UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

EVERTON DE BRITO OLIVEIRA COSTA

**Caracterização das células-tronco/progenitoras
hematopoéticas obtidas de células-tronco embrionárias
humanas *in vitro* em sistema de co-cultivo com fibroblastos
de embriões murinos**

RIBEIRÃO PRETO

2012

EVERTON DE BRITO OLIVEIRA COSTA

Caracterização das células-tronco/progenitoras hematopoéticas
obtidas de células-tronco embrionárias humanas *in vitro* em
sistema de co-cultivo com fibroblastos de embriões murinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Genética da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Genética Geral

Orientadora: Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO OU DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Everton de Brito Oliveira

Caracterização das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas de células-tronco embrionárias humanas *in vitro* em sistema de co-cultivo com fibroblastos de embriões murinos / Everton de Brito Oliveira Costa; Orientadora Aparecida Maria Fontes. – Ribeirão Preto, 2012.

138p. : il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Genética. Área de concentração: Genética

1. Célula progenitora hematopoética; **2.** Célula-tronco embrionária humana; **3.** Hemangioblasto; **4.** Endotélio hemogênico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Everton de Brito Oliveira Costa

“Caracterização das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas de células-tronco embrionárias humanas *in vitro* em sistema de co-cultivo com fibroblastos de embriões murinos”.

Dissertação apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre.
Área de concentração: Genética Geral

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, à memória do meu pai **Luiz dos Santos Costa**, que muitas vezes eu vi transformando o suor do seu trabalho e lágrimas em força de vontade para que seus filhos tivessem a oportunidade que ele não teve, de estudar, formar-se, e ser “alguém na vida”. E, embora não tenha participado em matéria dos meus momentos de alegria de bacharelado e agora de mais esta etapa na minha longa jornada, tenho certeza que muito próximo a mim, ele compartilha da minha felicidade!

Dedico também este trabalho, em especial, aos bens mais preciosos que tenho. Minha mãe **Maria Geilda de Brito Oliveira Costa**, meu irmão **Welison de Brito Oliveira Costa**, e ao meu companheiro e amigo **Esmael da Silva Leôncio**, que são meus pilares de sustentação, que me fazem agradecer a Deus todos os dias por tê-los em minha vida e para os quais eu vivo e busco sempre um futuro melhor!

A toda a minha família, que sempre me apoiou em todos os momentos da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas**, agradeço por ter aberto as portas da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto e pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa

A minha orientadora, a **Profa. Dra. Aparecida Maria Fontes**, pela confiança e preciosa ajuda para com meu crescimento profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Genética**, pelo excelente Departamento, por todo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e pela contribuição para com a minha formação profissional. Em especial a Susi e a Sílvia, por toda a ajuda com a parte burocrática que sempre realizaram com competência e destreza.

A **Maristela Delgado Orellana**, por todo carinho, presteza e confiança contruídos ao longo destes anos, à qual tenho profunda admiração pela sua dedicação e profissionalismo.

A **Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto** onde este trabalho foi realizado, e a todos que dela fazem parte, pela companhia diária.

As minhas queridas amigas do Laboratório de Terapia Celular, **Karina Solano, Sâmia Rigotto Caruso, Taísa Risque Fernandes e Priscilla Carnavale**, pela ajuda e pela convivência diária, as quais tornaram o ardor do trabalho diário muito mais prazeroso. Muito obrigado por tudo meninas!

Aos demais integrantes do Laboratório de Terapia Celular, **Hudson Bezerra, Amanda e Aline**, e a **todos** que por lá passaram e com os quais tive a oportunidade de conviver e desfrutar da companhia. Saudades **Aline Bueno, Natália Girola, Sharon Del Bem, Fabiene...**

A **Dra. Danielle Aparecida Rosa de Magalhães** por todo carinho, companheirismo e pela indispensável ajuda em todos os momentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

As minhas amigas do Laboratório de Biotecnologia, **Lilian Figueiredo, Luiza Junqueira, Aline Bomfim, Marcela Freitas, Felipe, Ana Paula, Florência, Camila e Marina** pela companhia diária e preciosa ajuda durante a execução deste trabalho.

A **Dra. Simone Kashima**, pela amizade e pela preciosa ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho e com as análises de expressão gênica.

A **Dra. Virgínia Wagatsuma** pela preciosa ajuda durante os experimentos de expressão gênica e pela amizade.

As meninas do Laboratório de Citometria de Fluxo, **Camila, Patrícia, Daiane e Carmem**, que me suportaram arduamente com meus “arrays” (rs) para análises de imunofenotipagem e por terem me ensinado muitas coisas sobre citometria.

Ao **Dr. Lindolfo da Silva Meirelles**, pelas discussões e dicas que facilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Ao integrantes do Laboratório de Transferência Gênica, **Ângelo, Daianne, Larissa, Andrielle** pela amizade. Em especial ao **Lucas Eduardo Botelho** e **Ricardo Bonfim Silva**, também pela amizade e por toda ajuda as análises dos dados e com os experimentos com animais.

A **Josiane** do Laboratório de Imunohistoquímica e a **Maria Rosa** do Laboratório de Anemias Hereditárias pela amizade e preciosa ajuda nos meus momentos de desespero.

As meninas do Laboratório de Banco de Sangue de Cordão Umbilical, **Aline Garcia, Natália** e **Rafaela** pela amizade e pela ajuda com os experimentos de avaliação clonogênica.

A Dra. **Karen de Lima Prata**, pela amizade e pelos momentos de discussão que muito me acrescentaram.

Ao pessoal do **Laboratório de Biologia Molecular**, pela amizade e ajuda prestada nos momentos de dúvida.

A **Dra. Lúcia Regina Martelli**, por ter aberto as portas do seu Laboratório para que pudessem ser realizadas as análises citogenéticas.

A técnica **Lucimar** do laboratório da Profa. Lúcia, pela indispensável ajuda nas análises citogenéticas.

Ao **Dr. Fábio Morato**, que muito me ajudou também com as análises citogenéticas.

A todos os demais **Pesquisadores do Hemocentro de Ribeirão Preto**, pelo companheirismo e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

As agências de fomento **FAPESP, CNPq, CAPES e FINEP** pelo suporte financeiro e bolsa, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

A **TODOS** que direta ou indiretamente estiveram envolvidos no desenvolvimento deste trabalho.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”

Charles Chaplin

RESUMO

COSTA, E. B. O. **Caracterização das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas de células-tronco embrionárias humanas *in vitro* em sistema de co-cultivo com fibroblastos de embriões murinos.** Dissertação (Mestrado) – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2012, 138f.

A hematopoese tem sido bem descrita em modelos murinos nas últimas décadas, contudo, trabalhos demonstrando os mecanismos da hematopoese em humanos ainda são escassos. A derivação da primeira linhagem de células-tronco embrionárias humanas (CTEhs) em 1998, gerou novas perspectivas tanto para o estudo da hematopoese na tentativa de mimetizar o que ocorre naturalmente durante o desenvolvimento embrionário, quanto para a aplicação clínica das células hematopoéticas obtidas a partir da diferenciação dessas células. Contudo, apesar de inúmeros trabalhos terem demonstrado a obtenção de células hematopoéticas a partir de CTEhs, os protocolos têm gerado quantidades variáveis de células, com baixa eficiência e com propriedades funcionais de células primitivas. Desse modo, este trabalho procurou estabelecer um modelo próprio de diferenciação de CTEhs-H1 em células progenitoras hematopoéticas para que estas pudessem ser melhor caracterizadas e obtidas de forma mais eficiente. Para isto, foi desenvolvido um sistema de diferenciação baseado no co-cultivo da linhagem de CTEh-H1 com fibroblastos de embrião de camundongo (MEFs), em meio de diferenciação suplementado soro fetal bovino (SFB) e citocinas e fatores de crescimento hematopoéticos em baixas concentrações. Como resultado, o desenvolvimento do presente trabalho permitiu o estabelecimento de um método para geração de populações mistas de células enriquecidas em CPHs positivas para o marcador CD45, o qual mostrou ser coexpresso com outros marcadores hematopoéticos (CD31, CD43, CD71 e CD38), e células hematopoéticas maduras positivas para marcadores mielóide-específicos (235a, CD14, CD15, CD16) e com características morfológicas típicas. Foi demonstrado que as células obtidas expressavam genes relativos ao sistema hematopoético (*CD45*, *CD31*, *runx1*, *tall1*, *lmo2*, *prom1*, *CD34* e *notch1*), e possuíam potencial clonogênico *in vitro* da ordem de 1/574 células plaqueadas. Em adição, corroboramos os achados de que as células hematopoéticas apresentam duas origens distintas: a partir do endotélio hemogênico e a partir de células com propriedades hemangioblásticas independentes do endotélio hemogênico.

Palavras-Chaves: **1.** Célula progenitora hematopoética; **2.** Célula-tronco embrionária humana; **3.** Hemangioblasto; **4.** Endotélio hemogênico.

ABSTRACT

COSTA, E. B. O. **Characterization of hematopoietic stem/progenitor cells obtained *in vitro* from human embryonic stem cells in co-culture system with mouse embryonic fibroblasts.** Dissertação (Mestrado) – Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2012.

Hematopoiesis has been well described in murine models in recent decades, however, studies demonstrating the mechanisms of hematopoiesis in humans are still scarce. The first human embryonic stem cells line (hESCs) derived in 1998, has generated new perspectives about the study of hematopoiesis as in attempting to mimic what naturally occurs during embryonic development, as for clinical application of hematopoietic cells obtained from the differentiation of these cells. However, although numerous studies have shown the production of hematopoietic cells derived from hESCs, the protocols have generated varying quantities of cells with low efficiency and functional properties of primitive stem cells. Thus, this study sought to establish our own model for hESC-H1 differentiation in hematopoietic progenitor cells so that they could be better characterized and obtained more efficiently. For this way, we developed a differentiation system based on co-culture of hESC-H1 line with inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) in differentiation medium supplemented with fetal calf serum (FCS) and cytokines and hematopoietic growth factors in low concentrations. As a result, the development of this study allowed the establishment of a method for generation of mixed population of cells enriched in hematopoietic progenitor cells positive for the marker CD45, which proved to be co-expressed with other hematopoietic markers (CD31, CD43, CD71 and CD38), and mature hematopoietic cells positive for myeloid-specific markers (CD33a, CD14, CD15, CD16) and morphological characteristics typical. It was shown that these cells expressed genes related to the hematopoietic system (CD45, CD31, runx1, TAL1, LMO2, prom1, CD34 and NOTCH1), and had clonogenic potential *in vitro* of 1/574 plated cells. In addition, we corroborate the findings that hematopoietic cells have two distinct origins: they can arise as from an hemogenic endothelium as from cells with hemangioblastic properties by an hemogenic endothelium-independent way.

