



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
FACFAN



JULIA LOPES RIBEIRO FREDO

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR
PURINÉRGICO P2X7 NA REGULAÇÃO DA
CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA E LINHAGENS
MIELOIDES**

Campo Grande - MS

2025

JULIA LOPES RIBEIRO FREDO

**INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR
PURINÉRGICO P2X7 NA REGULAÇÃO DA
CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA E LINHAGENS
MIELOIDES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Edgar Julian Paredes-Gamero

Co-orientadora: Kamylla Fernanda Souza de Souza

Campo Grande

2025

INVESTIGAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO RECEPTOR PURINÉRGICO P2X7 NA REGULAÇÃO DA CÉLULA-TRONCO HEMATOPOÉTICA E LINHAGENS MIELOIDES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição - FACFAN, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edgar Julian Paredes-Gamero - UFMS - Orientador

Prof. Dr. Davi Campos La Gatta - UFMS - 2º membro

Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto - UFMS - 3º membro

Prof. Dr. Heron Fernandes Vieira Torquato - UFMS - suplente

Campo Grande, 26 de junho de 2025

APRESENTAÇÃO

Os dados da presente monografia fazem parte do trabalho desenvolvido em colaboração com tese de Kamylla Fernanda Souza de Souza, apresentada à UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina) para obtenção do Título de Doutora em Ciências - Biologia Molecular, no ano de 2024.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Kamylla Fernanda Souza de

Alteração da homeostase no sistema linfo-hematopoético em animais P2X7 nocaute e seus efeitos nos processos de proliferação e diferenciação / Kamylla Fernanda Souza de Souza. - São Paulo, 2024.

xiii, 76f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular .

Título em inglês: Disruption of homeostasis in the lympho-hematopoietic system in P2X7 knockout animals and its effects on proliferation and differentiation processes.

1. : Receptores purinérgicos. 2. P2X7. 3. célula-tronco hematopoética. 4. hematopoese. 5. inflamação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, pelo dom da vida e pela saúde;

Ao meu pai Carlos, que sob muito sol, me fez chegar aqui na sombra;

A minha mãe Juliana, por seu amor e por sempre me guiar pelo melhor caminho;

Ao meu irmão Juninho, meu eterno parceiro e primeiro melhor amigo;

A minha tia Anezia, primeira farmacêutica que conheci e admirei;

A meus tios maternos, por sempre acreditarem em mim e presentear nossa família com nossos “feios”;

Ao meu namorado Pedro, por ser meu maior porto seguro durante a maior parte dessa jornada, com muito amor e gratidão. Meu cúmplice de vida;

Aos meu orientadores, por me acolherem caloura, crua, e semearem a semente da ciência em mim;

Em especial a minha amiga Kamylla, por me permitir ser sua companheira, com muita paciência me dar o privilégio de aprender um pouco sobre tudo que sei e pelas centenas de oportunidades compartilhadas. É um prazer estar no seu “Souza de Souza, KF et al.”;

Aos meus amigos de coração e caminhada da vida, é uma dádiva crescer com vocês;

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e todos os docentes do curso de Farmácia, universidade rica de profissionais incríveis e momentos que ficarão para sempre em memória e coração.

DEDICATÓRIA

Em especial, dedico essa conquista aos meus tesouros:

Meu avô de coração, Jose Martin Sanchez (*in memoriam*); e minha rainha, vó Magaly Nubya Duarte. A mulher forte, corajosa, virtuosa, quem nunca mediu esforços para me amar e cuidar até hoje e para sempre. Obrigada por presentear nossa família com o presente que foi nosso vô de coração;
Juntos, me apoiaram incondicionalmente, acima de tudo e de todos, e me confiaram quando nem eu mesma confiei. Agradecer nunca será suficiente. Te quero.

*“Tenho o privilégio de não saber quase tudo,
e isso explica o resto.”*

(Manoel de Barros)

RESUMO

Células-tronco hematopoéticas (CTH) são células multipotentes imprescindíveis para os sistemas sanguíneo e linfático, devido ao seu potencial de manter e repopular a medula óssea, formando todos os tipos celulares destes sistemas. Dessa forma, o entendimento dos mecanismos de controle da CTH e de moléculas que permitam a manipulação desta população tem enorme importância científica e clínica. Nosso grupo investiga as vias intracelulares que controlam a CTH e os mecanismos de autorrenovação e diferenciação, usando como sinalizadores citocinas hematopoéticas e receptores purinérgicos. Entre os receptores investigados, destaca-se o receptor P2X7 (P2X7R), que é um canal catiônico aberto pelo ligante ATP e sua ativação prolongada forma um macroporo de membrana não seletivo, cuja atividade é associada principalmente com o sistema imune. O objetivo deste trabalho foi aprofundar o estudo do papel dos receptores purinérgicos na modulação da CTH e na diferenciação mielóide, pesquisando particularmente a função do P2X7R em modelo de camundongo *knockout*, comparado a um animal *Wild Type*. Em material obtido de sangue periférico e medula óssea dos dois grupos murinos, foi analisado parâmetros hematológicos, assim como quantificou-se populações celulares, capacidade de formação de colônias, citocinas inflamatórias e o estresse oxidativo. Dentre as análises citadas, foram observadas alterações significantes nas populações CTH, progenitores de granulócitos e macrófagos, progenitores linfóides e células maduras mielóides. Estes resultados abrem caminho para buscar maior aprofundamento sobre o papel do P2X7R na hematopoese e explorar possíveis mecanismos compensatórios de outros receptores purinérgicos existentes.

Palavras-chave: hematopoese; células-tronco; receptores purinérgicos; P2X7; linhagens mielóides.

ABSTRACT

Hematopoietic stem cells (HSCs) are multipotent cells that are essential for the blood and lymphatic systems due to their high potential to repopulate the bone marrow and generate all cell types of these systems. Therefore, understanding the regulatory mechanisms of HSCs and identifying molecules that allow the manipulation of this population is of great scientific and clinical relevance. Intracellular pathways that control HSCs self-renewal and differentiation have been investigated, using hematopoietic cytokines and purinergic receptors as activators. This study aims to elucidate the role of purinergic receptors in regulating HSC and myeloid differentiation. We focus on the P2X7 receptor using a knockout mouse model and compare it to a wild-type animal. The P2X7 receptor is an ATP-gated cationic channel, and its prolonged activation leads to the formation of a non-selective membrane macropore, an activity primarily associated with the immune system. Using material obtained from peripheral blood and bone marrow cells, we analyzed hematological parameters, quantified cell populations, assessed colony-forming ability, measured inflammatory cytokines, and oxidative stress. We observed alterations in HSC, GMP, lymphoid progenitors, and myeloid cells. This opens up a path for further exploration of the P2X7 receptor in hematopoiesis, as well as compensatory mechanisms involving other purinergic receptors.

Keywords: hematopoiesis; stem cells; purinergic receptors; P2X7; myeloid lineage

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Quantificação de CTH e células progenitoras em animais WT e P2X7-ko

Figura 2. Quantificação de progenitoras linfoides e mieloides em animais WT e P2X7-ko

Figura 3. Quantificação de células maduras em animais WT e P2X7-ko

Figura 4. Contagem de colônias em animais WT e P2X7-ko

Figura 5. Análise hematológica em animais WT e P2X7-ko

Figura 6. Coloração diferencial em animais WT e P2X7-ko

Figura 7. Estado redox em animais WT e P2X7-ko

Figura 8. Níveis de citocinas inflamatórias em animais WT e P2X7-ko

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Painéis de anticorpos e seus respectivos fluoróforos utilizados neste estudo

LISTA DE ABREVIATURAS

[Ca²⁺]_{cit} Concentração de cálcio citoplasmático

ATP Adenosina trifosfato

ADP Adenosina difosfato

APC Alociocianina

B220 Anticorpo marcador de células B

Ca²⁺ Cálcio

CFU-G Unidade formadora de colônias de granulócitos

CFU-GEMM Unidade formadora de colônias de granulócitos, eritrócitos, macrófagos, megacariócitos

CFU-GM Unidade formadora de colônias de granulócitos e macrófagos

CFU-M Unidade formadora de colônias de macrófagos

c-Kit Receptor do fator de célula-tronco

CMP Progenitor mieloide comum

CSF-G Fator estimulador de colônias de granulócitos

CSF-GM Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

CSF-M Fator estimulador de colônias de macrófagos

CTH Célula-tronco hematopoética

DAMP Padrão Molecular Associado ao Dano

DNA Ácido desoxirribonucleico

EDTA Ácido etilenodiamino tetra acético

EROs Espécies reativas de oxigênio

F4/80 Anticorpo marcador de macrófagos

FITC Isotiocianato de Fluoresceína

g Força gravitacional, força $g = 9,81 \text{ m/s}^2$

GMP Progenitor de granulócitos e macrófagos

Gr-1 Anticorpo marcador de granulócitos

h Hora/horas

Hb Hemoglobina

HCl Ácido clorídrico

Ht Hematócrito

IL Interleucina

IMDM Dulbecco modificado por Iscove's

iPSC Células tronco pluripotentes induzidas

K⁺ Potássio

Mac-1 Anticorpo marcador de monócitos

MCP-1 Proteína Quimiotática de Monócitos-1

MEP Progenitor eritróide/megacariocítico

min Minuto/minutos

mM Milimolar

mm Milímetro

Na⁺ Sódio

NK Natural killer

nM Nanomolar

P2X7R Receptor purinérgico P2X7

PBS Tampão fosfato salino

PE Ficoeritrina

PERCP Proteína peridinina clorofila

PGL Progenitor linfoide

PLT Plaqueta

RBC Eritrócitos, glóbulos vermelhos

RNA Ácido ribonucleico

rpm rotações por minuto

Sca-1 Stem Cell Antigen 1 (Antígeno de células-tronco)

