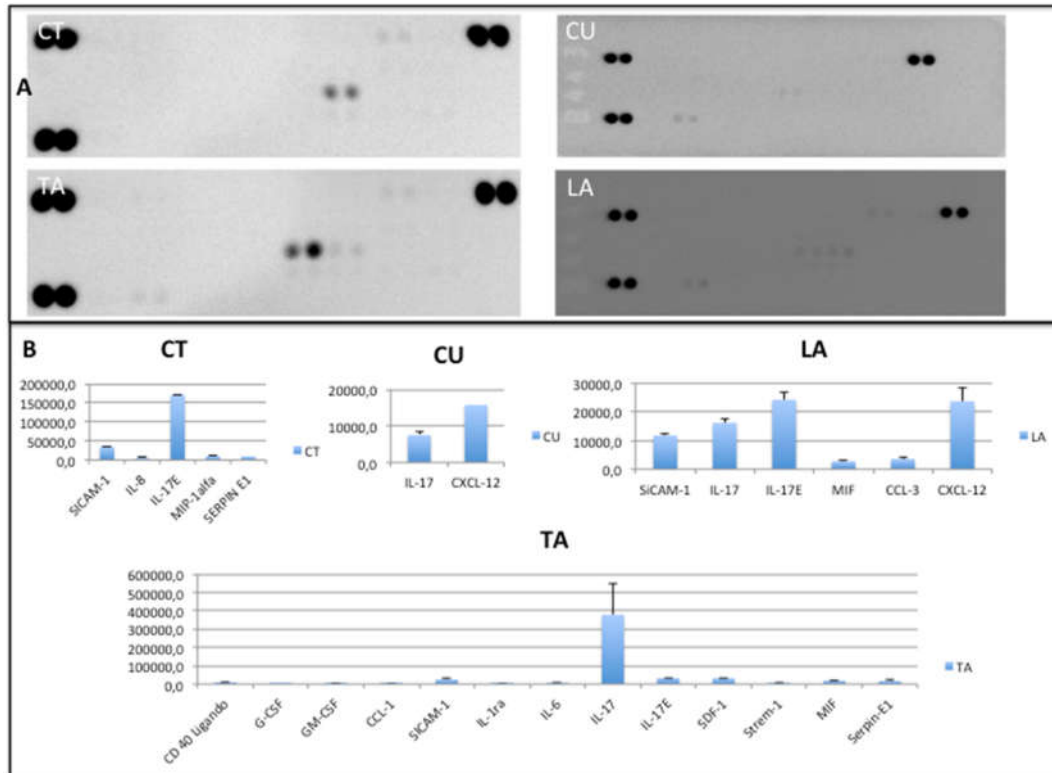
Gráfico 2: Análises de morte celular em células K562-Lucena após incubação durante 24 h com meio condicionado de diferentes fontes.



Fonte: dados do autor.

Figura 1: Microarranjo de citocinas. Em A são apresentadas as membras incubadas com os diferentes MC derivados de CTMs e do CT (MC derivado das células tumorais K562-Lucena). Em B são apresentados os valores semiquantitativos das citocinas encontradas expressas nos MCs. Pode ser observado que células de diferente origem expressam um conjunto diferente

qualitativamente e quantitativamente de proteínas.



134

Fonte: dados do autor.

## Discussão

O interesse do estudo das CTM vem crescendo nos últimos anos, isso devido o potencial dessas células se diferenciarem em vários tipos celulares e se auto-renovarem com essas características as CTM exerce uma função regenerativa de tecidos lesionados. E também, por terem facilidade de isolamento e, mesmo expandidas *in vitro*, suas principais características permanecem. Por proporcionar essas características e também de ter função imunomodulatória, as CTM se tornaram muito atrativas para aplicações clinicas como protocolos experimentais em estudos de diferenciação celular, terapia celular e na terapia gênica (Caplan, 2007).