Key-words: 1. Hematopoietic progenitor cells; 2. Human embryonic stem cell; 3. Hemangioblast; 4. Hemogenic endothelium.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1: Diferenciação das CTHs em células hematopoéticas maduras.....	24
Figura 2: Rotas migratórias das células hematopoéticas que conectam os diferentes sítios fetais.....	29
Figura 3: Órgãos hematopoéticos nos embriões murino e humano.....	30
Figura 4: Estabelecimento do <i>pool</i> de CTHs definitivas em embriões murinos e humanos.....	31
Figura 5: Modelo esquemático do isolamento e cultivo das CTEhs.....	33
Figura 6: Mecanismos do surgimento das células hematopoéticas a partir do endotélio hemogênico.....	34
Figura 7: Potenciais relações entre as células hematopoéticas e endoteliais durante o desenvolvimento.....	35
Figura 8: Fluxograma esquemático ilustrando as atividades experimentais desenvolvidas neste trabalho.....	57
Figura 9: Perfil imunofenotípico das CTEhs para marcadores de pluripotência.....	59
Figura 10: Perfil imunofenotípico das CTEhs para marcadores hematopoéticos, endoteliais e mesenquimais.....	60
Figura 11: Morfologia das CTEhs em cultura.....	62
Figura 12: Características morfológicas das CTEhs.....	62
Figura 13: Caracterização citogenética da linhagem de CTEh H1 (WA01) recebida da WiCell em P23.....	63
Figura 14: Avaliação do potencial pluripotente das CTEhs <i>in vitro</i>	63
Figura 15: Avaliação do potencial pluripotente das CTEhs <i>in vivo</i>	64
Figura 16: Caracterização morfológica das MEFs.....	65
Figura 17: Avaliação imunofenotípica das MEFs para marcadores de células hematopoéticas humanas.....	66
Figura 18: Caracterização morfológica da diferenciação hematopoética via endotélio hemogênico.....	68
Figura 19: Surgimento das CTHs via endotélio hemogênico-independente.....	69
Figura 20: Caracterização imunofenotípica das células obtidas das colônias em diferenciação no 17º dia (D+17) e 24º dia (D+24).....	71
Figura 21: Caracterização imunofenotípica das células obtidas das colônias em diferenciação no 17º dia (D+17) e 24º dia (D+24).....	72

	Página
Figura 22: Caracterização morfológica das células hematopoéticas presentes nas colônias de CTEhs aos 24 dias (D+24) de diferenciação.....	73
Figura 23: Formação de zonas de eritropoese.....	74
Figura 24: Proliferação de células progenitoras hematopoéticas no sobrenadante do cultivo durante a diferenciação.....	75
Figura 25: Caracterização imunofenotípica das células hematopoéticas do sobrenadante do meio de cultivo aos 19 dias de diferenciação (D+19).....	76
Figura 26: Caracterização das células do sobrenadante para marcadores hematopoéticos não-específicos.....	78
Figura 27: Caracterização das células do sobrenadante para marcadores da linhagem mielóide.....	79
Figura 28: Caracterização das células do sobrenadante para marcadores da linhagem eritróide.....	80
Figura 29: Caracterização das células do sobrenadante para marcadores da linhagem linfóide.....	81
Figura 30: Caracterização das células do sobrenadante para marcadores de células progenitoras hematopoéticas primitivas.....	83
Figura 31: Avaliação da coexpressão de marcadores hematopoéticos em células CD45 ⁺ coletadas do sobrenadante do meio de diferenciação.....	84
Figura 32: Marcação para o antígeno de superfície KDR em células coletadas das colônias em diferenciação aos 17 dias.....	85
Figura 33: Marcação para os antígenos de superfície CD45 e CD31 em células coletadas do sobrenadante no 24º dia de diferenciação.....	86
Figura 34: Marcação para o antígeno de superfície CD43 em células coletadas do sobrenadante no 24º dia de diferenciação.....	87
Figura 35: Marcação para os antígenos de superfície CD90 e CD31 em células coletadas do sobrenadante no 24º dia de diferenciação.....	87
Figura 36: Marcação para o antígeno de superfície CD235a em células coletadas do sobrenadante no 24º dia de diferenciação.....	88
Figura 37: Análise citológica do sobrenadante no 19º (A) e 24º (B) dias de diferenciação.....	89
Figura 38: Análise morfológica das células do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de células da linhagem neutrofílica.....	89
Figura 39: Análise morfológica das células do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de células precursoras mielomonocíticas.....	90

Figura 40: Análise morfológica das células do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de células da linhagem eosinofílica.....	90
Figura 41: Análise morfológica das células do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de células da linhagem basofílica.....	91
Figura 42: Análise morfológica das células do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de megacariócitos.....	91
Figura 43: Análise morfológica das células do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de células da linhagem granulocítica com morfologia anormal.....	92
Figura 44: Unidades Formadoras de Colônias hematopoéticas (CFUs) originadas a partir da população de células obtidas das colônias aos 17 dias de diferenciação.....	93
Figura 45: Unidades Formadoras de Colônias hematopoéticas (CFUs) originadas a partir da população de células isoladas do sobrenadante aos 19 dias de diferenciação.....	93
Figura 46: Quantificação das CFUs geradas in vitro pelas populações de células obtidas das colônias diferenciadas e do sobrenadante do sistema de diferenciação.....	94
Figura 47: CTEhs em P38 utilizadas na diferenciação e as células progenitoras hematopoéticas delas derivadas apresentaram cariótipo 46, XY normal.....	95
Figura 48: Avaliação cariotípica das CTEhs P42 (A) e das células progenitoras hematopoéticas após a diferenciação (B).....	96
Figura 49: Avaliação cariotípica das CTEhs P40.....	96
Figura 50: Células progenitoras hematopoéticas derivadas de CTEhs não apresentam potencial teratogênico.....	98
Figura 51: Análise da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento das células hematopoéticas.....	101

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 – Descrição dos genes analisados por RT-PCR em Tempo Real.....	53
Tabela 2 – Imunofenotipagem das CTEhs para marcadores hematopoéticos e mesenquimais.....	61
Tabela 3 – Imunofenotipagem das CTEhs para marcadores hematopoéticos	62
Tabela 4 – Expressão dos marcadores hematopoéticos nos dias 40, 46 e 51 de diferenciação.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM	Aorta-gônada-mesonefros
BFU-E	do inglês “ <i>burst forming-unit erythroid</i> ”
BL-CFCS	do inglês “ <i>blast colony-forming cells</i> ”
BMP4	do inglês “ <i>bone morphogenetic protein-4</i> ”
cDNA	do inglês, “ <i>complementary desoxiribonucleic acid</i> ”
CFU-F	do inglês, “ <i>colony forming unit-fibroblast</i> ”
CFU-S	do inglês, “ <i>colony forming unit-spleen</i> ”
CFU-GEMM	do inglês, “ <i>colony forming unit – granulocytes, erythrocytes, macrophages and megakaryocytes</i> ”
CFU-GM	do inglês, “ <i>colony forming unit – granulocytes and macrophages</i> ”
CFU-M	do inglês, “ <i>colony forming unit –macrophages</i> ”
Ct	do inglês, “ <i>cycle threshold</i> ”
CTH	célula-tronco hematopoética
CTEs	Células-tronco embrionárias
CTEhs	Células-tronco embrionárias humanas
CTEmS	Células-tronco embrionárias murinas
DAPI	do inglês, “ <i>dihidrocloreto de 4,6 diamino-2-fenilindol</i> ”
DMEM	do inglês, “ <i>Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium</i> ”
DMSO	dimetilsulfóxido
dNTP	desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminoteracético
EPO	Eritropoietina
FGF	do inglês, “ <i>fibroblast growth factor</i> ”
FGFB	do inglês, “ <i>fibroblast growth factor, basic</i> ”
FITC	do inglês, “ <i>fluorescein isothiocyanate</i> ”
FL	do inglês, “ <i>fetal liver</i> ”
FLT3L	do inglês, “ <i>fms-related tyrosine kinase 3ligand</i> ”
GAPDH	do inglês, “ <i>glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i> ”
GCSF	do inglês, “ <i>granulocyte colony-stimulating factor</i> ”
GMCSF	do inglês, “ <i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> ”
IGF-I	do inglês, “ <i>insulin-like growth factor-I</i> ”
IL	interleucina
KDR	do inglês, “ <i>kinase insert domain containing receptor</i> ”
MCSF	do inglês, “ <i>macrophage colony-stimulating factor</i> ”
MO	medula óssea
NK	do inglês, “ <i>natural killer</i> ”
NOD/SCID	do inglês, “ <i>nonobese diabetic severe combined immunodeficient</i> ”

OCT-4	do inglês, “ <i>octamer-binding protein 4</i> ”
PBS	do inglês, “ <i>phosphate buffered saline</i> ”
PCR	do inglês, “ <i>polymerase chain reaction</i> ”
PE	do inglês, “ <i>phycoeritrin</i> ”
PerCP	do inglês, “ <i>peridinin chlorophyll</i> ”
PI	do inglês, “ <i>propidium iodide</i> ”
qPCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real quantitativa
RPMI	meio “ <i>Roswell Park Memorial Institute</i> ”
RT	do inglês, “ <i>reverse transcriptase</i> ”
RUNX2	do inglês, “ <i>run-related transcription factor 2</i> ”
SCF	do inglês, “ <i>stem cell factor</i> ”
SCID	do inglês, “ <i>severe combined immunodeficiency</i> ”
SCUP	sangue de cordão umbilical e placentário
SDF	do inglês, “ <i>stromal derived factor</i> ”
SOX2	do inglês, “ <i>SRY [sex determining region Y]-box 2</i> ”
SP	sangue periférico
SSEA	do inglês, “ <i>stage-specific embryonic antigens</i> ”
URE	unidade relativa de expressão
VEGF	do inglês, “ <i>vascular endothelial growth factor</i> ”

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 O sistema hematopoético.....	23
1.1.1 Células-tronco hematopoéticas: sua descoberta e caracterização.....	23
1.1.2 A hematopoese em murinos.....	27
1.1.3 O desenvolvimento hematopoético em humanos.....	29
1.2 Células-tronco embrionárias humanas como modelo de desenvolvimento.....	31
1.2.1 Origem e natureza das células-tronco embrionárias humanas.....	31
1.2.2 Evidências do hemangioblasto e o desenvolvimento hematopoético a partir de células-tronco embrionárias humanas.....	33
1.3 Células pluripotentes como fonte alternativa de células sanguíneas.....	37
1.3.1 O transplante de células-tronco hematopoéticas.....	37
1.3.2 Capacidade funcional das células progenitoras hematopoéticas derivadas de células-tronco embrionárias humanas.....	37
1.3.3 Perspectivas futuras da medicina transfusional e terapia celular.....	39
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral.....	43
2.2 Objetivos específicos.....	43
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1 Aspectos éticos.....	45
3.2 Isolamento e cultura primária das MEFs.....	45
3.3 Cultivo e expansão das células-tronco embrionárias humanas.....	46
3.3.1 Isolamento enzimático das células-tronco embrionárias humanas.....	46
3.4 Ensaio de formação de corpos embrióides.....	47
3.5 Diferenciação das células-tronco embrionárias humanas em células hematopoéticas.....	47
3.6 Análises morfológicas.....	48
3.7 Contagem de células em câmara de Neubauer.....	48
3.8 Avaliação do potencial clonogênico das células progenitoras hematopoéticas obtidas de células-tronco embrionárias humanas em metilcelulose.....	49
3.9 Caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo.....	49