SCF Stem cell fator (Fator de célula-tronco)

TBA Ácido tiobarbitúrico

Ter-119 Anticorpo marcador de eritrócitos

TNF Fator de Necrose Tumoral

WBC Leucócitos, glóbulos brancos

WT Wild type (selvagem)

LISTA DE SÍMBOLOS

μL – microlitro

μM – micromolar

nmol/mL^{-1} – nanomol por mililitro

mU/mL^{-1} – miliunidade por mililitro

$^{\circ}\text{C}$ – grau Celsius

% – porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização e problematização dos mecanismos de controle da hematopoese	15
1.2 Hipótese e relevância dos receptores purinérgicos e a hematopoese.....	16
1.3 Sinalização celular e receptores purinérgicos.....	17
1.4 Relação entre hematopoese e sinalização purinérgica.....	19

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21

3 METODOLOGIA

3.1 Isolamento da medula óssea femoral e sangue periférico.....	22
3.2 Imunofenotipagem de CTH, progenitores e células maduras.....	23
3.3 Análise sangue periférico.....	23
3.4 Determinação do potencial clonogênico e identificação de colônias.....	24
3.5 Avaliação do estado redox.....	24
3.5.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	25
3.5.2 Quantificação substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	25
3.6 Quantificação de citocinas inflamatórias por CBA.....	26
3.7 Análise estatística.....	26

4 RESULTADOS

4.1 Animais P2X7-ko têm aumento de CTH, GMP e granulócitos.....	27
4.2 Animais P2X7-ko não apresentam alterações hematopoéticas funcionais.....	29
4.3 Animais P2X7-ko não apresentam alterações no estado redox.....	32
4.4 Animais P2X7-ko não têm alteração na liberação de citocinas.....	33

5 DISCUSSÃO.....

6 REFERÊNCIAS.....

1 INTRODUÇÃO

1.1. Células tronco e sua relevância

Células-tronco são células primárias e indiferenciadas, capazes de originar todos os outros tipos celulares especializados a partir de processos de autorrenovação e diferenciação. Apesar da notabilidade datada desde o séc. XIX, os primeiros estudos foram estabelecidos nos anos 60 em pesquisas de Till e McCulloch que, ao analisarem a sensibilidade da medula óssea de camundongos à radiação, identificaram uma célula capaz de originar múltiplas linhagens de células sanguíneas, consolidando o conceito de células-tronco hematopoéticas (CTH). A partir de então, diferentes tipos de células-tronco foram caracterizados: mesenquimais multipotentes, as quais geram tipos celulares relacionados em uma linhagem específica (Friedenstein et al., 1976), embrionárias pluripotentes, as que originam todos os tecidos do corpo (Thomson et al., 1998) e adultas/somáticas maduras, com linhagem definida (Weiss; Taylor 2008). Dada a sua versatilidade, abriu-se um caminho para o uso terapêutico de células-tronco em manutenção e reparo de diversos tecidos como ossos, cartilagens, músculos, nervos e, em suma importância, sangue. Mesmo o conceito sendo definido nos anos 60, o oncologista francês Georges Mathé realizou o primeiro transplante humano de células-tronco em 1958, ao tratar com sucesso pesquisadores expostos acidentalmente à radiação, quando introduziu na medula óssea doente dos pacientes uma medula saudável. Desde então, o procedimento se tornou rotineiro mundialmente e atualmente no Sistema Único de Saúde (SUS) brasileiro, o qual disponibilizou 431 produtos celulares para realização de transplantes de medula óssea apenas no ano de 2024 (Ministério da Saúde, 2024).

Com o avanço da biotecnologia e medicina regenerativa, descobriu-se metodologias revolucionárias como a reprogramação de células maduras e especializadas para células-tronco induzidas pluripotentes (iPSC) (Takahashi; Yamanaka, 2006), assim como as células-tronco embrionárias, feito este que outorgou o título de prêmio Nobel ao japonês Shinya Yamanaka e ao inglês John B. Gurdon em 2012. Portanto, é crucial continuar a exploração de potenciais contextos clínicos e terapêuticos para tratar doenças como leucemias, linfomas, cânceres de

outros tecidos, distúrbios neurodegenerativos, lesões da medula espinhal e doenças autoimunes. A literatura científica tem se expandido significativamente nos últimos anos, refletindo o crescente interesse e os avanços tecnológicos na área.

1.2. Contextualização da hematopoese e seus mecanismos reguladores

A hematopoese é o processo de formação das células do sistema sanguíneo e linfático, desencadeado a partir da capacidade da CTH de se proliferar, se diferenciar (divisão assimétrica), ou se autorrenovar (divisão simétrica). Diariamente, milhões de células hematopoéticas são renovadas a partir das CTH na medula óssea de indivíduos adultos (Szade et al., 2018), devido ao fato das células maduras desses sistemas possuírem um tempo de vida curto (Tak; Tesselaar et al., 2013).

A medula óssea é um tecido flexível localizado na cavidade interior de ossos longos e na parte esponjosa de ossos chatos, como fêmur, tíbia, esterno, entre outros. A autorrenovação, proliferação, quiescência (repouso) e todos os processos celulares são mantidos, em grande parte, pela interação direta ou indireta com o estroma medular dos nichos hematopoéticos, local formado por células endoteliais, fibroblastos, osteoblastos, megacariócitos, macrófagos e adipócitos (Birbrair; Frenette, 2016). Imaginando um formato piramidal, temos um modelo de desenvolvimento hierárquico: visto que as CTH são o topo da hierarquia da hematopoese, dando origem a uma série de células de forma escalonada, abaixo tem-se as células progenitoras, irreversivelmente comprometidas à diferenciação nas linhagens mieloides ou linfoides (Spangrude; Heimfeld et al., 1988), onde as descendentes geradas possuem menor capacidade de diferenciação. Assim, segundo esse modelo, as CTH dão origem aos progenitores multipotentes que, por sua vez, geram os progenitores comprometidos com as linhagens mieloide (granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e monócitos) e linfóide (linfócitos, B e T, células “natural killer” e células dendríticas) (Morrison et al., 1996). A linhagem mieloide continua seu amadurecimento ao diferenciar os granulócitos nos diferentes leucócitos que circulam pelo sangue: neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, além dos monócitos se tornarem macrófagos ao migrarem para os tecidos onde

realizam fagocitose. As CTH também podem circular, se alojar em órgãos como fígado (Taniguchi; Toyoshima et al., 1996) e baço (Freedman; Saunders, 1981) gerando novas células hematopoéticas nestes locais (Cenariu; Iluta et al., 2021).

As interações entre as CTH e os nichos hematopoéticos são processos diretos (interação célula-célula) ou indiretos, onde moléculas são secretadas e geram uma sequência de sinalização celular para orquestrar os processos hematopoéticos. Esses processos são controlados a partir de moléculas chamadas moduladores ou reguladores da hematopoese. Alguns exemplos de moléculas conhecidas são as citocinas: trombopoetina (TPO), fator de células-tronco (SCF) (Shin; Hu et al., 2014), a interleucina 6 (IL-6) (Zhao; Ma et al., 2014), fator estimulador de colônias (CSF) de granulócitos (G-CSF), monócitos (M-CSF) ou ambos (GM-CSF) (Winkler; Wiercinska et al., 2016), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) (Vaidya; Kale et al., 2015) ou fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) como regulador negativo (PRONK, et al., 2011), entre outros. Além desses reguladores bem estabelecidos pela literatura, outros sinalizadores podem atuar na modulação da hematopoese, como estudos do nosso grupo de pesquisa que demonstraram a importância da ação moduladora do óxido nítrico (Nogueira Pedro; Dias et al., 2014), vitamina E (Nogueira-Pedro; Barbosa et al., 2011) e nucleotídeos extracelulares, como ATP e ADP (Barbosa, et al., 2011). Dessa forma, atualmente nosso grupo de estudo focou nos receptores purinérgicos que respondem a sinalização desses moduladores para entender melhor o processo de diferenciação celular das CTH.

1.3. Sinalização celular e receptores purinérgicos

A sinalização celular é o processo pelo qual as células se comunicam entre si ou respondem a sinais do ambiente. É um mecanismo fundamental, o qual permite organismos multicelulares funcionarem de forma coordenada, através de sinais químicos para produzir uma resposta biológica. Em geral, a comunicação funciona pela ligação de moléculas sinalizadoras por receptores, seguido pela transdução deste sinal por mensageiros para o meio intracelular, gerando então uma cascata de eventos bioquímicos os quais são transduzidos à resposta celular.