Em relação ao câncer, segundo Dados da Base Populacional do Instituto Nacional do Câncer (INCA) a estimativa de câncer para o ano de 2016/2017 no país eram de 596 mil novos

casos de câncer, sendo 295.200 novos casos para o sexo masculino e 300.800 novos casos para sexo feminino. Dentro desse número, o número de casos para leucemia de 5.540 casos em homens e de 4.530 em mulheres. Em 2018, os novos casos de leucemia aumentaram para 10.800, sendo 5.940 homens e 4.860 mulheres. E no mundo surgem 257 mil casos novos de leucemia por ano, aproximadamente 60% dos casos acontecem no sexo masculino. Os tratamentos para esse tipo de câncer são: loco-regionais (cirurgia e radioterapia); sistêmicas (quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia). E de reabilitação (física e psicológica) (Andrade *et al.*, 2013).

O aumento da utilização de células-tronco mesenquimais acompanha a necessidade do estudo da sua interação com os tumores. Na literatura encontram-se controversas sobre se CTMs aumentam ou inibem a proliferação de linhagens tumorais. Nosso estudo vem a contribuir analisando os efeitos dos meios condicionados produzidos pelas CTM, de diferentes fontes, sob células tumorais de linhagem hematológica. E verificar se existem fatores no MC produzido pelas CTM capazes de virar um fármaco para o tratamento da leucemia mielóide crônica.

135

Como pode ser observado no gráfico 1, na maioria dos tratamentos encontrada uma diminuição no número de células viáveis. Isto indica que o MC exerce um efeito negativo sobre a proliferação celular das células K562-Lucena *in vitro*. A causa desta diminuição de células pode estar relacionada ao efeito citostático ou citotóxico dos componentes do MC, desde que o MC controle não provoca diminuição de células viáveis como possível consequência do esgotamento do meio.

Ao avaliar a morte celular por apoptoses não foram encontradas diferenças significativas com o controle, indicando que não houve aumento de morte celular por via apoptótica. As porcentagem de células encontradas em cada fase (viáveis, apoptose inicial, apoptose tardia e necroses) são normalmente encontradas em células em suspensão. Estes resultados indicam que pode existir um efeito citostático de alguns meios condicionados sobre a proliferação das células tumorais, que não aumenta a morte celular mas que inibe a proliferação em relação ao controle.

Em quanto aos fatores que as CTMs secretam, interessantemente, as CTMs expressam IL-17, em quanto que as células tumorais apresentam o ligando da IL-17. A IL-17 é secretada normalmente pelos linfócitos Th e tem função pro-inflamatória, estimulando outras células a produzir quimiocinas. Por outro lado, no MC de MSC de TA e LA foi encontrada a expressão de MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*), um inibidor da ativação imune de linfócitos. Estes fatores foram encontrados majormente expressos, mas outros fatores podem ser responsáveis dos efeitos desde que Citocinas atuam em baixa concentração. Resulta necessário estudar em mais detalhes estas Citocinas, e avaliar o efeito de cada citocina individualmente (Corcione *et al.*, 2006).

Em conjunto, estes resultados indicam que as células-tronco podem regular negativamente a proliferação de células tumorais K562-Lucena por um mecanismo citostático. Novos estudos, que avaliem os efeitos de cada citocina encontrada diferencialmente expressa, poderão elucidar o fator inibitório.

### **Conclusão**

Os meios condicionados (MC) de células-tronco mesenquimais (CTM) afeta a proliferação celular de células tumorais K562-Lucena, podendo inibir a proliferação em diferente grau dependendo na sua origem. Os MC de CTM possuem vários tipos de citocinas que, normalmente não são encontradas no meio das células tumorais K562-Lucena, indicando um possível mecanismo de ação, que pode ser estudado posteriormente para atuarem como tratamentos terapêuticos.

### **Agradecimentos**

Ao Laboratório de Genética e Hematologia Molecular (LIM-31) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por permitirem a realização dos procedimentos experimentais em suas dependências. E ao Programa de Iniciação Científica da UNILA (PIBIC) financiado pela Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação - Divisão de Iniciação Científica da Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) pelo auxílio concedido.

## Referências

AME-THOMAS, P. et al. **Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis.** *Blood* 109, 693–702 (2007).