3.10 Ensaio de viabilidade celular.....	50
3.11 Análise por microscopia confocal.....	50
3.12 Extração e quantificação de RNA total.....	51
3.13 Avaliação da integridade do RNA.....	52
3.14 Transcrição reversa.....	52
3.15 RT-PCR em Tempo Real.....	53
3.16 Análise citogenética por bandamento GTG.....	54
3.17 Análise morfológica por coloração com Giemsa.....	55
3.18 Análise morfológica por coloração com May-Grunwald Giemsa.....	55
3.19 Ensaio de formação de teratomas.....	56
3.20 Análise estatística.....	56
4 RESULTADOS.....	59
4.1 Células-tronco embrionárias humanas expressam marcadores de pluripotência e são negativas para marcadores de células diferenciadas.....	59
4.2 Células-tronco embrionárias humanas apresentam características morfológicas de células diferenciadas.....	61
4.3 As células-tronco embrionárias humanas-matriz possuem cariótipo normal e propriedades de células pluripotentes <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	63
4.4 Características morfológicas e imunofenotípicas dos fibroblastos de embriões de camundongos.....	64
4.5 Células-tronco hematopoéticas surgem através de um endotélio hemogênico e espontaneamente em íntima relação com células mesenquimais/endoteliais-like....	67
4.5.1 Caracterização morfológica e imunofenotípica das colônias de células-tronco embrionárias humanas em diferenciação.....	69
4.6 As células-tronco hematopoéticas originadas no interior das colônias de células-tronco embrionárias humanas diferenciadas proliferam, diferenciam-se e formam uma população de células progenitoras hematopoéticas que crescem em suspensão.....	74
4.7 Células progenitoras hematopoéticas CD45 ⁺ coexpressam marcadores pan-hematopoéticos e hematopoéticos linhagem-específicos.....	84
4.8 Caracterização imunofenotípica das células progenitoras hematopoéticas por microscopia confocal.....	85

4.9 Caracterização morfológica das células progenitoras hematopoéticas isoladas do sobrenadante do sistema de diferenciação.....	88
4.10 As células progenitoras hematopoéticas derivadas de células-tronco embrionárias humanas apresentam potencial clonogênico <i>in vitro</i>.....	92
4.11 Células-tronco embrionárias humanas apresentam instabilidade cromossômica.....	94
4.12 Células progenitoras hematopoéticas derivadas de células-tronco embrionárias humanas não apresentam potencial teratogênico.....	97
4.13 Células progenitoras hematopoéticas derivadas de células-tronco embrionárias humanas expressam altos níveis de genes relacionados à hematopoese.....	99
5 DISCUSSÃO.....	103
6 CONCLUSÕES.....	120
7 REFERÊNCIAS.....	123

INTRODUÇÃO

1 Introdução

O conhecimento atual da biologia do desenvolvimento é fruto da somatória dos estudos dos embriologistas experimentais e geneticistas do desenvolvimento. Os primeiros visam à compreensão do desenvolvimento estudando as maneiras pelas quais as células e tecidos interagem para gerar uma estrutura multicelular, enquanto os geneticistas analisam o desenvolvimento em termos das ações dos genes.

Esses estudos se complementam e os resultados obtidos com os cinco principais organismos-modelo, entre eles, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Zebrafish*, *Xenopus laevis* e *Mus musculus*, têm permitido a obtenção do conhecimento atual das estratégias e dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento, que permitem a uma única célula gerar tamanha complexidade dos organismos.

Além disso, a derivação das células-tronco embrionárias humanas (CTEhs) a partir da massa celular interna de blastocistos humanos e os avanços obtidos com os estudos genômicos revolucionaram a biologia e a medicina, e tem revelado que embora muito da maquinaria básica do desenvolvimento é essencialmente a mesma, alguns mecanismos moleculares não são conservados, e o uso das CTEhs passa a adquirir um papel essencial nessas investigações.

A derivação da primeira linhagem de CTEhs por Thomson e colaboradores, em 1998, trouxe novas perspectivas para pesquisas sobre desenvolvimento humano, em especial, o desenvolvimento da hematopoese, pois possibilitou o estudo da ontogenia hematopoética a partir de células pluripotentes humanas como uma forma de mimetizar o que ocorre naturalmente no organismo humano. Além disso, a grande quantidade de estudos que empregaram estas células para gerar células-tronco e progenitoras hematopoéticas, e tipos celulares hematopoéticos maduros, tem gerado perspectivas também na área clínica, uma vez que substituiria e/ou minimizaria a necessidade de doares de sangue, como é feito na atual medicina transfusional.

Este trabalho demonstra o estabelecimento de um método baseado em sistema de co-cultivo da linhagem de CTEh-H1 com fibroblastos murinos, que permitiu a obtenção de populações enriquecidas de células progenitoras hematopoéticas e de células hematopoéticas maduras, abrindo a possibilidade da realização de novos estudos acerca da hematopoese, e contribuindo para o desenvolvimento de novas tecnologias visando à obtenção de células hematopoéticas linhagem-específicas aplicáveis à clínica.

1.1 O sistema hematopoético

Hematopoese é o termo usado para descrever o processo de formação das células sanguíneas, tanto nos estágios embrionários quanto nos organismos adultos. É também descrita como o processo de desenvolvimento, auto-renovação e diferenciação das Células-Tronco Hematopoéticas (CTHs), um tipo de célula-tronco somática que é responsável pela formação das células do sangue (Johnson e Moore, 1975). A hematopoese tem sido extensivamente descrita em modelos murinos, no entanto, estudos em modelos humanos são escassos. Sabe-se atualmente que muitos dos mecanismos da hematopoese, mas nem todos, são conservados entre diversas espécies. Dessa forma, busca-se o desenvolvimento de modelos ideais para o estudo da hematopoese humana, uma vez que nem sempre os fenômenos observados em modelos murinos podem ser transpostos aos humanos.

1.1.1 Células-tronco hematopoéticas: sua descoberta e caracterização

No início da década de 60, Till e McCulloch (1961) caracterizaram pela primeira vez as propriedades funcionais das Células-Tronco Hematopoéticas (CTHs). Seus estudos revelaram que uma pequena população de células presentes na MO, chamadas inicialmente de unidades formadoras de colônias esplênicas (CFU-S, do inglês, *Colony-Forming Unit-Spleen*), poderiam ser quantificadas no baço de camundongos letalmente irradiados após 7 a 14 dias de transplantadas.

Mais de 25 anos após a descoberta das CTHs, as tentativas de caracterização dessas células levaram à descoberta do marcador CD34 (Civin, Banquerigo *et al.*, 1987), e foi observado que uma população de células hematopoéticas ricas em CD34 possui potencial de diferenciação em todas as linhagens celulares sanguíneas (Strauss, Rowley *et al.*, 1986; Watt, Karhi *et al.*, 1987; Andrews, Singer *et al.*, 1990).

Em 1988, Berenson e colaboradores reportaram a reconstituição hematopoética em babuínos com células CD34⁺ obtidas da MO humana através do isolamento com um anticorpo anti-humano CD34 12.8. Investigações que isolaram CTHs CD34⁺ da MO murina, também demonstraram que essas células eram capazes de reconstituir o sistema hematopoético em camundongos letalmente irradiados (Krause, Ito *et al.*, 1994). Adicionalmente, estudos publicados entre os anos da divulgação dos trabalhos de Berenson e cols (1988) e Krause e cols. (1994), revelaram que a presença desse marcador nas células hematopoéticas é mais

ampla, sendo detectado em aproximadamente 5% das células mononucleares da MO em humanos adultos (Bender, Unverzagt *et al.*, 1991; Terstappen, Huang *et al.*, 1991; Baur, Meuge-Moraw *et al.*, 2000; Torlakovic, Langholm *et al.*, 2002), e em 5-10% na MO fetal (Huang e Terstappen, 1994), ou seja, esse marcador era expresso não somente nas CTHs, que são células raras na MO, representando aproximadamente $1/10^5$ células totais (Szilvassy, Humphries *et al.*, 1990), como também em uma gama de células hematopoéticas. A hierarquia de diferenciação do sistema hematopoético está representado na figura 1.

Figura 1 – Diferenciação das CTHs em células hematopoéticas maduras. O esquema representa a diferenciação hematopoética em tipos celulares maduros específicos e as diferentes combinações de fatores de crescimento necessárias à diferenciação. Adaptado de Lodish et al. (2003).

O grande impacto causado por estes estudos estabeleceram o padrão de que as CTHs seriam caracterizadas principalmente pela expressão do antígeno CD34 e repercutiram na área clínica, e desde então, os estudos clínicos começaram a utilizar e testar a multipotencialidade das células CD34⁺ para transplantes (Bensinger, Buckner *et al.*, 1996; Hassan, Zeller *et al.*, 1996; Link, Arseniev *et al.*, 1996; Kawano, Takaue *et al.*, 1998).

Contudo, ainda é muito pouco compreendida a função da molécula CD34 nas células hematopoéticas. Em murinos, CD34 parece estar relacionada com função de adesão ao estroma do microambiente hematopoético (Healy, May *et al.*, 1995), visto que camundongos CD34 mutantes demonstraram uma significativa diminuição no potencial de formação de

colônias hematopoéticas na MO, muito embora camundongos mutantes CD34^{-/-} não tenham exibido alterações significativas na contagem de células do sangue periférico quando comparados a camundongos controles, indicando que a expressão de CD34 não é um fator primordial para a hematopoese e que nem todas as CTHs expressam CD34 (Cheng, Baumhueter *et al.*, 1996).

Uma grande reviravolta nessa área da ciência foi causada pelos relatos de que células CD34⁻ isoladas da MO de camundongos apresentavam as mesmas propriedades biológicas e funcionais observadas nas CTHs CD34⁺. E, na contramão do que já havia sido publicado, quatro estudos importantes defendiam essa teoria. Osawa e cols. (1996) relataram que somente uma fração das células CD34⁻ da MO caracterizadas como CD34⁻Lin⁻Sca-1⁺c-kit⁺, eram capazes de promover a reconstituição hematopoética *long term* em camundongos letalmente irradiados. No entanto, quando eles cultivaram essas células CD34⁻ *in vitro* na presença das citocinas IL-11 e SCF, elas tornaram-se CD34⁺, e quando as células CD34⁺ foram transplantadas em modelos murinos, não foi possível detectar a presença do marcador CD34 entre as células transplantadas, indicando que as células CD34⁺ perdiam o fenótipo positivo e passavam a ser CD34⁻ (Osawa, Hanada *et al.*, 1996).

Corroborando essa hipótese, Goodell e colaboradores (1996, 1997) também demonstraram que a “verdadeira” população de CTHs em murinos (*side population*) residia na população de células apresentando fenótipo CD34^{-low}. Em humanos, quando isoladas células CD34⁻ da MO e transplantadas em camundongos, essa população de células CD34⁻ foi capaz de promover a enxertia *long term*, demonstrando também a existência de CTHs (Bhatia, Bonnet *et al.*, 1998; Zanjani, Almeida-Porada *et al.*, 1998). Não obstante, dois outros grupos de pesquisa, relataram que CTHs estariam presentes tanto em populações CD34⁺ quanto em populações CD34⁻ isoladas da MO de camundongos (Morel, Szilvassy *et al.*, 1996; Morel, Galy *et al.*, 1998; Donnelly, Zeltermann *et al.*, 1999). Esses estudos demonstraram que apesar do marcador CD34 ser amplamente expresso nas células do sistema hematopoético, as CTHs apresentam uma variação imunofenotípica, podendo ser positiva ou negativa para esse marcador.