O termo “receptores purinérgicos” foi conceituado por Geoffrey Burnstock, em 1972, enquanto estudava os efeitos de nucleotídeos e nucleosídeos na sinalização entre células. Até então, o ATP era considerado apenas uma molécula energética intracelular e se comprovou ser também uma molécula sinalizadora extracelular, ao ativar respostas em receptores específicos. Para descrever esses receptores ativados por purinas (base nitrogenada que forma parte dos nucleotídeos de DNA e RNA) utilizou-se o sufixo “-érgico”, usado na nomenclatura de sistemas como colinérgico e dopaminérgico. Primeiramente, houve distinção em duas famílias dos purinoreceptores: P1 ativados seletivamente por adenosina e P2, ativados por ATP E ADP (Burnstock, 1978). Em 1985, os receptores P2 foram subclassificados com base na farmacologia e na distribuição tecidual em mais duas famílias: P2Y acoplado à proteína G e P2X canal aberto controlado por ligante (Burnstock; Kennedy, 1985). Cerca de uma década depois, uma nova classificação foi proposta baseada na estrutura molecular, além dos critérios farmacológicos, descrevendo os P2Y como receptores metabotrópicos dividido em 8 subtipos e o P2X receptor ionotrópico com 7 subtipos (Abbracchio; Burnstock, 1994).

Entre os receptores da família P2X, o receptor P2X7 (P2X7R) se destaca por suas peculiaridades. Inicialmente classificado como P2Z devido às suas características estruturais distintas dos demais receptores P2X, esse receptor foi encontrado inicialmente em linfócitos e mastócitos (Gordon, 1986). O P2X7R é um receptor ativado por ligante, que, ao ser ativado pelo ATP, forma um canal catiônico formado por 3 subunidades. Uma das hipóteses sobre seu mecanismo de ação sugere que sua ativação ocorre de forma progressiva, em que a ligação de uma única subunidade leva a sua ativação e, quando os seus três sítios ativos estão ocupados pelo ligante, essa ativação estabiliza o estado aberto da estrutura (Gusic; Benndorf et al., 2021). Sendo o P2X7R um canal catiônico, sua abertura permite o fluxo de íons K^+ , Na^+ e Ca^{2+} seguindo o gradiente eletroquímico (North, 2002). Em determinadas células foi descrito que a alta concentração de ATP promove a abertura de um macroporo permeável não seletivo a moléculas de até 900 Daltons (Webb et al., 1993). Sua ativação está relacionada a respostas imunes como a eliminação de patógenos e liberação de citocinas pró ou anti-inflamatórias, proliferação celular, citólise e apoptose (Gusic; Benndorf et al., 2021).

Em condições de estresse como dano tecidual, tensão mecânica, hipóxia e inflamação estéril ou infecciosa, a liberação de ATP pode ser por seu próprio receptor purinérgico (Gordon 1986). Ao ser liberado ao meio extracelular, o que geralmente é um sinal de dano celular, o ATP pode superar concentrações que superam a escala de micromolar, agindo como um Padrão Molecular Associado ao Dano (DAMP) (Pelegri, 2021). A molécula de ATP é um DAMP vasto e eficiente, capaz de ativar receptores purinérgicos, como o P2X7R, e de atrair células imunes gerando uma resposta imunoestimuladora ou imunorreguladora (Ledderose, Bao et al. 2016, Adinolfi, Giuliani et al. 2018). A liberação do ATP no meio extracelular, por si só, é capaz de desencadear respostas como a quimiotaxia de neutrófilos (Che; Corriden et al., 2006), recrutamento de monócitos e macrófagos (Marques Silva; Burnstock et al., 2011)

1.4. Relação entre hematopoese e sinalização purinérgica

Nas células hematopoéticas, sabe-se que o P2X7R é expresso nas CTH e nas células maduras, além de ser encontrado em células dos nichos hematopoéticos como osteoblastos e osteoclastos (Filippin; de Souza et al., 2020). Estudos anteriores do grupo mostraram que a sinalização purinérgica do ATP e adenosina difosfato (ADP) ativam o receptor purinérgico P2Y1 em células progenitoras eritroides murinas, provocando um aumento de Ca^{2+} intracelular (Paredes-Gamero; Craveiro et al.; 2006). Estudos subsequentes evidenciaram que as citocinas Interleucina 3 (IL-3) e o CSF-GM levam ao aumento discreto da concentração de cálcio citoplasmático ($[Ca^{2+}]_{cit}$), desencadeando a proliferação de células mieloides. Por outro lado, um aumento maior de $[Ca^{2+}]_{cit}$ foi observado após a sinalização de ATP e seus análogos levando à diferenciação de progenitores em granulócitos (Paredes-Gamero; Leon et al., 2008). As citocinas IL-3 e CSF-GM também iniciam as vias de sinalização a partir do aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$ em células-tronco e progenitoras hematopoéticas murinas e humanas (Leon; Barbosa et al., 2011). O estímulo de células mieloides murinas com os fatores de crescimento CSF-M e CSF-G levou à diferenciação de macrófagos e granulócitos (Barbosa, Bincoletto et al. 2014). Outro estudo mostrou a função do ATP na diferenciação das CTH murinas e que esses efeitos ocorrem principalmente através do aumento da $[Ca^{2+}]_{cit}$. O

tratamento com ATP reduziu o número de CTH e células progenitoras mieloides e aumentou as células maduras (Barbosa; Leon et al., 2011).

Visto as linhas de pesquisas relacionando hematopoese, diferenciação mielóide pela ativação de receptores purinérgicos, buscou-se comparar as diferenças existentes entre modelos murinos *wild type* (WT) e P2X7-ko a fim de compreender melhor o comportamento das células hematopoéticas apenas na presença e ausência de P2X7. Viu-se se há diferença na quantidade de células de medula óssea desses animais e analisar diferenças funcionais entre os animais, seguindo os objetivos e metodologias a serem descritas no trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a participação do receptor P2X7 na hematopoese murina comparando as populações e diferenças funcionais das células hematopoéticas em animais normais (*wild type*) e P2X7 *knockout* (P2X7-ko).

2.2 Objetivos específicos

- Comparar por imunofenotipagem as populações hematopoéticas, na medula óssea dos animais WT e P2X7-ko;
- Mensurar parâmetros hematológicos nas amostras de sangue periférico dos animais WT e P2X7-ko;
- Avaliar a capacidade formadora de colônia de células da medula óssea de animais WT e P2X7-ko;
- Investigar as alterações do estado redox no plasma dos animais WT e P2X7-ko;
- Quantificar os níveis de citocinas inflamatórias no plasma dos animais WT e P2X7-ko.

3 METODOLOGIA

Foram usadas linhagens de camundongos C57BL/6 *wild type* (WT) e P2X7 *knockout* (P2X7-ko) (Jackson Laboratory) alocados em laboratório no Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia na Universidade Federal de São Paulo (CEDEME-UNIFESP). Todos os animais foram machos com idade entre 8-10 semanas e foram mantidos nas condições laboratoriais ideais, ou seja, sala com temperatura e umidade controladas, ciclo claro-escuro de 12 h, regime alimentar com ração comercial padrão e água à vontade. Nos momentos pré-cirúrgicos para coleta de tecidos, foram contidos, anestesiados via intraperitoneal com 100 µL de cetamina e xilazina diluídas em soro fisiológico 2:1:3, e eutanasiados por deslocamento cervical. O descarte do animal só se deu após confirmação da morte através da observação de falta de movimento respiratório (apneia) e cardíaco (assistolia). Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética da UNIFESP (Processo: nº 2871070119) e seguem as diretrizes éticas da pesquisa animal.

3.1. Isolamento da medula óssea femoral e sangue periférico

A coleta de cerca de 1 mL de sangue periférico foi feita por punção cardíaca em seringa de 3 mL previamente lavada com EDTA 10%. Para extração das células de medula óssea dos fêmures, os ossos foram localizados e retirados com auxílio de tesouras e pinças cirúrgicas esterilizadas, limpos em PBS estéril, seguido por segmentação das epífises de maneira transversal e *flush* do canal interno medular com seringa de 5 mL e agulha 21G, com PBS (para os experimentos em citometria de fluxo) ou com meio de cultura IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium - Sigma™) com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico penicilina (para cultivo celular). O tecido da medula óssea foi filtrado em 2 ml de PBS para realizar a contagem de células em câmara de Neubauer. Foram usadas um milhão (1×10^6) de células para cada marcação a serem esclarecidas no item 3.2. e todos os materiais foram mantidos em gelo, enquanto necessário, para continuar os procedimentos a serem descritos a seguir.

3.2. Imunofenotipagem de CTH, progenitores e células maduras

A quantificação das CTH murinas foi realizada marcando as células de medula óssea com anticorpos conjugados com fluoróforos do quadro 1, de acordo com a fenotipagem de cada população. Imediatamente após coleta, de acordo com protocolo vigente no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), revisado pelo orientador deste trabalho, as células isoladas foram marcadas em quantidade 1×10^6 por tubo, com os anticorpos por 30 min no gelo e escuro e lavadas com PBS. Realizou-se leitura em citômetro de fluxo BD Accuri™ c6, onde 500 mil eventos foram adquiridos para as populações de CTH e progenitores e 50 mil eventos foram adquiridos para as populações maduras. Uma quantidade excedente da medula óssea foi separada com tampão de lise 1:1 para posterior avaliação do estado redox, conforme item 3.5.