BRASIL. Ministério da Saúde; Instituto Nacional de Câncer. **Estimativas 2016: incidência de câncer no Brasil.** Disponível em <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>

CAPLAN, A.I. (2007). **Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine.** *J. Cell. Physiol.* 213, 341–347.

CASTRO-MALASPINA H, et al. **Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.** *Blood* 1980;56:289-301.

CORCIONE A, et al. **Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions.** *Blood* 2006; 107: 367-372.

COUSIN, B. et al. **Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo.** *PLoS ONE* 4, e6278 (2009).

DEVINE, S. M. & HOFFMAN, R. **Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation.** *Current Opinion in Hematology* 7, 358 (2000).

DJOUAD, F. **Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals.** *Blood* 102, 3837–3844 (2003).

FRIEDENSTEIN, A; et al. **Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo.** *Transplantation.* 1974;17:331-340.

GUR-WAHNON D, et al. **Contact-dependent induction of regulatory antigenpresenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling.** *Exp Hematol* 2007;35:426-433.

HASS, R., et al. **Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC.** *Cell Commun. Signal.* 9, 12. 2011.

JANZ, F.L. ; DEBES, A. A. ; SEKIYA, E.J. ; ALVES, A ; BYDLOWSKI, S. P. . **Fundamentos da Terapia Celular.** In: Antonio Carlos Lopes. (Org.). *Clínica Médica, Diagnóstico e Tratamento.* 1aed.: Atheneu, 2013, v. 6, p. 5907-5932.

- KRAMPERA M, GLENNIE S, DYSON J, SCOTT D, LAYLOR R, SIMPSON E, DAZZI F. **Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naïve and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide**, *Blood* 2002;101: 3722-3729.
- KIM, E.-J., KIM, N. & CHO, S.-G. **The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation**. *Experimental & Molecular Medicine* 45, e2–10 (2013).
- KODE, J. A. et al. **Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration**. *Cytotherapy* 11, 377–391 (2009).
- LE BLANC, K. et al. **Transplantation of mesenchymal stem cells to enhance engraftment of hematopoietic stem cells**. *Leukemia* 21, 1733–1738 (2007).
- MARLEAU, A. M et al. **Reduction of tumorigenicity by placental extracts**. *Anticancer Res.* 32, 1153–1161 (2012)
- MELZER C, YANG Y, HASS R. **Interaction of MSC with tumor cells**. *Cell Commun Signal.* 2016;14(1):20.
- PERES, L et al. **Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal**. *J Bras Nefrol* 2008;30/1:48-53
- PONTE, A. L. et al. **The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities**. *Stem Cells* 25, 1737–1745 (2007).
- PONTIKOGLOU, C., et al. **Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Biological Properties and Their Role in Hematopoiesis and Hematopoietic Stem Cell Transplantation**. *Stem Cell Rev* 7, 569–589 (2011).
- QIAO, L. et al. **Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model**. *Cell Res.* 18, 500–507 (2008).
- RAMASAMY, R. et al. **Mesenchymal stem cells inhibit proliferation and apoptosis of tumor cells: impact on in vivo tumor growth**. *Leukemia*;21:304-310 (2007)
- RASMUSSEN I, et al. **Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells**. *Scand J Immunol* 2007;65:336-343.
- SILVA, C. **Estudos Moleculares de Células Tronco Mesenquimais Cultivadas *In Vitro***. 159 f. Tese para obtenção do grau de Doutor em Oncologia - Programa de Pós-Graduação em Oncologia Strictu-Sensu, Instituto Nacional do Câncer. Rio de Janeiro, 2009.
- SUN Z, WANG S, ZHAO RC. **The roles of mesenchymal stem cells in tumor inflammatory microenvironment**. *J Hematol Oncol.* 2014;7:14.

TAUPIN, P. Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy: challenges and new strategies. **Med Sci Monit**, v. 12, n. 4, p. RA75-78, 2006.

ANDRADE, V. et al. **Qualidade de vida de pacientes com câncer hematológico em tratamento quimioterápico**. Rev Esc Enferm USP. 2012

WAGNER W, et al. **Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process**. *PLoS ONE* 2008;3:e2213.

ZHU, Y. et al. **Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1**. 23, 925–933 (2009).