Assim como inúmeros outros tipos celulares, as CTHs apresentam concomitantemente, a expressão de vários outros antígenos de superfície hematopoéticos. A ausência do marcador CD38 em células CD34⁺ tem sido associada às CTHs mais primitivas derivadas da MO, sangue de cordão umbilical (SCU) e fígado fetal (FL, do inglês, *Fetal Liver*) (Terstappen, Huang *et al.*, 1991; Cardoso, Li *et al.*, 1993; Muench, Cupp *et al.*, 1994; Reems e Torok-Storb, 1995). Outros estudos demonstraram que células CD34⁺Thy-1⁺

encontradas na MO fetal e adulta e no sangue periférico mobilizado, também são ricas em CTHs primitivas (Baum, Weissman *et al.*, 1992; Murray, Chen *et al.*, 1995). Contudo, investigações posteriores revelaram que ambas as populações celulares exibindo fenótipo $CD34^+CD38^-$ e $CD34^+Thy-1^+$ são altamente sobrepostas e representam, possivelmente, a mesma população de células (Olweus, Lund-Johansen *et al.*, 1994; 1995).

O antígeno CD33, por sua vez, tem sido considerado como um marcador de células hematopoéticas mielóides mais diferenciadas (Andrews, Singer *et al.*, 1989). No entanto, investigações demonstrando se o antígeno CD33 é um marcador de células mielóide mais diferenciada ou de outras linhagens celulares ainda são inconclusivos. A princípio, as CTHs da MO foram caracterizadas como sendo $CD34^+CD33^-$ (Olweus, Lund-Johansen *et al.*, 1994). Contudo, foi observado pelo mesmo grupo de pesquisa que o CD33 é altamente expresso em populações de células hematopoéticas $CD34^+CD38^{-/low}$ isoladas da MO fetal e adulta, ao passo que populações $CD34^+CD38^{-/low}CD33^{-/low}$ estão altamente comprometidas com o desenvolvimento em células da linhagem B (Olweus, Lund-Johansen *et al.*, 1994; 1995). A variação na expressão do marcador CD33 nestes estudos pode ser atribuída ao fato do isolamento e estudo de populações de células específicas, o que difere em sensibilidade e especificidade das análises imunofenotípicas de população total de células.

Foi demonstrado também que células $CD34^+$ com multipotencial hematopoético expressam baixos níveis de CD45-RA e CD71 (Lansdorp e Dragowska, 1992; Lu, Xiao *et al.*, 1993; Mayani, Dragowska *et al.*, 1993b; a), sendo que a população $CD34^+CD45-RA^{low}CD71^{low}$ representa uma maior e mais heterogênea população de células progenitoras quando comparadas às células $CD34^+Thy-1^+$ e $CD34^+CD38^-$ (Olweus, Lund-Johansen *et al.*, 1994). CD71 (receptor de transferrina) é um marcador altamente expresso em células da linhagem eritróide, identificadas como $CD34^{low}CD64^-CD71^{high}$, e em graus variáveis em diversas outras linhagens hematopoéticas na MO (Hirata, Bitterman *et al.*, 1986; Loken, Shah *et al.*, 1987; Lansdorp e Dragowska, 1992; Olweus, Terstappen *et al.*, 1996). Enquanto, CD64 é um antígeno expresso em células progenitoras mielóides primitivas, antecedendo a expressão do CD15 em progenitores de granulócitos e monócitos mais maduros (Olweus, Lund-Johansen *et al.*, 1995; Olweus, Terstappen *et al.*, 1996).

Outro marcador que tem sido comumente empregado na identificação das CTHs, o antígeno CD117 (*c-kit*/SCF-R), tem gerado resultados discrepantes em diversos trabalhos que o utilizaram (Orlic, Fischer *et al.*, 1993; Orlic, Anderson *et al.*, 1995), uma vez que CTHs já foram identificadas como sendo 117^{high} , 117^+ , $117^{médio}$, 117^{low} e 117^- (Papayannopoulou, Brice *et al.*, 1991; Gunji, Nakamura *et al.*, 1993; Berardi, Wang *et al.*, 1995; De Jong,

Wagemaker *et al.*, 1995; Sansilvestri, Cardoso *et al.*, 1995). Foi demonstrado que CD117^{high} é coexpresso com outros antígenos na população de células hematopoéticas CD34^{high}38^{low/-}, e também como sendo expresso em população de células CD34⁻ da MO com alto grau de comprometimento com a diferenciação eritróide (Olweus *et al.*, 1996).

Em conjunto, esses estudos demonstraram a evolução tecnológica junto ao desenvolvimento de novos anticorpos monoclonais tem colaborado muito nas tentativas de caracterização mais minuciosa das CTHs, e revelaram que o compartimento de CTHs é heterogêneo e provavelmente não exista uma única população de CTHs. Algumas explicações, no entanto, foram postuladas para justificar a grande diversificação na expressão das moléculas de superfície em CTHs, e entre elas estão variações na sensibilidade do anticorpo e na avaliação da intensidade do marcador, erros técnicos, viabilidade dos reagentes, e os diferentes conceitos aplicados à identificação das CTHs (Andrews, Singer *et al.*, 1989; Olweus, Lund-Johansen *et al.*, 1994).

1.1.2 A hematopoese em modelos murinos

Evidências oriundas de estudos da hematopoese durante a embriogênese em camundongos demonstram que as células sanguíneas surgem primeiramente no saco vitelino, e então as células precursoras mesodermas migram do mesoderma posterior para outras áreas do organismo, por um fenômeno muito semelhante à transição epitélio-mesenquimal (EMT, do inglês, *Epithelio-Mesenchymal Transition*) (Mcgrath e Palis, 2005). E são essas células precursoras mesodermas que darão origem às células hematopoéticas e endoteliais no saco vitelino (Belaousoff, Farrington *et al.*, 1998).

Ainda em murinos, por volta de 7 a 7 dias e meio de gestação (E7,0-7,5) formam-se no saco vitelino as chamadas “ilhas sanguíneas”, que consistem de aglomerados de células hematopoéticas circundadas por uma camada de células endoteliais (Baron, 2003; Lensch e Daley, 2004). Células eritróides primitivas são as primeiras a serem formadas dentro dessas ilhas sanguíneas (Kingsley, Malik *et al.*, 2004). Essas células eritróides primitivas são capazes de originar colônias de células eritróides quando cultivadas *in vitro*, e são, portanto, chamadas de Células Formadoras de Colônias Eritróides Primitivas (EryP-CFC, do inglês, *Primitive Erythroid Colony-Forming Cells*). Sendo que a capacidade de formação desse tipo de colônia por essas células pode ser detectada por volta do período E7,25 e é extinguida até o 9º dia (E9,0) (McGrath e Palis, 2005).

Posteriormente, o saco vitelino murino passa a ser constituído por macrófagos e megacariócitos primitivos, os quais são originados de células progenitoras monopotentes (Palis, Robertson *et al.*, 1999; Xu, Matsuoka *et al.*, 2001). Em estágio mais maduro, o saco vitelino torna-se rico em mastócitos, em progenitores de granulócitos/macrófagos e em progenitores eritróides definitivos. Se os progenitores mielóides são derivados dos mesmos precursores das células eritróides é uma questão ainda desconhecida, apesar de uma célula progenitora eritróide-megacariocítica bipotente ter sido caracterizada no saco vitelino de camundongos (Tober, Koniski *et al.*, 2007).

Interessantemente, foi observado que no saco vitelino murino, os progenitores eritróides e mielóides não diferenciam em células maduras. Para isso, essas células caem na circulação e se estabelecem no fígado fetal por volta do 8,5º dia (E8,5), onde completarão a maturação (McGrath e Palis, 2005). Somente após o estabelecimento da circulação sistêmica células com potencial linfóide e mielóide, bem como células com capacidade de enxertia *long-term* (CTHs mais primitivas) podem ser observadas no saco vitelino. No entanto, não se sabe ainda se essas células são geradas *in situ* ou se elas migram de outros sítios para o saco vitelino (McGrath e Palis, 2005; Tober *et al.*, 2007).

Não obstante, a geração de CTHs também foi demonstrada em sítios intraembrionários, indicando que a hematopoese em mamíferos pode ocorrer em ambos os sítios intra e extraembrionários (Cumano, Furlonger *et al.*, 1993; Medvinsky, Samoylina *et al.*, 1993; Godin, Dieterlen-Lievre *et al.*, 1995). A região aorta-gônada-esplâncnopleura que se desenvolve do mesoderma lateral intraembrionário em contato com o endoderma, dá origem à chamada região Aorta-Gônada-Mesonefros (AGM) no período E9.5 da gestação murina, onde foi observada a presença de CTHs (Cumano, Ferraz *et al.*, 2001).

A placenta de camundongos, assim como em humanos (Robin, Bollerot *et al.*, 2009), também foi demonstrada conter CTHs ativas aos 9 dias de gestação (E9.0), e a população de CTHs da placenta prolifera rapidamente entre os períodos E11.5 e E12.5. Como resultado, a placenta passa a conter aproximadamente 15 vezes mais CTHs quando comparada ao saco vitelino e região AGM (Alvarez-Silva *et al.*, 2003; Gekas *et al.*, 2005). Entretanto, a origem dessas CTHs ainda é desconhecida. Hipotetiza-se que elas possam ser produzidas *de novo* dentro da própria placenta ou pode ser resultado da migração de CTHs de outros sítios anatômicos (Alvarez-Silva, Belo-Diabangouaya *et al.*, 2003; Gekas, Dieterlen-Lievre *et al.*, 2005; Mikkola, Gekas *et al.*, 2005; Ottersbach e Dzierzak, 2005; Gekas, K *et al.*, 2008). A figura 2 é uma representação esquemática dos diferentes sítios hematopoéticos durante o desenvolvimento embrionário murino e das possíveis correlações entre eles.

Figura 3 – Órgãos hematopoéticos nos embriões murino e humano. Ilustração de um embrião murino (A) e um embrião humano (B), mostrando os órgãos hematopoéticos aos 11 dias e 5 semanas de gestação, respectivamente (amarelo, saco vitelino; verde, aorta dorsal; vermelho, fígado fetal; azul, vasos umbilicais e vasculatura fetal na placenta). AGM, Aorta-Gônada-Mesonefros. Adaptado de Mikkola e Orkin (2006).

Foi verificado em humanos que as primeiras células hematopoéticas começam a surgir por volta da 3ª semana do desenvolvimento embrionário, inicialmente, no interior de vasos sanguíneos em formação localizados no saco vitelino e, posteriormente, no lado interno da parede da aorta embrionária e da artéria vitelina (Choi, Kennedy *et al.*, 1998; Tavian, Robin *et al.*, 2001). Células eritróides primitivas são as primeiras células hematopoéticas que surgem no embrião humano no 16º dia de gestação (Cumano, Dieterlen-Lievre *et al.*, 1996), seguidas pelo aparecimento de células progenitoras mielóides aos 19 dias, e de progenitores linfóides B e T, entre os dias 24 e 25 da gestação humana (Tavian, Coulombel *et al.*, 1996; Labastie, Cortes *et al.*, 1998; Tavian, Robin *et al.*, 2001).