QUADRO 1. Painel de anticorpos e seus respectivos fluoróforos utilizados neste estudo.

Populações células primitivas						Pop. células maduras			
CTH		PGL		PGM		mieloides		linfoides	
Lin -	PE	Lin -	PE	Lin -	PE	Gr-1	PE CF 594	Gr-1	FITC
CD135	PE	CD127	AF488	CD127	PE	CD11b Mac-1	APC-Cy7	CD11b Mac-1	PE CF594
CD90	FITC	CD90	PE	CD34	FITC	Ter-119	PE	CD3	APC-Cy 7
Sca-1	PE-Cy7	Sca-1	PE-Cy 7	CD16	APC	F4/80	FITC	B220	PE
c-Kit	APC	c-Kit	APC	Sca-1	PE				
				c-Kit	APC-H7				

3.3. Análise sangue periférico

Em 500 uL da amostra a fresco do sangue mantido em gelo, foram medidos parâmetros como a quantificação de células brancas, células vermelhas, hemoglobina, hematócitos e plaquetas. A análise foi realizada em analisador hematológico veterinário ABX Micros ABC Vet - Horiba ABX™. Para a coloração

diferencial e análise morfológica de leucócitos, fez-se esfregaço sanguíneo em lâminas com coloração de May-Grünwald Giemsa. Ambos os ensaios foram realizados em colaboração com o Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da USP. A outra metade da amostra foi separada para usar somente plasma na avaliação do estado redox.

3.4. Determinação do potencial clonogênico e identificação de colônias

Este ensaio nos permite avaliar a quantidade e tipos de unidades formadoras de colônias (CFU) formadas pelas células primitivas da medula óssea em um meio de cultura semisólido (MethoCult M3434, Stemcell Technologies™) contendo: metilcelulose em meio de cultura IMDM, soro fetal bovino, albumina sérica bovina, insulina, transferrina (saturada de ferro), 2-mercaptoetanol, SCF, IL-3, IL-6, eritropoietina (EPO). Conforme as instruções do fabricante, foram utilizadas placas de 35 mm contendo 1,1 mL de metilcelulose suplementada, onde foram adicionadas 2×10^4 células. Foi realizada uma abundante homogeneização das células ao meio. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 14 dias. A contagem do número de colônias foi realizada em microscópio óptico invertido. Foram quantificados os precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM), granulócitos (CFU-G), macrófagos (CFU-M), eritrócitos (CFU-E) e granulócitos, eritrócitos, macrófagos, megacariócitos (CFU-GEMM), além do número total de colônias.

3.5. Avaliação do estado redox

Com o restante do material coletado conforme itens anteriores, o sangue total foi centrifugado a 2500 rpm por 10 min. Transferiu-se somente o plasma do sangue para outros microtubos, congelando-o a -80°C juntamente com o excedente de material da medula óssea em tampão de lise, até posterior uso, já no laboratório de Biologia Molecular da UFMS. A avaliação do estado redox foi feita por dois parâmetros: determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) e quantificação de substâncias que reagem ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com ambas as amostras.

3.5.1. Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

A reação necessária para avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) consiste na catálise do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela MPO, da qual foi liberado oxigênio que oxida a o-dianisidina e forma uma substância de coloração rosa (Gomes; G.B et al., 2023), útil para avaliação de nível de inflamação ou ativação imune de neutrófilos. As amostras do plasma e medula óssea foram misturadas com solução reagente de acordo com protocolo do Laboratório de Hematologia da UFMS: tampão fosfato monobásico 50 mM contendo o-dianisidina 2HCl ($0,167 \text{ mg/ml}^{-1}$) e H_2O_2 (0.0005%). Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 150 μL da solução reagente e 20 μL das amostras. Após 15 min de incubação, a atividade enzimática foi interrompida adicionando-se 30 μL de azida sódica 1%. Após 10 min, a absorbância foi lida em espectrofotômetro Varioskan™ LUX - Thermo Scientific™ a 450 nm. Os valores da absorbância adquiridos foram calculados e expressos em mU/ml^{-1} .

3.5.2. Quantificação de substâncias que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para avaliar o dano à membrana celular causado pelo estresse oxidativo, quantificou-se o malonaldeído produzido na lipoperoxidação do plasma e da medula, a ser analisado através do método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Gomes; G.B et al., 2023). Quando a peroxidação lipídica acontece, há perda da seletividade na troca iônica da membrana, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos como o malonaldeído, resultando em morte celular. Centrifugou-se as amostras a 10000 rpm por 5 min para precipitação das proteínas e teste foram realizados de acordo com protocolo vigente em Laboratório de Hematologia Clínica da UFMS: 20 μL do sobrenadante foi adicionado a um tubo de ensaio contendo 1 mL de TCA 12%. No controle branco foi utilizado H_2O destilada. Após vigorosa homogeneização em vórtex, foram adicionados ao tubo 900 μL de TRIS-HCL 60 mM, homogeneizado novamente e adicionado 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,76%. Na sequência, os tubos contendo a solução foram tampados e ficaram em banho maria por 60 min em alta temperatura (entre 85°C e

100°C). Ao final do tempo, foi realizado um banho de gelo para resfriar os tubos, que em seguida foram centrifugados a 4000 rpm por 5 min. A seguir, 200 µL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços e a absorbância foi lida no espectrofotômetro Varioskan™ LUX - Thermo Scientific™ a 540 nm. Os valores de absorbâncias adquiridos foram calculados e expressos em nmol/mL⁻¹.

3.6. Quantificação de citocinas inflamatórias por CBA

As seguintes citocinas pró-inflamatórias foram avaliadas a partir do plasma coletado dos animais: IL-6, proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e fator de necrose tumoral (TNF). Para a quantificação simultânea dessas três citocinas, foi usado o *kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Inflammation* (BD Biosciences™), que utiliza a citometria de fluxo para detecção das citocinas presentes em amostras de plasma. As amostras foram previamente retiradas do ultrafreezer (-80°C) e descongeladas em gelo. Para a curva padrão de oito pontos, foi realizada uma diluição seriada a partir da solução *Mouse Inflammation Standards* do kit. O mix contendo as três *beads* de ligação às três citocinas foi preparado e distribuído nos microtubos para em seguida adicionar se as amostras da curva padrão ou plasma. O reagente de detecção contendo o fluoróforo PE foi adicionado ao mix e os tubos foram incubados ao abrigo da luz por 2 h em temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as amostras foram lavadas com tampão, centrifugadas 200G por 5 min e após descartar o sobrenadante, ressuspendeu-se com 300 µL de tampão para leitura no citômetro de fluxo CytoFLEX Flow Cytometer, Beckman Coulter™. Os dados obtidos da curva padrão foram usados para definir as concentrações das citocinas nas amostras.

3.7. Análise estatística

Os dados de citometria foram analisados no *software* FlowJo (Three Stars, Inc) e apresentados como número total de células. O *software* GraphPad Prism v8.0 analisou e forneceu os gráficos dos resultados em anexo. Todos os resultados foram analisados pelo teste não paramétrico “U” (Mann-Whitney). Valores de p<0,05 foram considerados significantes sendo marcados em asteriscos.

4 RESULTADOS

4.1. Animais P2X7-ko têm aumento de CTH, GMP e granulócitos

As amostras de animais P2X7-ko mostram algumas diferenças na distribuição das populações hematopoiéticas em relação às amostras dos animais WT: houve aumento significativo do número de CTH dos animais P2X7-ko (Figura 1-A). Já as células progenitoras totais (c-Kit⁺) não apresentaram diferenças, como visto na Figura 1-B. Dentre as células mieloides primitivas, há os progenitores mieloides comuns (CMP) dos quais se originam dois grupos: progenitores de granulócitos e macrófagos (GMP) e progenitores de megacariócitos e eritrócitos (MEP). Houve um aumento significativo apenas na população GMP nos animais P2X7-ko em relação aos animais WT (Figura 2-A). Em relação às populações linfoides, viu-se um aumento significativo nas células progenitoras linfoides (PGL) dos animais P2X7-ko (Figura 2-B).