Figura 4 – Estabelecimento do *pool* de CTHs definitivas em embriões murinos e humanos. (A) O desenvolvimento hematopoético inicia com a especificação do mesoderma da linha primitiva (cinza) em células hematopoéticas e vasculares. CTHs em surgimento sofrem um processo de maturação (azul) que permite a elas o potencial de *engraftment*, sobrevivência e auto-renovação em nichos hematopoéticos futuros. Sequencialmente, CTHs fetais expandem rapidamente, após o qual inicia um estado estacionário no qual as CTHs permanecem em um estado quiescente na medula óssea. (B) Os períodos nos quais os sítios hematopoéticos em murinos e humanos estão ativos. Barra cinza, mesoderma; barras vermelhas, diferenciação hematopoética ativa; barras amarelas, surgimento das CTHs; barras azuis, presença de CTHs funcionais adultas. As barras amarelas descontínuas do saco vitelino e placenta indicam que o surgimento *de novo* das CTHs ainda não foi experimentalmente comprovado. Adaptado de Mikkola e Orkin (2006).

1.2 Células-tronco embrionárias humanas como modelo do desenvolvimento

Nas últimas décadas, linhagens de células-tronco embrionárias foram geradas a partir de diversas espécies animais tais como camundongos, humanos e outras espécies de primatas não-humanos. As exaustivas pesquisas com células-tronco embrionárias murinas (CTEm) nos últimos 25 anos, demonstraram claramente que essas células são ótimas ferramentas no desenvolvimento de modelos para o estudo da biologia do desenvolvimento normal e das alterações causadas pelos danos nos mecanismos que governam o desenvolvimento, incluindo a hematopoese (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998; Kaufman, Hanson *et al.*, 2001).

Do mesmo modo ao ocorrido com os estudos em CTEm, a derivação da primeira linhagem de células-tronco embrionárias humanas (CTEhs), isso há mais de 13 anos, agregou grandes avanços no entendimento do desenvolvimento do sistema hematopoético humano, assim como de diversos outros tipos celulares, uma vez que esses modelos *in vitro*, teoricamente, mimetizam os eventos ontogênicos humano, haja visto a impossibilidade do uso de modelos humanos *in vivo* devido a questões éticas e morais (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998; Kaufman, Hanson *et al.*, 2001).

1.2.1 Origem e natureza das células-tronco embrionárias humanas

A primeira linhagem de CTEh foi derivada por Thomson *et al.*, (1998), um grupo de pesquisa da Universidade de Wisconsin (EUA), e posteriormente por outros grupos de pesquisa em diversos países (Conley, Young *et al.*, 2004; Cowan, Klimanskaya *et al.*, 2004; Hwang, Ryu *et al.*, 2004; Park, Lee *et al.*, 2004; Suss-Toby, Gerecht-Nir *et al.*, 2004). No Brasil, a primeira linhagem de CTEh foi derivada pelo grupo de pesquisa da Professora Doutora Lygia da Veiga Pereira, da Universidade de São Paulo, e publicado em 2011 (Fraga, Sukoyan *et al.*, 2011).

De maneira semelhante às CTEm e de primatas não-humanos, as CTEhs são células pluripotentes derivadas da massa celular interna de blastocistos humanos. Após o isolamento imunocirúrgico, as células da massa celular interna dos blastocistos são cultivadas *in vitro* sob condições apropriadas e então dão origem à uma linhagem de CTEhs (Stojkovic, Lako *et al.*, 2004). A massa celular interna do blastocisto é uma estrutura constituída por menos de 50 células e uma vez removida, podem ser cultivadas *in vitro* na presença de fatores de crescimento específicos e/ou de células alimentadoras que induzem a proliferação e manutenção do seu estado indiferenciado. Essas células são, então, capazes de proliferar e formar colônias de células que podem ser fragmentadas mecânica ou enzimaticamente e re-cultivadas em novas placas sob mesmas condições. As colônias originadas *in vitro* representam uma linhagem de CTEhs, as quais podem ser mantidas em cultivo, expandidas por passagens seriadas e criopreservadas para a montagem de um banco de células. Normalmente, as linhagens de CTEs são derivadas cada uma de um blastocisto e são, portanto, geneticamente diferentes umas das outras (Stojkovic, Lako *et al.*, 2004).

Em virtude de sua natureza pluripotente, essas células são capazes de se diferenciarem espontaneamente e/ou sob indução, em qualquer linhagem celular oriunda dos folhetos

germinativos endoderma, mesoderma e ectoderma. E podem ter sua pluripotencialidade comprovada por ensaios *in vitro* através da formação de corpos embrióides e *in vivo* através da formação de teratomas (Amit, Carpenter *et al.*, 2000; Itskovitz-Eldor, Schuldiner *et al.*, 2000; Reubinoff, Pera *et al.*, 2000; Schuldiner, Yanuka *et al.*, 2000). A figura 5 mostra esquematicamente o isolamento e cultivo das CTEhs.

Figura 5 – Modelo esquemático do isolamento e cultivo das CTEhs.

1.2.2 Evidências do hemangioblasto e o desenvolvimento hematopoético a partir de células-tronco embrionárias humanas

O termo hemangioblasto foi empregado pela primeira vez em 1932, por Murray. Investigando o desenvolvimento hematopoético a partir de embriões de galinha, Murray (1932) evidenciou o desenvolvimento de células bipotentes capazes de originar células endoteliais e hematopoéticas, as quais ele denominou hemangioblastos.

Apesar do primeiro relato do hemangioblasto ter ocorrido na década de 1930, somente no final da década de 1990 e início do século XXI, as pesquisas sobre essa célula ganhou grande destaque. Os estudos advindos do uso das CTE murinas e, posteriormente, das CTEhs, como modelos para a investigação da hematopoese (Kennedy, Firpo *et al.*, 1997; Choi,

Kennedy *et al.*, 1998; Nishikawa, Nishikawa *et al.*, 1998; Zambidis, Peault *et al.*, 2005; Kennedy, D'souza *et al.*, 2007; Lu, Feng, Caballero *et al.*, 2007), bem como diversos estudos *in vivo* utilizando embriões camundongos e humanos (Godin, Dieterlen-Lievre *et al.*, 1995; Tavian, Coulombel *et al.*, 1996; Oberlin, El Hafny *et al.*, 2010), têm fornecido maiores esclarecimentos sobre as características biológicas e funcionais dessas células.

Fortes evidências de estudos *in vitro* (Zambidis, Peault *et al.*, 2005; Lancrin, Sroczynska *et al.*, 2009) e *in vivo* (Godin, Dieterlen-Lievre *et al.*, 1995; Tavian, Coulombel *et al.*, 1996; Oberlin, El Hafny *et al.*, 2010) também demonstraram que o desenvolvimento hematopoético ocorre via um precursor hematopoético-endotelial comum, denominado hemangioblasto (Murray, 1932), o qual seria responsável pela formação de estruturas conhecidas como endotélio hemogênico (Figura 6 e Figura 7B) (Zambidis, Peault *et al.*, 2005; Lancrin, Sroczynska *et al.*, 2009; Oberlin, El Hafny *et al.*, 2010), do qual derivam as células hematopoéticas e endoteliais (Kennedy, Firpo *et al.*, 1997; Choi, Kennedy *et al.*, 1998; Nishikawa, Nishikawa *et al.*, 1998; Wang, Li *et al.*, 2004; Zambidis, Peault *et al.*, 2005; Kennedy, D'souza *et al.*, 2007; Lu, Feng, Caballero *et al.*, 2007; Woll, Morris *et al.*, 2008).

Figura 6 – Mecanismos do surgimento das células hematopoéticas a partir do endotélio hemogênico. (A)

Imagens de experimento *in vivo* em zebrafish sugerem que o endotélio sofre uma transição hematopoética, onde as células endoteliais desprendem-se das paredes dos vasos, tornam-se células hematopoéticas e caem na circulação. (B) Em modelos murinos, as células hematopoéticas parecem estar em íntimo contato, e possivelmente, em continuidade com o endotélio subjacente, o que sugere um possível processo de divisão assimétrica. Adaptado de Zape e Zovein (2011).

Células progenitoras primitivas que apresentam funções hemangioblásticas *in vitro* obtidas a partir de CTEhs foram identificadas como células-formadoras de colônias blásticas (BL-CFCs, do inglês, *Blast Colony-Forming Cells*) (Kennedy, Firpo *et al.*, 1997; Choi, Kennedy *et al.*, 1998; Nishikawa, Nishikawa *et al.*, 1998; Zambidis, Peault *et al.*, 2005; Kennedy, D'souza *et al.*, 2007; Lu, Feng, Caballero *et al.*, 2007). Os diferentes mecanismos hipotéticos para o surgimento das CTHs estão ilustrados na figura 7.

Figura 7 – Potenciais relações entre as células hematopoéticas e endoteliais durante o desenvolvimento.
Adaptado de Bautch (2011).

Kennedy *et al.* (2007) demonstraram que BL-CFCs KDR^{+} (ou $Flk-1^{+}$, um outro nome para o marcador KDR) foram geradas *in vitro* após 72-96 com a adição de BMP4 ao meio de cultivo. Em outro estudo, Wang *et al.* (2004) demonstraram que células $CD45^{neg}PECAM-1^{+}Flk-1^{+}Ve-Caderina^{+}$, (descritas de forma abreviada como células $CD45^{neg}PFV$) derivadas de corpos embrióides de CTEhs após 10 dias de diferenciação em meio de cultivo suplementado com citocinas hematopoéticas constituem um endotélio primitivo com capacidade de diferenciação em ambas as linhagens hematopoética e endotelial. Em contrapartida, foi demonstrado também que células progenitoras com bipotencial hematoendotelial podem ser obtidas após 7-12 dias de diferenciação das CTEhs via corpos embrióides sem o uso de fatores de crescimento (Zambidis, Peault *et al.*, 2005).

Utilizando um novo marcador, Zambidis et al. (2007) demonstraram que o uso de BMP4 e VEGF associados ao meio de diferenciação das CTEhs via corpos embrióides, levaram à produção de uma população BL-CFC expressando o marcador CD143 (BB9 ou ACE, conhecida como enzima conversora de angiotensina), o qual antecederia a expressão do antígeno CD34 durante a formação das células hematopoéticas.

Empregando outra metodologia, Woll et al. (2008) utilizaram células estromais S17 e caracterizaram a diferenciação hematopoética sequencial de células CD34^{bright}CD31⁺Flk-1⁺ para CD34^{dim}CD45⁺ a partir de CTEhs. Neste estudo, verificou-se que somente as células CD34^{bright}CD31⁺Flk-1⁺ apresentavam propriedades hemangioblásticas, similares à população CD45^{neg}PFV descrita por Wang e colaboradores (2004). De modo semelhante, células progenitoras com propriedade hematoendotelial, identificadas como CD34⁺KDR⁺CD43⁻, foram obtidas após 3-5 dias de co-cultivo das CTEhs com células estromais OP9 murinas.

Neste estudo, a ausência da expressão do antígeno CD43 nessa população de células foi correlacionada com o comprometimento dessas células progenitoras com a linhagem endotelial, ao passo que a subsequente expressão desse marcador originou células hematopoéticas (Vodyanik, Thomson *et al.*, 2006). A avaliação fenotípica e de expressão gênica das células isoladas CD34⁺ permitiu concluir que elas apresentavam características primitivas relacionadas a ambas as linhagens hematopoética e endotelial, de modo semelhante à hematopoese primitiva que ocorre no saco vitelino durante o desenvolvimento embrionário (Lu, Li *et al.*, 2004; Vodyanik, Bork *et al.*, 2005; Woll, Morris *et al.*, 2008).