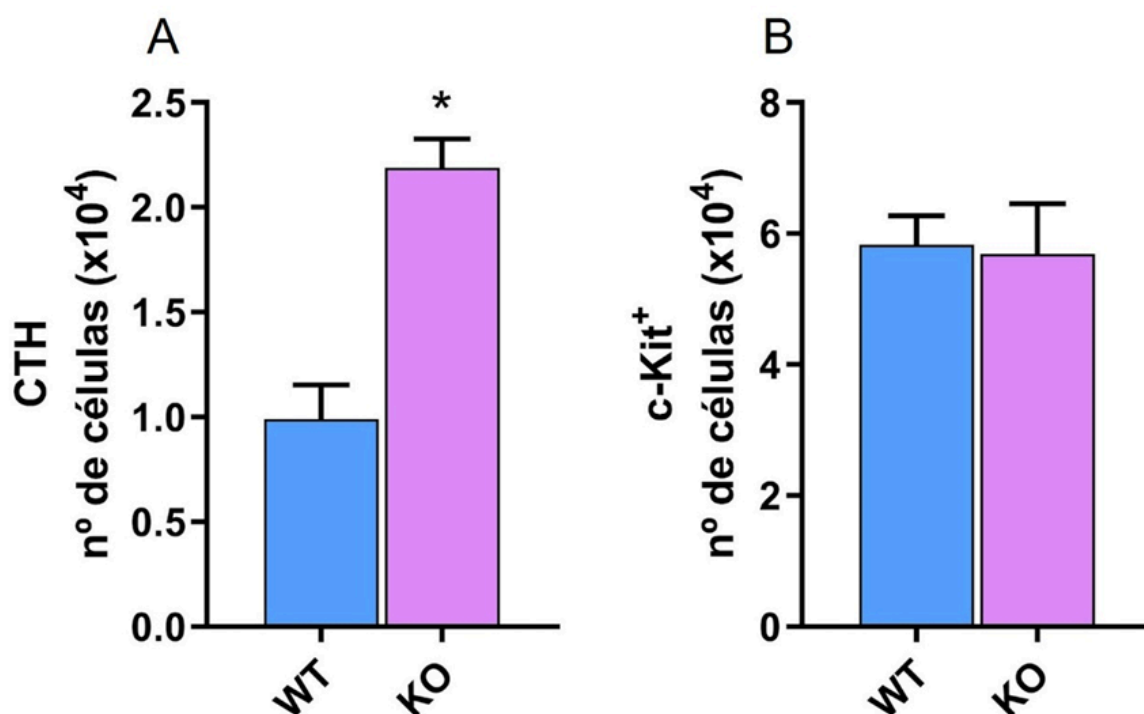


Figura 1: Quantificação de CTH e células progenitoras em animais WT e P2X7-ko. Células da medula óssea foram coletadas para imunofenotipagem das populações hematopoéticas dos animais WT e P2X7-ko. As células foram marcadas com anticorpos e a leitura foi realizada por citometria de fluxo. (A)CTH e (B)c-Kit⁺. Os dados são apresentados como número absoluto de células hematopoéticas da MO. Os valores são a média \pm erro padrão. Teste não paramétrico "U" (Mann-Whitney). * p <0,05. N = 5 a 8 animais por grupo.

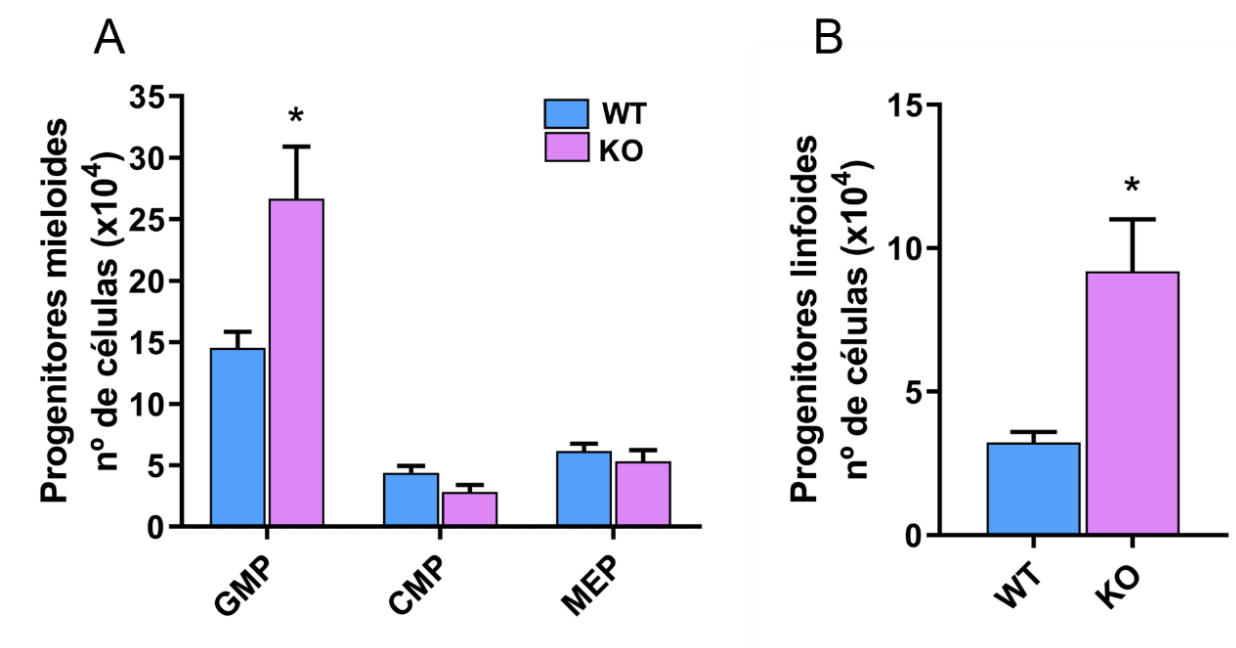


Figura 2: Quantificação de progenitoras mieloides e linfoides em animais WT e P2X7-ko. Células da medula óssea foram coletadas para imunofenotipagem das populações hematopoéticas dos animais WT e P2X7-ko. As células foram marcadas com anticorpos e a leitura foi realizada por citometria de fluxo. Número absoluto de células hematopoéticas da MO (A) PGM e B) PGL. Os valores são a média \pm erro padrão. teste não paramétrico "U" (Mann-Whitney). * p <0,05. N = 5 a 8 animais por grupo.

Na comparação das populações maduras, foi constatado um aumento significativo dos granulócitos (Mac⁺Gr1⁺) e monócitos (F480⁺Mac1⁺) nos animais P2X7-ko, enquanto os eritrócitos (Ter119⁺) estavam em menor quantidade, conforme Figura 3-A. A população de linfócitos B (B220⁺) permaneceu inalterada, assim como os linfócitos T (CD3⁺) de acordo com Figura 3-B:

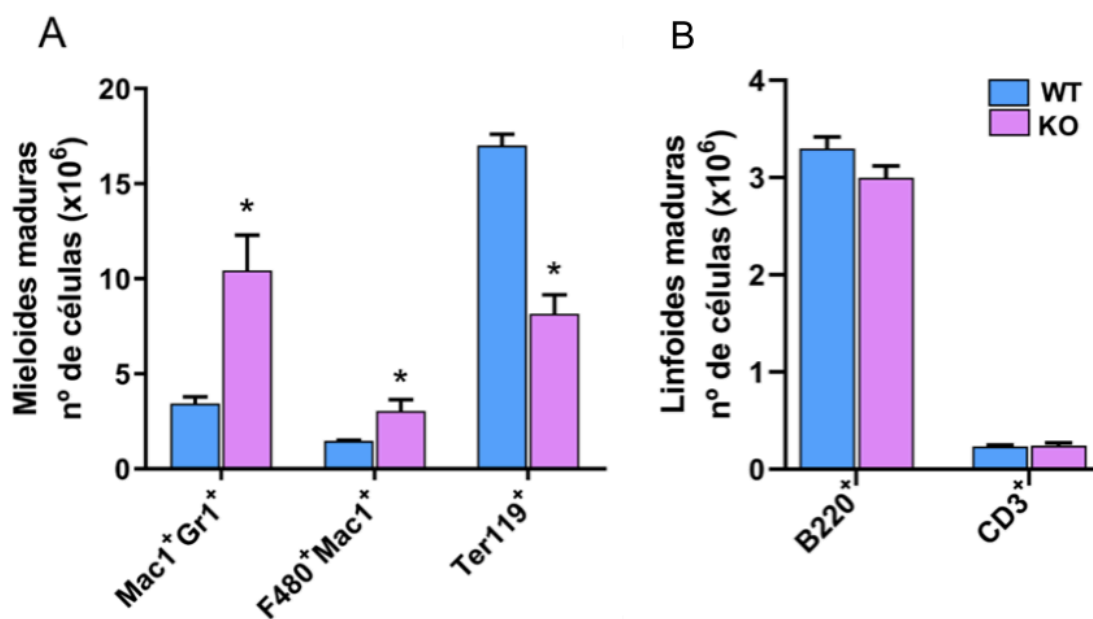


Figura 3: Quantificação de células maduras em animais WT e P2X7-ko. Células da medula óssea foram coletadas para imunofenotipagem das populações hematopoéticas dos animais WT e P2X7-ko. As células foram marcadas com anticorpos e a leitura foi realizada por citometria de fluxo. Número absoluto de células hematopoéticas da MO (A) mieloides maduras e (B) linfoides maduras. Os valores são a média \pm erro padrão. teste não paramétrico “U” (Mann-Whitney). * $p < 0,05$. N = 5 a 8 animais por grupo.

4.2. Animais P2X7-ko não apresentam alterações hematopoéticas funcionais

Foram avaliados os parâmetros hematológicos dos animais, incluindo hematócrito (Ht), hemoglobina (Hb), plaquetas (PLT), glóbulos vermelhos (RBC) e glóbulos brancos (WBC). Todos estes parâmetros foram semelhantes nos animais WT e P2X7-ko (Figura 4 A-E). A análise de coloração diferencial também foi realizada para determinar as proporções de neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e monócitos, mas não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 5 A-D).

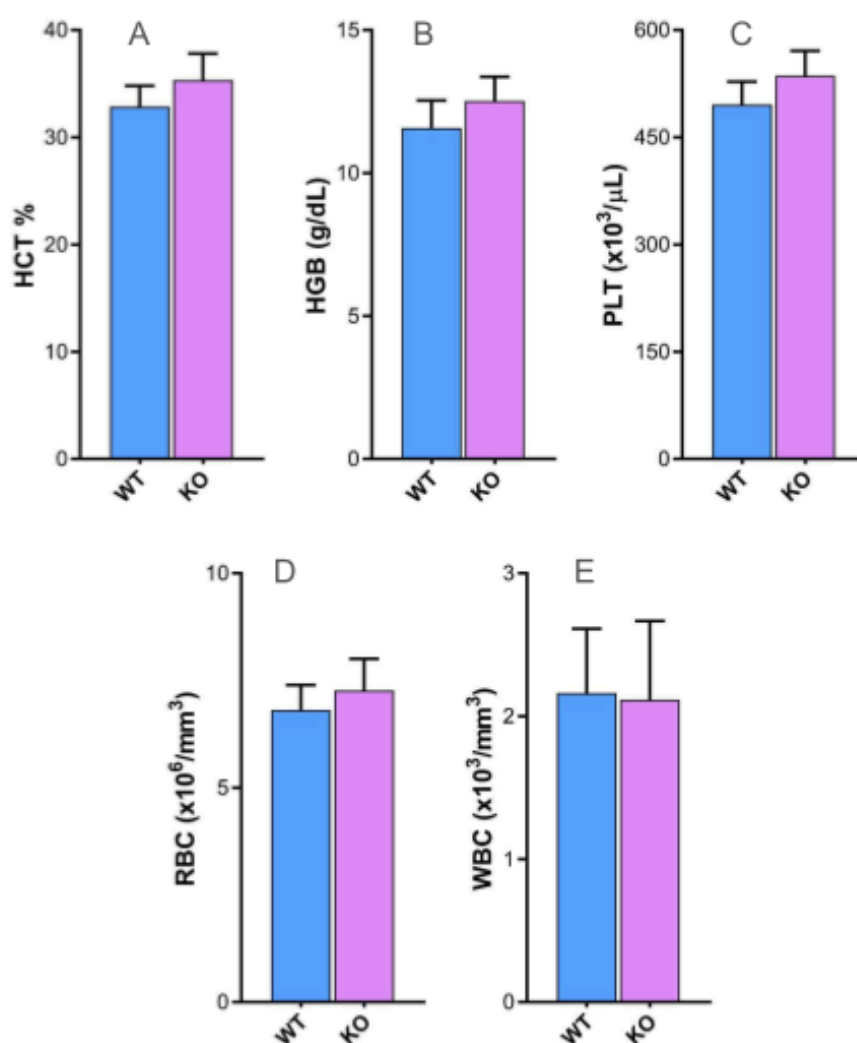


Figura 4: Análise hematológica em animais WT e P2X7-ko. O sangue periférico foi coletado por punção cardíaca, em EDTA 10% e avaliado em analisador hematológico. Os parâmetros (A)Ht, hematócrito; (B)Hb, hemoglobina; (C)PLT, plaquetas; (D)RBC, *Red Blood Cells* e (E)WBC, *White Blood Cells*, foram avaliados. Os valores são a média \pm erro padrão. Teste não paramétrico “U” (Mann-Whitney). * $p < 0,05$. N = 5 a 8 animais por grupo.

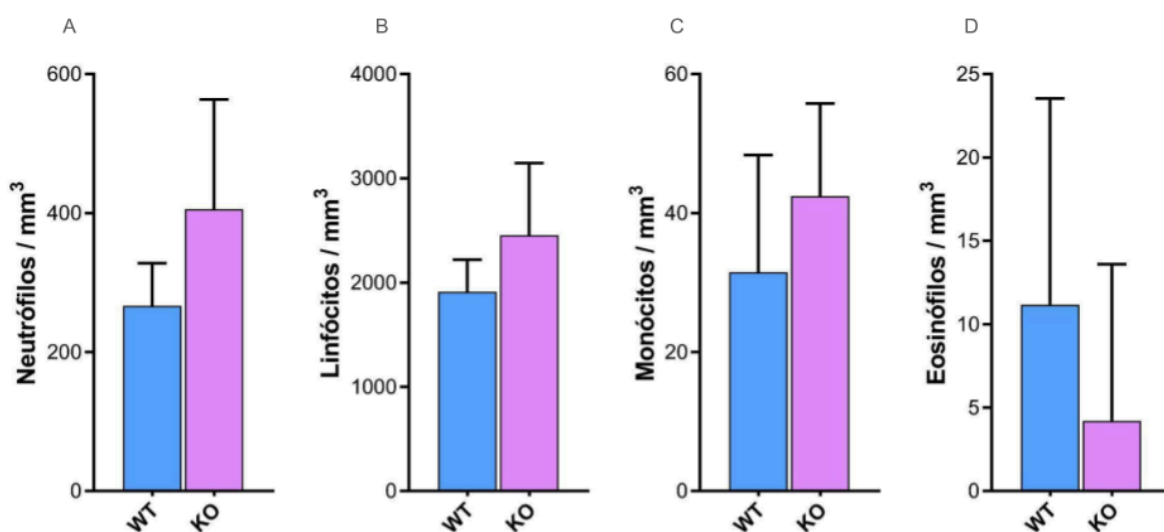


Figura 5: Coloração diferencial de leucócitos em animais WT e P2X7-ko. Esfregaços foram realizados e a contagem foi realizada em microscópio ótico. 100 células foram contadas. Os números de leucócitos encontrados no sangue periférico dos animais estão apresentados em milímetro cúbico. Os valores são a média \pm erro padrão. Teste não paramétrico “U” (Mann-Whitney). * $p < 0,05$. N = 5 a 8 animais por grupo.

A seguir, para investigar diferenças funcionais na hematopoese, foi realizada a avaliação das colônias formadas após o plaqueamento de células da medula óssea. O estímulo com citocinas têm a capacidade de originar colônias de células progenitoras de CFU-GM, CFU-G e CFU-M e CFU-GEMM. Não foram identificadas diferenças significativas nas contagens de colônias totais e específicas entre animais WT e P2X7-ko como visto na Figura 6.

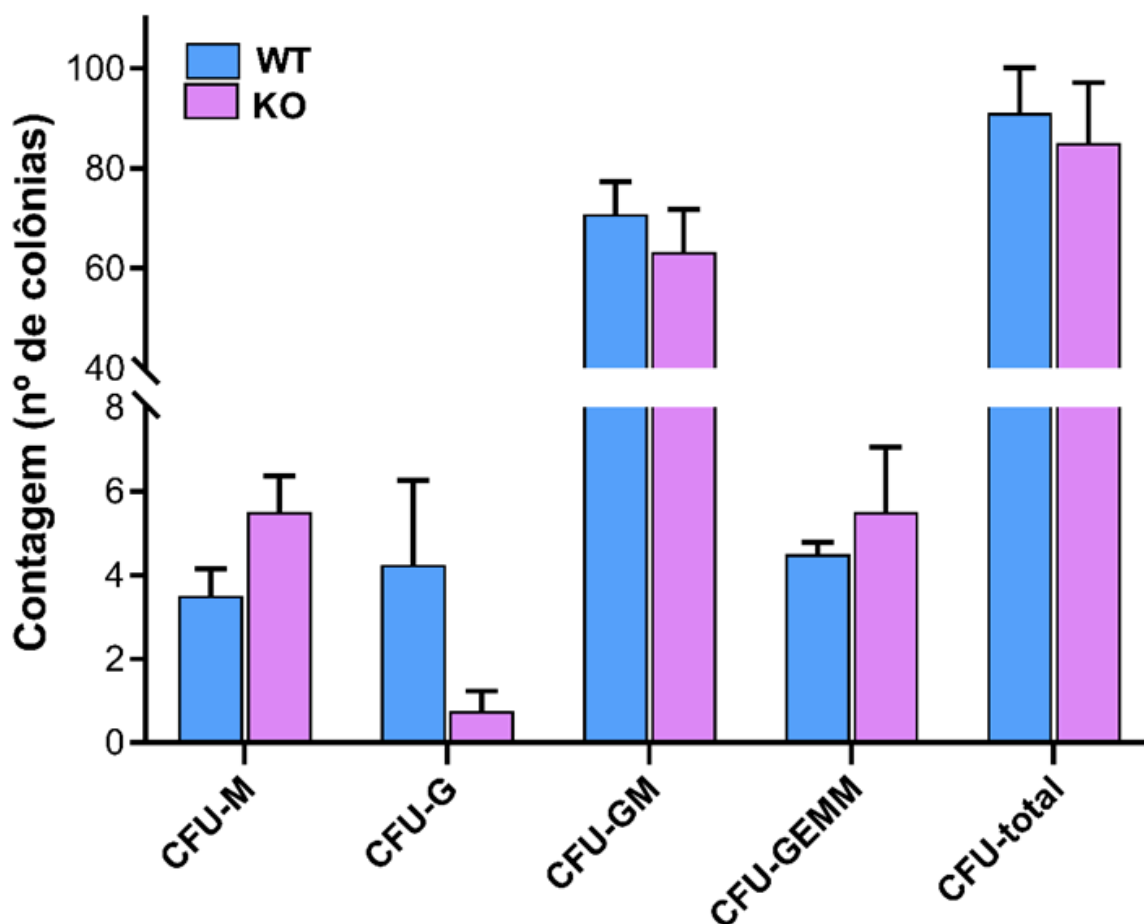


Figura 6: Contagem de colônias em animais WT e P2X7-ko. Células da medula óssea (2×10^4) foram plaqueadas em metilcelulose com citocinas por 14 dias para quantificação de unidades formadoras de colônias (CFU), incluindo CFU-GM (granulócitos e macrófagos), CFU-G (granulócitos), CFU-M (macrófagos), CFU-GEMM (granulócitos, eritrócitos, monócitos e megacariócitos) e colônias totais. Os valores são a média \pm erro padrão. Teste não paramétrico “U” (Mann-Whitney). * $p < 0,05$. N = 5 a 8 animais por grupo.