Outro marcador que tem sido utilizado para a identificação do hemangioblasto é o CD105 (endoglina), um receptor para fatores da família do TGF- β que foi demonstrado como sendo expresso durante o subsequente desenvolvimento hematopoético de células Flk-1⁺CD45⁻ para Flk-1⁻CD45⁺ (Cho, Bourdeau *et al.*, 2001). Evidências indicaram que CD105 é requerido pelo hemangioblasto para o desenvolvimento hematopoético a partir de CTEms (Perlingeiro, 2007), e na gênese dos pericitos, e das células endoteliais, mesenquimais e hematopoéticas a partir de CTEhs (Dar, Domev *et al.*, 2011).

Os estudos demonstram que apesar de já terem sido isoladas populações de células com potencial de hemangioblasto a partir de CTEhs por diversos grupos de pesquisa, grandes são as controvérsias acerca do imunofenótipo dessas células, o que pode ser devido às diferentes estratégias para diferenciação e isolamento dessas células. No entanto, fica demonstrado que essas células ainda carecem de maiores investigações para sua efetiva caracterização.

1.3 Células Pluripotentes como fonte alternativa de células sanguíneas

1.3.1 O transplante de células-tronco hematopoéticas

O transplante de CTHs/CPHs representa a mais comum terapia baseada no uso de células humanas. As fontes mais utilizadas atualmente como fonte de CTHs para transplantes são a MO humana, o sangue periférico mobilizado e o SCU. No entanto, essas fontes apresentam baixa viabilidade para uso clínico devido aos grandes volumes necessários e à compatibilidade entre doador e receptor. A utilização de CTHs para fins terapêuticos é subsequente à avaliação de suas propriedades biológicas e funcionais, baseado principalmente na análise fenotípica para a expressão do antígeno de superfície CD34, e na capacidade de proliferação e formação de colônias hematopoéticas multinhagens (CFUs) em ensaios *in vitro* em meio semi-sólido (Shizuru, Jerabek *et al.*, 1996; Bowers, Tamaki *et al.*, 2000; Negrin, Atkinson *et al.*, 2000; Kaufman e Thomson, 2002).

O cultivo de CTHs somáticas para expansão *in vitro*, entretanto, tem se mostrado uma prática difícil, pois se observou que o potencial *in vivo* dessas células fica comprometido após expansão *ex vivo* em virtude do processo de diferenciação terminal espontânea. As CTEhs, no entanto, por possuírem potencial proliferativo ilimitado e de diferenciação em todas as linhagens celulares somáticas, incluindo as linhagens hematopoéticas eritróide, mielóide e linfóide têm emergido como grande promessa para o desenvolvimento de novas tecnologias aplicáveis à obtenção de células hematopoéticas para uso clínico (Siena, Bregni *et al.*, 1991; Heimfeld, 2003; Kaufman, 2009)

1.3.2 Capacidade funcional das células progenitoras hematopoéticas derivadas de células-tronco embrionárias humanas

Muito embora diversos grupos de pesquisa já tenham derivado CTHs e tipos específicos de células hematopoéticas a partir de CTEhs *in vitro*, a avaliação funcional dessas células em modelos *in vivo* tem sido decepcionante. Até o presente momento, não há relatos da produção de CTHs com capacidade de *engraftment* na medula óssea por longos períodos e de maneira completa, com a subsequente produção de todas as linhagens hematopoéticas. Desse modo, diversas pesquisas têm focado nos mecanismos que governam e determinam o

potencial de *engraftment* e *homing* das CTHs derivadas de CTEhs (Wang, Li *et al.*, 2004; Sasaki, Nagao *et al.*, 2005; Tian, Woll *et al.*, 2006).

A análise detalhada das células CD45^{neg}PFV produzidas por Wang *et al.* (2004) revelou que elas possuíam a habilidade de se diferenciarem nas linhagens hematopoética e endotelial. Todavia, quando transplantadas em camundongos NOD/SCID (do inglês, *nonobese diabetic severe combined immunodeficiency*) por via intravenosa, a população de células CD45^{neg}PFV não foi capaz de repovoar a MO murina por mais de 6 semanas. Em contrapartida, quando injetadas via intra-femoral permitiram enxertia multilinhagem hematopoética detectável mesmo após 10 semanas do transplante, no entanto, com limitada capacidade proliferativa e de migração quando comparadas ao transplante de CTHs somáticas adultas isoladas da MO e do SCU (Wang, Menendez *et al.*, 2005).

Em outro estudo, foram injetadas células hematopoéticas e não-hematopoéticas obtidas da diferenciação das CTEhs sobre células estromais S17 também por ambas as vias de infusão. Foi observada enxertia das células transplantadas via intravenosa e intra-óssea por um longo período, com a produção de células da linhagem mielóide, no entanto, em níveis muito baixos (Tian, Woll *et al.*, 2006). De maneira semelhante, utilizando CTEs de primatas diferenciadas em CPHs após seis dias em sistema de co-cultivo com células estromais OP9, Sasaki *et al.* (2005) demonstraram que as CPHs foram capazes de promover um quimerismo hematopoético quando transplantadas *in útero* no fígado fetal de ovelhas. Entretanto, a porcentagem de enxertia também não foi eficiente, pois as células enxertadas representaram somente 1-2% do total de células.

Os resultados obtidos pelos estudos funcionais *in vivo* e *in vitro* sugerem que as células hematopoéticas obtidas de CTEhs ainda apresentam características funcionais de células primitivas, a exemplo das células que surgem nos primeiros estágios do desenvolvimento embrionário no saco vitelino, região AGM e FL, mesmo embora apresentem características fenotípicas similares às CTHs adultas (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006; Kaufman, 2009).

Na tentativa de otimizar o potencial de *engraftment* das CPHs produzidas, tem sido empregado a tecnologia do DNA recombinante para a criação de células transgênicas superexpressando genes relacionados ao *homing* das CTHs. Em CPHs derivadas de CTEms, por exemplo, a superexpressão do gene HOXB4 demonstrou um significativo aumento na habilidade de *engraftment* e reconstituição do sistema hematopoético (Kyba, Perlingeiro *et al.*, 2002). HOXB4, neste caso, parece exercer importante papel hematopoese, provendo preferencialmente a mielopoese (Chan, Bonde *et al.*, 2008). Adicionalmente, quando HOXB4

foi superexpresso juntamente com o gene *Cdx4*, otimizou o potencial de enxertia e a produção de multinhagens hematopoéticas, como observado nos estudos de Wang et al. (2005) após o transplante das células em camundongos letalmente irradiados.

Todavia, quando empregada a mesma metodologia em CTEhs, a superexpressão de HOXB4 na CPHs não produziu os mesmos resultados observados em modelos de células murinas, e não foi capaz de enxertar e repovoar a medula óssea de camundongos letalmente irradiados por longos períodos. Não se sabe ao certo se a diferença nos resultados é devido a uma instabilidade na expressão do gene HOXB4 em CTEhs transgênicas ou se esse gene apresenta variações funcionais entre diferentes espécies (Wang, Menendez *et al.*, 2005; Bowles, Vallier *et al.*, 2006; Lu, Feng, Ivanova *et al.*, 2007).

A compreensão e domínio dos mecanismos moleculares que regulam a hematopoese pode, através da manipulação genética das células, aumentar grandemente a habilidade de auto-renovação das CPHs e levar à compreensão dos mecanismos que determinam a hematopoese definitiva a partir de CTEs, melhorando o *engraftment* e aumentando o potencial de reconstituição hematopoética dessas células. Entretanto, protocolos de modificação genética de CTEhs têm tido pouco sucesso e, por isso, ainda são pobres na literatura. A eficiência na obtenção de CTEhs humanas recombinantes através dessas técnicas ainda é baixa pois, quando mantidas individualizadas as CTEhs apresentam baixa sobrevivência, ao passo que a execução da técnica com as células cultivadas em colônias, aumenta a sobrevivência celular mas em detrimento, diminui a eficiência do método (Papapetrou, Zoumbos *et al.*, 2005; Watanabe, Ueno *et al.*, 2007).

1.3.3 Perspectivas futuras da medicina transfusional e terapia celular

Apesar de já ser uma tecnologia bem-estabelecida, a transfusão de derivados sanguíneos ainda apresenta, nos dias atuais, algumas dificuldades inerentes aos procedimentos de armazenamento dos hemocomponentes durante grandes períodos, à presença de agentes potencialmente infecciosos, ao recrutamento de doadores, a reações de imunoincompatibilidade e ao grande investimento necessário ao aporte para a realização dos procedimentos de coleta, armazenamento e transfusão (Peyrard, Bardiaux *et al.*, 2011). Os grandes avanços nas tecnologias e sistema de cultivo de células hematopoéticas e o advento das células pluripotentes, tais como CTEhs e iPSCs (do inglês, *Induced Pluripotent Stem Cells*), têm emergido como uma promissora, revolucionária e ilimitada fonte de hemoprodutos

transfusionais alogênicos, muito embora ainda seja uma tecnologia recente e muitas pesquisas ainda precisam ser desenvolvidas para responder questões ainda pouco compreendidas (Peyrard, Bardiaux *et al.*, 2011).

As células iPS foram inicialmente e recentemente produzidas a partir de fibroblastos murinos por Takahashi e Yamanaka (2006), e após por diversos outros grupos de pesquisa a partir de células humanas (Takahashi, Okita *et al.*, 2007; Takahashi, Tanabe *et al.*, 2007; Yu, Vodyanik *et al.*, 2007; Park, Zhao *et al.*, 2008), através da transformação de fibroblastos maduros em células-tronco pluripotentes-*like* por meio da superexpressão de genes de pluripotência. Acredita-se que essas células sejam não-imunogênicas, uma vez que podem ser produzidas de forma paciente-específicas, partindo do princípio de que a técnica que leva à sua produção pode ser aplicada às células isoladas do próprio paciente e gerar um produto, em teoria, imunocompatível. Adicionalmente, assim como as CTEhs, as iPSCs representam uma poderosa ferramenta no estudo da diferenciação celular normal e alterada, embora as suas similaridades e capacidades funcionais semelhantes às CTEhs ainda necessitem de investigações mais detalhadas (Takahashi, Okita *et al.*, 2007; Takahashi, Tanabe *et al.*, 2007; Yu, Vodyanik *et al.*, 2007; Park, Zhao *et al.*, 2008; Feng, Lu *et al.*, 2010; Lapillonne, Kobari *et al.*, 2010; Liu, Barkho *et al.*, 2011).

Para eliminar a necessidade da produção de iPSCs de todo e qualquer paciente, a procura por determinadas combinações de fenótipos que possam ser transfundidos de forma segura, poderia contribuir para simplificar e aprimorar a aplicação clínica dessas células. Dessa forma, a seleção de um número limitado de iPSCs alogênicas amplamente utilizáveis, facilitaria a produção em larga escala de hemocomponentes, eliminando a necessidade do uso de iPSCs autólogas, como demonstrado pelo estudo retrospectivo de Peyrard *et al.* (2011), que revelou que um banco de células com apenas 15 clones de iPSCs humanas apresentando diferentes combinações fenotípicas de antígenos sanguíneos seria suficiente para suprir 100% das necessidades transfusionais de todos os fenótipos sanguíneos raros na França, por exemplo.

Adicionalmente, assim como reportado para as células iPSCs, a derivação de inúmeras linhagens de CTEhs com fenótipos universais, poderiam contribuir para a transposição desses estudos para a prática clínica. São grandes as perspectivas acerca do uso de células hematopoéticas derivadas de células pluripotentes, uma vez que os derivados dessas células produzidos em laboratório seriam capazes de suprir ou minimizar a necessidade de doadores de sangue e medula óssea. Contudo, provavelmente ainda serão necessários mais alguns anos de pesquisa para que essas pesquisas saiam efetivamente da bancada e sejam aplicadas na

clínica, visto que diversos fatores, como os citados anteriormente, tais como resposta imunológica, eliminação de fatores xenogênicos, e derivação de células com fenótipos que possam ser amplamente aplicados na clínica, ainda carecem de maiores investigações e precisam ser superados.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O objetivo principal deste estudo foi diferenciar e caracterizar as células progenitoras hematopoéticas derivadas da linhagem de células-tronco embrionária humana H1.

2.2 Objetivos Específicos

- Padronizar as técnicas de cultivo e expansão das CTEhs H1 em cultura com fibroblastos de embrião de camundongo (MEFs) e matrigel;
 - Avaliar as características morfológicas e imunofenotípicas das hCTEs H1;
 - Induzir e padronizar a diferenciação *in vitro* das CTEhs H1 em células progenitoras hematopoéticas em sistema de co-cultivo com MEFs;
 - Caracterizar morfolologicamente o processo de diferenciação hematopoética;
 - Avaliar o perfil imunofenotípico das células progenitoras hematopoéticas geradas a partir das CTEhs H1;
 - Avaliar a expressão gênica das células progenitoras hematopoéticas;
 - Fornecer conhecimento necessário para sustentar o desenvolvimento de novas tecnologias para a expansão e diferenciação de CTEhs em células progenitoras hematopoéticas visando a sua utilização na pesquisa básica e na terapia celular.
-

MATERIAL E MÉTODOS

3 Material e Métodos

3.1 Aspectos Éticos

O presente projeto obteve aprovação do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP) e encontra-se registrado sob o processo nº 15908/2011.

3.2 Isolamento e Cultura primária das MEFs

As MEFs produzidas *in house* foram extraídas de embriões de camundongos C57/Black 6 entre os dias 13.5 e 14.5 de gestação. Para isso, as fêmeas prenhes foram sacrificadas e os embriões isolados com instrumentos cirúrgicos estéreis e lavados em PBS 1X com 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich, MO, USA). Após, foram retirados a cabeça e o fígado dos embriões, e o restante dos tecidos dos embriões foram lavados por mais duas vezes em PBS 1X com 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich, MO, USA). Em seguida, os tecidos lavados foram tripsinizados com 10mL Tripsina-EDTA 0,2% (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 15 min a 37°C e, em seguida, pipetadas vigorosamente com uma pipeta de 10mL para auxiliar a digestão do tecido. Após os primeiros 15 minutos, foram adicionados mais 10mL de Tripsina-EDTA 0,2% (Sigma-Aldrich, MO, USA), incubados por mais 15 min a 37°C e, após esse período, as amostras foram pipetadas vigorosamente com uma pipeta de 5mL. A tripsina foi inativada com 3 vezes o seu volume de meio RPMI (Gibco, NY, USA) 5% SFB. Logo após, as células e os fragmentos de tecidos remanescentes foram centrifugadas a 400 x g e lavados 2 vezes em meio RPMI (Gibco, NY, USA) 5% SFB. A seguir, as células foram plaqueadas em garrafas pré-tratadas com gelatina 0,1% [Sigma-Aldrich, MO, USA]), na concentração de $1-3 \times 10^6$ por garrafa de 75cm² (passagem 0, P0) em meio DMEM *High Glucose* (Gibco, NY, USA) 10% SFB (HyClone, UT, USA) suplementado com 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1% de L-glutamina (Gibco, NY, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA), trocando o meio de cultivo a cada 3-4 dias. As MEFs foram expandidas e utilizadas para cultivo de CTEhs e ensaios de diferenciação na 3ª passagem (P3).

3.3 Cultivo e expansão das células-tronco embrionárias humanas

Células-tronco embrionárias humanas da linhagem H1 (obtida da Wicell, Madison, USA) foram cultivadas e expandidas como células indiferenciadas em co-cultivo com fibroblastos de embriões murinos (MEFs, do inglês, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) produzidos *in house*, inativados com mitomicina-C por 2 horas (10µg/mL de mitomicina-C [Sigma-Aldrich, MO, USA] diluída em meio base DMEM/F12 [Gibco, NY, USA] sem suplementos) em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium F12* (DMEM/F-12) (Gibco, NY, USA) suplementado com 15% de *Knockout Serum Replacement* (Gibco, NY, USA), 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1 mM L-glutamina (Gibco, NY, USA), 0,1 mM β-mercaptoetanol (Gibco, NY, USA), 5 ng/mL de basic-FGF (Peprotech, NJ, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA); ou sobre matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) em meio mTeSR (StemCell Technologies, WA).

As colônias de hCTEs foram repicadas a cada 7 dias ou quando fazia-se necessário, ou seja, quando as colônias estavam grandes com ou sem sinais de diferenciação. O repique foi realizado manualmente com o auxílio de uma ponteira de 30µL, um fluxo laminar horizontal modelo FLH KE02-TROX classe 100/iso5 (TROX[®] Technik, PR, Brazil) e um microscópio invertido Olympus IX51 (Olympus, Toquio, Japan). A presença de sinais de diferenciação em determinadas colônias durante o cultivo das CTEhs não inviabilizou o uso dessas células. Neste caso, as regiões que ainda apresentavam aspecto indiferenciado eram repicadas manualmente tentando-se evitar, ao máximo, atingir as regiões diferenciadas das colônias. Após a fragmentação das colônias indiferenciadas, os fragmentos foram coletados em tubos tipo *Falcon*, centrifugados a 250 x g durante 5 min., ressuspensos em meio de cultivo novo e transferidos para novas placas de 6 poços na proporção de 1:3, ou seja, os fragmentos gerados pelo repique das colônias de cada poço eram transferidos para três novos poços sobre matrigel ou sobre MEF. Não foi empregado tratamento enzimático para o repique das colônias.

3.3.1 Isolamento enzimático das células-tronco embrionárias humanas

Somente foi realizado tratamento enzimático das colônias de CTEhs quando era necessário o isolamento das células para contagem ou análise por citometria de fluxo. Neste caso, os poços da placa de 6 poços contendo as colônias de CTEhs foram digeridas com *Tryple Select*[®] (Gibco, NY, USA) por 15 a 20min a 37°C. Após esse período, as células foram pipetadas vigorosamente com uma pipeta de 1mL e a *Tryple* inativada com o meio DMEM/F-

12 (Gibco, NY, USA) suplementado com 15% de *Knockout Serum Replacement* (Gibco, NY, USA), 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1 mM L-glutamina (Gibco, NY, USA), 0,1 mM β -mercaptoetanol (Gibco, NY, USA), 5 ng/mL de basic-FGF (Peprotech, NJ, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA). As células individualizadas foram centrifugadas a 500 x g, contadas e destinadas ao ensaio para o qual as células eram necessárias.

3.4 Ensaio de formação de corpos embrióides

Para a realização do ensaio de formação espontânea de corpos embrióides, as colônias de CTEhs foram picotadas mecanicamente em pequenos “clumps” e transferidas para placas de baixa aderência (Corning, MA, USA) em meio DMEM/F12 (Gibco, NY, USA) suplementado com 20% SFB, 1% de aminoácidos não-essenciais, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina, por um período de 8-10 dias.

3.5 Diferenciação das Células-Tronco Embrionárias Humanas em células hematopoéticas

CTEhs mantidas em cultura em estado indiferenciado foram repicadas em grandes fragmentos e transferidas para placas de 6 poços (pré-tratadas com gelatina 0,1% [Sigma-Aldrich, MO, USA]) sobre uma camada de MEFs inativadas com mitomicina-C (Sigma-Aldrich, MO, USA) em 1mL de meio DMEM/F-12 (Gibco, NY, USA) suplementado com 15% de *Knockout Serum Replacement* (Gibco, NY, USA), 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1% de L-glutamina (Gibco, NY, USA), 0,1 mM β -mercaptoetanol (Gibco, NY, USA), 5 ng/mL de basic-FGF (Peprotech, NJ, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA) por 4 horas para que as colônias aderissem melhor ao *feeder*. Após, foi adicionado mais 1mL do mesmo meio de cultivo por mais 20 horas para adaptação das colônias às novas condições. Em seguida, iniciou-se o processo de diferenciação das células (D+0) com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High Glucose* (Gibco, NY, USA) 15% Soro Fetal Bovino (SFB) (HyClone, UT, USA) (suplementado com 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1% de L-glutamina (Gibco, NY, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA)) suplementado com BMP4 (25ng/mL)

(Sigma-Aldrich, MO, USA), SCF (100ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), TPO (25ng/mL) (Peprotech, NJ, USA) e VEGF (25ng/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA) durante os três primeiros dias. Decorridos os três primeiros dias (D+3), as colônias de CTEhs aderidas às MEFs foram cultivadas em meio DMEM *High Glucose* (Gibco, NY, USA) 15% SFB (HyClone, UT, USA) (suplementado com 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1% de L-glutamina (Gibco, NY, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA)) suplementado com SCF (100ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), G-CSF (20ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), IL-3 (20ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), IL-6 (20ng/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA), EPO (5UI/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA), IGF-I (20ng/mL) (Peprotech, NJ, USA) e FLT3L (20ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), trocando 2/3 desse segundo meio de cultivo a cada três dias, sendo que após os três dias de cultivo no segundo meio de diferenciação, a concentração de EPO foi reduzida para 3UI/mL. O ensaio foi realizado na mesma placa do início ao fim, e não foi preciso realizar a passagem das colônias para novas placas, uma vez que as MEFs aderem firmemente às placas e nela permanecem aderidas por 20-30 dias.

3.6 Análises morfológicas

As culturas celulares foram observadas diariamente ao microscópio invertido Olympus IX51 (Olympus, Toquio, Japan) por microscopia de contraste de fase para análise morfológica. A documentação fotográfica foi realizada em câmera digital AxioCam MRC (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) acoplada ao microscópio Carl Zeiss MicroImaging GMBH 37081 (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

3.7 Contagem de células em câmara de Neubauer

A determinação da quantidade de células em câmara de Neubauer foi realizada diluindo uma alíquota da suspensão celular (10µL) em 10µL (1:2) ou 190µL (1:20) de solução de Turk's (0,1% de ácido acético glacial e 1% de violeta genciana) (Sigma-Aldrich, MO, USA) em tubo cônico do tipo *Eppendorf* de 1,5 mL. Foram contabilizadas com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus Optical, Toquio, Japan) as células coradas presentes nos quatro quadrantes laterais da câmara. A determinação do número de células por mL foi feita

através da divisão do número de células contadas por 4, multiplicado por 10.000 (fator de correção) e pelo fator de diluição na solução de Turk's.