4.3. Animais P2X7-ko não apresentam alterações no estado redox

A análise de estado redox na hematologia se refere à avaliação do equilíbrio entre as reações de oxidação e redução nas células sanguíneas. Quando há algum tipo de perturbação de equilíbrio, espécies reativas de oxigênio (EROS) se acumulam nos tecidos e podem ser quantificadas, neste caso, através dos métodos MPO e TBARS no sangue periférico e na medula óssea dos animais. Altos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico no tecido indicam peroxidação lipídica,

ou seja, dano à membrana celular, enquanto a ativação da enzima mieloperoxidase caracteriza uma condição pró-oxidativa quando liberada por neutrófilos (Loria et al., 2007). Em ambos os materiais em ambos os ensaios, não houve diferença significativa entre os grupos de animais WT e P2X7-ko, como visto na Figura 7 A e B.

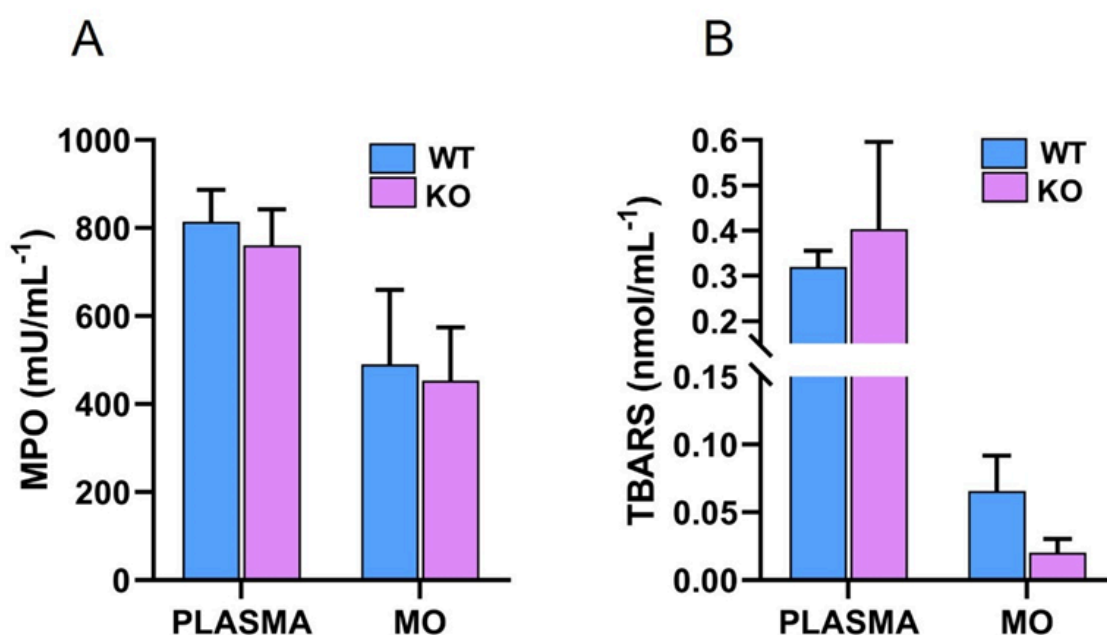


Figura 7: Estado redox em animais WT e P2X7-ko. A absorvância das amostras de plasma e medula óssea foram avaliadas em espectrofotômetro. A) Atividade de MPO, a absorvância foi medida a 450 nm. B) Níveis de TBARS, a absorvância foi medida a 540 nm. Os valores são a média \pm erro padrão. Teste não paramétrico “U” (Mann-Whitney). * $p < 0,05$. N = 5 a 8 animais por grupo.

4.4. Animais P2X7-ko não têm alteração na liberação de citocinas

A quantificação das citocinas inflamatórias é um importante método para compreensão e avaliação do desempenho da comunicação entre os moduladores celulares. Neste sentido, as citocinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e MCP-1, foram quantificadas no plasma dos animais, sem diferenças significantes na liberação de citocinas entre os animais WT e P2X7-ko (Figura 8).

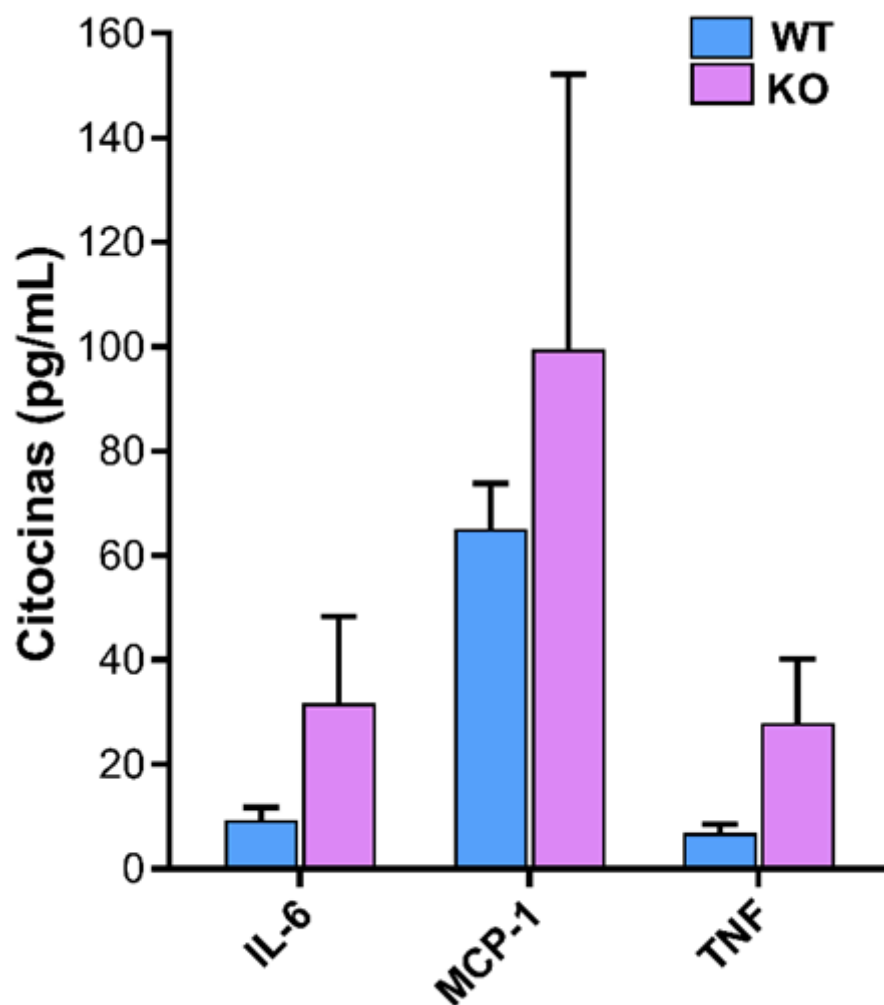


Figura 8: Níveis de citocinas inflamatórias em animais WT e P2X7-ko. Citocinas inflamatórias foram quantificadas no plasma dos animais. A quantificação foi realizada por citometria de fluxo utilizando *beads* e anticorpos específicos. Os valores são a média \pm erro padrão. Teste não paramétrico “U” (Mann-Whitney). * $p < 0,05$. N = 5 a 8 animais por grupo.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, tenta-se entender um pouco mais sobre os mecanismos que levam à modulação das células hematopoéticas maduras e primitivas, avaliando o papel intrínseco do P2X7R dentro do processo de hematopoese. De fato, este receptor é encontrado tanto nas células hematopoéticas, quanto nas células presentes nos nichos hematopoéticos, atuando como reguladoras deste sistema (Filippin; de Souza et al., 2020). Por isso, avaliaram-se as porcentagens das populações hematopoéticas entre os animais WT e P2X7-ko, sem nenhum tipo de estímulo. Escolheu-se analisar a própria medula óssea, que abriga os nichos hematopoéticos habituais e foi visto que as porcentagens de CTH, GMP, granulócitos e monócitos nos animais P2X7-ko aumentaram (Figuras 1A e 2A). Nosso grupo anteriormente mostrou que o estímulo de receptores P2 com ATP reduziu a porcentagem de CTH e GMP e aumentou os granulócitos *in vivo e in vitro*, promovendo a diferenciação mielóide (Barbosa; Leon et al., 2011). Progenitores mielóides e linfóides, bem como células mielóides maduras aumentaram em animais P2X7-ko porém, os eritrócitos diminuíram e os linfócitos permaneceram inalterados (Figuras 2 e 3), assim como o potencial clonogênico (Figura 4). É importante ressaltar que as divergências nas proporções de células encontradas na medula óssea dos animais P2X7-ko não afetaram as proporções de células maduras no sangue periférico, já que os leucócitos e os parâmetros hematológicos foram semelhantes em animais WT (Figura 5).

Além da modulação de CTH, vários estudos evidenciam o papel imunomodulador do P2X7R ao influenciar tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa, o que repercute nas funções das células imunes em processos inflamatórios estéreis e infecciosos (Di Virgilio; Falzoni et al., 1998). A análise do estado redox por meio das metodologias de MPO e TBARS em animais saudáveis *knockout* para o P2X7R pretendia investigar potenciais alterações basais no equilíbrio oxidativo associadas à ausência deste receptor. Considerando o papel do P2X7R na modulação da resposta imune, produção de espécies reativas de oxigênio e diferenciação celular, sua ausência pode impactar diretamente a ativação de neutrófilos (avaliada por MPO) e os níveis de peroxidação lipídica (avaliada por TBARS), mesmo na ausência de estímulos inflamatórios ou infecciosos. Contudo,

neste estudo não houve diferenças significantes no estado redox ou na liberação de citocinas inflamatórias.

Outros estudos têm mostrado a correlação do P2X7R e P2X4R, outro subtipo de receptor P2X predominante expresso pelas células do sistema imunológico. Um deles avaliou a co-expressão e função destes receptores em células epiteliais alveolares, onde o *knockdown* do P2X7R levou à regulação proteica positiva do P2X4R, e o contrário também foi observado, sugerindo um mecanismo compensatório entre estes receptores (Weinhold; Krause-Buchholz et al., 2010), já que o P2X4R foi relatado por ter funções parecidas com o P2X7R e também está envolvido na regulação da hematopoese (Adamiak; Bujko et al., 2022).

Em suma, apesar das diversas conclusões em diversos estudos sobre o papel do P2X7R, a função inerente apenas à sua ausência ou presença na modulação de CTH e diferenciação mieloide não foi tão relevante. É preciso outras análises para pesquisar mais profundamente uma justificativa para diferenças encontradas nas populações hematopoéticas, principalmente nas CTH e não nos outros testes deste trabalho. Ao nos depararmos com as correlações de outro receptor purinérgico ionotrópico, será necessário avaliar os mecanismos compensatórios que possam existir entre estes grupos, a fim de definir com mais clareza seu papel na hematopoese e no sistema imune.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMIAK, M. K. et al.** The P2X4 purinergic receptor has emerged as a potent regulator of hematopoietic stem/progenitor cell mobilization and homing—a novel view of P2X4 and P2X7 receptor interaction in orchestrating stem cell trafficking. *Stem Cells*, v. 36(1): 248256. 2022
- ABBRACCHIO, M. P.; BURNSTOCK, G.** Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacology & Therapeutics*, v. 64, n. 3, p. 445–475, 1994.
- BARBOSA, C. M. V. et al.** PLC γ 2 and PKC are important to myeloid lineage commitment triggered by M-SCF and G-CSF. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 115, n. 1, p. 42–51, 2014.
- BARBOSA, C. M. et al.** Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines. *Cell Death Dis.* 2011 Jun 2;2(6):e165. doi: 10.1038/cddis.2011.49. PMID: 21633388; PMCID: PMC3168991.
- BIRBRAIR, A.; FRENETTE, P. S.** Niche heterogeneity in the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1370, p. 82–96, 2016.
- BURNSTOCK, G.** A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: *Cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach*. New York: Raven Press, 1978.
- BURNSTOCK, G.** Purinergic nerves. *Pharmacological Reviews*, v. 24, n. 3, p. 509–581, 1972.
- BURNSTOCK, G.; KENNEDY, C. J.** Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *General Pharmacology: The Vascular System*, v. 16, n. 5, p. 433–440, 1985.
- CENARIU, D. et al.** Extramedullary hematopoiesis of the liver and spleen. *Journal of Clinical Medicine*, v. 10, n. 24, p. 5831, 2021.
- COUTINHO-SILVA, R.; PERSECHINI, P. M.** P2Z purinoceptor-associated pores induced by extracellular ATP in macrophages and J774 cells. *American Journal of*

Physiology, p. 1793–1800, 1997.

DI VIRGILIO F. S. Purinergic P2X7 receptor: a pivotal role in inflammation and immunomodulation. 45(3-4): 207213. 1998

FILIPPIN, K. J. et al. Involvement of P2 receptors in hematopoiesis and hematopoietic disorders, and as pharmacological targets. *Pharmaceutical Sciences*, v. 16, p. 1–15, 2020.

FREEDMAN, M. H.; SAUNDERS, E. F. Hematopoiesis in the human spleen. *American Journal of Hematology*, v. 11, n. 3, p. 271–275, 1981.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Heterotopic of bone marrow: Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, v. 6, n. 2, p. 230–247, 1976.

GOMES, G. B. et al. Selenylated Imidazo [1,2-a]pyridine induces apoptosis and oxidative stress in 2D and 3D models of colon cancer cells. *Pharmaceuticals*, v. 16, p. 814, 2023.

GORDON, J. L. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochemical Journal*, v. 233, n. 2, p. 309, 1986.

GUSIC, M. et al. Dissecting activation steps in P2X7 receptors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 569, p. 112–117, 2021.

HEFFNER, G. C. et al. Prostaglandin E2 increases lentiviral vector transduction efficiency of adult human hematopoietic stem and progenitor cells. *Molecular Therapy*, v. 26, p. 320–328, 2018.

LEON, C. M. et al. Requirement for PLC γ 2 in IL-3 and GM-CSF-stimulated MEK/ERK phosphorylation in murine and human hematopoietic stem/progenitor cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 226, n. 7, p. 1780–1792, 2011.

McCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiation Research*, v. 14, n. 2, p. 213–222, 1961.

MORRISON, S. J.; KIMBLE, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*, v. 441, 2006.

MURGIA, M. et al. Oxidized ATP. An irreversible inhibitor of the macrophage purinergic P2Z receptor. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, p. 8199–8203, 1993.

NOGUEIRA-PEDRO, A. et al. Nitric oxide-induced murine hematopoietic stem cell fate involves multiple signaling proteins, gene expression, and redox modulation. *Stem Cells*, v. 32, p. 2949–2960, 2014.

NOGUEIRA-PEDRO, A. et al. α -Tocopherol induces hematopoietic stem/progenitor cell expansion and ERK1/2-mediated differentiation. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 90, n. 6, p. 1111–1117, 2011.

PAREDES-GAMERO, E. J. et al. Activation of P2Y1 receptor triggers two calcium signaling pathways in bone marrow erythroblasts. *European Journal of Pharmacology*, v. 534, n. 1–3, p. 30–38, 2006.

PAREDES-GAMERO, E. J. et al. Changes in intracellular Ca^{2+} levels induced by cytokines and P2 agonists differentially modulate proliferation or commitment with macrophage differentiation in murine hematopoietic cells. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 46, p. 31909–31919, 2008.

PRONK CJ, VEIBY OP, BRYDER D, JACOBSEN SE. Tumor necrosis factor restricts hematopoietic stem cell activity in mice: involvement of two distinct receptors. *J Exp Med*. 2011 Aug 1;208(8):1563-70. doi: 10.1084/jem.20110752. Epub 2011 Jul 18. PMID: 21768269; PMCID: PMC3149225.

SAVIO, L. E. B.; COUTINHO-SILVA, R. Immunomodulatory effects of P2X7 receptor in intracellular parasite infections. *Current Opinion in Pharmacology*, v. 47, p. 53–58, 2019.

SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, v. 241, n. 4861, p. 58–62, 1988.

SZADE, K. et al. Where hematopoietic stem cells live: the bone marrow niche.

Antioxidants & Redox Signaling, 2018. Epub ahead of print.

TAK, T. et al. What's your age again? Determination of human neutrophil half-lives revisited. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 94, n. 4, p. 595–601, 2013.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TANIGUCHI, H. et al. Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nature Medicine*, v. 2, n. 2, p. 198–203, 1996.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 1998.

TYURIN-KUZMIN, P. et al. Flow cytometry analysis of adrenoceptors expression in human adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *Scientific Data*, v. 5, p. 180196, 2018.

WEBB, T. E. et al. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Letters*, v. 324, p. 219–225, 1993.

WEISS, D. J.; TAYLOR, D. A. Stem cells and regenerative medicine. In: PRINCIPLES OF REGENERATIVE MEDICINE. San Diego: Academic Press, 2008. p. 111–127.

WEINHOLD, K. U. et al. Interaction and interrelation of P2X7 and P2X4 receptor complexes in mouse lung epithelial cells. *Sciences*, 2010.

WILEY, J. S. et al. Partial agonists and antagonists reveal a second permeability state of human lymphocyte P2Z/P2X7 channel. *American Journal of Physiology*, v. 275, p. 1224–1231, 1998.

Coleta de células de medula óssea cresce 8% no Brasil. Gov.br, 2024. Disponível em <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2024/dezembro/coleta-de-celulas-d-e-medula-ossea-cresce-8-no-brasil>. Acesso em: 20 de maio de 2025.