3.8 Avaliação do potencial clonogênico das células progenitoras hematopoéticas obtidas de células-tronco embrionárias humanas em metilcelulose

Para avaliar o seu potencial clonogênico, as células hematopoéticas produzidas foram cultivadas em meio semi-sólido MethoCult[®] 4034 Optimum (StemCell Technologies, WA), durante 14 dias. Para isso, as células foram coletadas, centrifugadas a 500 x g por 10 min., contadas e distribuídas na concentração de 10⁴ células por mL de meio semi-sólido. A mistura de célula com o meio semi-sólido foi homogeneizada no *Vórtex*, distribuída em alíquotas de 1,5 mL por placa de 30 mm³ e cultivadas em câmara úmida a 37°C, 5% CO₂ e 95% ± 2% de umidade em incubadora Thermo 3307 (Thermo Scientific, MA, USA) por 14 dias. Após os 14 dias, as colônias foram contadas manualmente e classificadas de acordo com a sua morfologia e constituição dos elementos hematopoéticos.

3.9 Caracterização Imunofenotípica por citometria de fluxo

A imunofenotipagem das hCTEs foi realizada por citometria de fluxo com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos presente na membrana citoplasmática ou nuclear da célula. Para a identificação dessas células foi montado um painel imunofenotípico contendo os marcadores de pluripotência e hematopoéticos linhagem-específicos. Foi realizada a imunofenotipagem das CTEhs indiferenciadas e das células hematopoéticas obtidas em diferentes períodos da diferenciação. A aquisição dos eventos foi feita com o citômetro FACSCalibur[™] (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados com o *software* CELLQuest[™] (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais (BD Biosciences, MD, USA): CD45, CD16, CD38, CD20, CD43, CD31, CD45, CD71, CD235a, CD33e Sox2 conjugados com FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*); CD34, CD43, CD71, CD15, CD19, CD56, CD8, CD11b, CD14, CD235a, CD3, CXCR4, KDR e AC133 conjugados com PE (do inglês, *phycoeritrin*); CD34, CD117, CXCR4, CD4 e CD3 conjugados com PerCP (do inglês, *peridinin chlorophyll*), CD45, CD90, CD13, CD8 e CD4 conjugados com APC (do inglês,

allophycocyanin). Como controles, para avaliar marcações inespecíficas, foram utilizados isotipos controles de imunoglobulinas G conjugados com FITC, PE, PerCP e APC.

Para a realização dessa técnica, alíquotas de 100µL de suspensão celular contendo 10^5 células foram colocadas em tubos de poliestireno 12 x 75mm previamente identificados com os diferentes marcadores. Logo após, foram adicionados 5µL dos anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos e as amostras foram incubadas em ambiente escuro, a temperatura ambiente (TA), por 15 min. Após, foi adicionado 1mL de PBS 1X em cada tubo e as amostras foram centrifugadas a 500 x *g* por três minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, o *pellet* de cada tubo foi ressuspensão em 150µL de PBS 1X e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

3.10 Ensaio de viabilidade celular

Para quantificar as células viáveis, uma alíquota de 100µL contendo 10^5 células foi colocada em um tubo de poliestireno 12 x 75mm previamente identificado. Em seguida, foram adicionados 50µL do corante iodeto de propídeo 50 mg/mL (PI, do inglês *propidium iodide*, Sigma-Aldrich, USA), e a amostra foi avaliada pelo citômetro de fluxo FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e os dados analisados pelo *software* CELLQuest™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

3.11 Análise por Microscopia Confocal

As células foram coletadas, centrifugadas a 500 x *g*, contadas, ressuspensas em 200µL de PBS 1X na concentração de 10^5 células e confeccionadas lâminas por *Cytospin* (800rpm por 10min.). Após o *Cytospin*, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 5 min., e em seguida, lavadas duas vezes em PBS 1X durante 10 minutos. As células foram, então, incubadas em solução de glicina 0,1 M (Pharmacia Biotech, AB, USA) durante 30 min, lavadas duas vezes em PBS 1X, e permeabilizadas com Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 0,3% em PBS 1X, por 10 min. Logo em seguida, as células foram lavadas por três vezes com PBS 1X por 5 min., e foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos das células com solução de albumina bovina 1% (Sigma Aldrich, MO, USA)

diluída em PBS 1X durante 1 h a TA. Após, as células foram incubadas com 250 µL da solução contendo o anticorpo (diluído em solução de albumina bovina na concentração de 1µg/100µL) desejado por 1 h em câmara úmida e a TA, e, em seguida, lavadas 5 vezes com PBS 1X. Para marcações com anticorpos não-conjugados foi realizada uma segunda incubação com 250 µL do anticorpo secundário previamente diluído. Logo após, as amostras foram lavadas 10 vezes com PBS 1X e os núcleos das células corados com 250 µL da solução de DAPI (dihidrocloreto de 4,6 diamino-2-fenilindol [Abbott Molecular Inc. , IL, USA]) na concentração de 100ng/mL por 10 min, a TA, em câmara úmida e escura. As lâminas foram, então, lavadas novamente por 10 vezes com PBS 1X e imersas uma vez em água destilada. Após, as lâminas foram montadas com Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences, PA, USA) e as células marcadas foram visualizadas com o auxílio do microscópio confocal Carl Zeiss Modelo LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Germany) e as imagens processadas com o *software Zen 2008 version 2.5* (Carl Zeiss). Para cada amostra analisada, um controle negativo foi utilizado com os mesmos parâmetros de captura.

3.12 Extração e quantificação do RNA Total

A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, CA, USA), segundo especificações do fabricante. Após lavado em PBS 1X, o *pellet* celular ($>10^6$ células) foi lisado em 350 µL de tampão de lise RLT (+3,5 µL de beta-mercaptoetanol) (Sigma-Aldrich, MO, USA), e a suspensão celular foi homogeneizada com o auxílio de uma seringa de 1 mL e uma agulha, até que a mistura se tornasse viscosa. Em seguida, foi acrescentado o mesmo volume de etanol 70% e o volume total foi aplicado à coluna fixada em um tubo de 2mL, e centrifugado a 8.000 x g, por 15 segundos. Após, o filtrado foi desprezado e foi adicionado 350 µL de tampão RW1 à coluna, para uma segunda centrifugação a 8.000 x g, por 15 segundos. O filtrado foi descartado e foi adicionada uma solução 70 µL de tampão RDD + 10 µL de DNase I à coluna. A amostra foi incubada por 15 min a TA. Em seguida, foram adicionados 350 µL do tampão RW1 à coluna, e centrifugada a 8.000 x g durante 15 segundos. Logo após, a membrana da coluna foi lavada com 500 µL de tampão RPE e centrifugada a 8.000 x g por 15 segundos. Este procedimento foi realizado duas vezes. A coluna foi, então, transferida para um novo microtubo de 2,0mL. Após a centrifugação em velocidade máxima por 1 minuto, a coluna foi transferida para um tubo novo de 1,5mL e adicionados 30µL de água livre de RNase à membrana da coluna, que foi

submetida a nova centrifugação a 8.000 x g, por 1 min para remoção do RNA ligado à membrana. O RNA total eluído em água livre de RNase foi quantificado com o auxílio do espectrofotômetro (NanoVue, GE Healthcare Life Sciences, USA), nos comprimentos de onda (λ) de 260 a 280nm. O grau de pureza foi avaliado considerando-se as amostras puras aquelas cujo valor da razão de A260/A280 e A260/A320 estivesse entre 1.8 e 2.0. As amostras de RNA total foram mantidas em *freezer* -80°C até o uso.

3.13 Avaliação da Integridade do RNA

Para verificar a integridade das amostras de RNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% (Gibco, NY, USA), corado com corante intercalante GelRed 100.000X (Uniscience). Ao gel foi aplicada uma mistura de 5 μ L de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich, MO, USA) e 500ng/ μ L de RNA. A eletroforese foi realizada a 80 V, durante 30 min. Ao término da corrida eletroforética, a visualização das bandas foi realizada com o auxílio do fotodocumentador IMAGE QUANT 350 (GE Healthcare Life Sciences, USA). Somente as amostras com altas concentrações de RNA, com boa qualidade e sem vestígios de degradação foram utilizados para as reações de RT-PCR em Tempo Real.

3.14 Transcrição Reversa

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando o kit *High-Capacity* (Applied Biosystems, Boston, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Foram adicionados em um microtubo 2,5 μ L de tampão 10X, 2,0 μ L de dNTPs mix (100 mM), 2,5 μ L de *Random Primers* (10X), 1,25 μ L de enzima transcriptase reversa MultiScribe (50 U/ μ L), 0,075 μ L de inibidor de ribonuclease (*RNase Out*) (40 U/ μ L), 1 μ g de RNA total e completado o volume final de 25 μ L com água ultra-pura estéril. A reação foi misturada delicadamente e transferida para o termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Boston, USA). Essa mistura foi submetida à ciclagem de 25°C por 10 min, seguido por 37°C durante 2 h e resfriamento a 4°C. Após o término da transcrição reversa, a reação foi preservada a 4°C e o c-DNA produzido, armazenado em freezer -20°C. O cDNA foi diluído 1:10 em água deionizada estéril para a utilização nas reações de quantificação por RT-PCR em Tempo Real.

3.15 RT-PCR em Tempo Real

A expressão gênica foi avaliada utilizando sondas TaqMan® (Applied Biosystems, Boston, USA) e as reações de amplificação foram realizadas no *7500 Real Time PCR ABI Prism Sequence Detection System* (Applied Biosystems, CA, USA). Para a reação, utilizou-se 5,0µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X); 0,5µL de sonda gene-específica (20X); 2,0µL de cDNA diluído 1:10 (v/v) e água livre de RNase para um volume final de 10µL. Como normalizadores foram utilizados os genes endógenos GAPDH, RNF7 e PPP1R11. A normalização da reação foi realizada pela média geométrica destes três genes (Vandersompele et al., 2002). A expressão gênica basal das CTEhs indiferenciadas foi utilizada como calibrador, e a normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001; LIVAK et al., 2001). As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 poços seladas com filme óptico (Applied Biosystems, Boston, USA) sob as condições descritas a seguir: 2 passos iniciais de desnaturação (50°C por 2 min, seguido de 95°C por 10 min), seguidos de 40 ciclos com um passo de desnaturação (95°C por 15s) e outro de anelamento/extensão (60°C por 1 min).

Foram selecionados genes relatados na literatura corrente como implicado no surgimento das CTHs e na diferenciação das CTHs em linhagens específicas, tais como SCL/TAL1, PROM1/AC133, NOTCH1, LMO2, CD31, CD34, CD45, RUNX1, KIT, KDR, SOX2. Os nomes dos genes, bem como de seus respectivos números de acesso e o link para consulta de suas respectivas sequencias encontram-se listados na Tabela 1.

Tabela 1 – Descrição dos genes analisados por RT-PCR em Tempo Real.

Gene alvo	Código de acesso*	RefSeq**
SCL/TAL1	Hs01097987_m1	NM_003189.2
PROM1/AC133	Hs01009250_m1	NM_006017.2
NOTCH1	Hs01062014_m1	NM_017617.3
LMO2	Hs00153473_m1	NM_005574.3
PECAM1/CD31	Hs00169777_m1	NM_000442.4
CD34	Hs00990732_m1	NM_001773.2
PTPRC/CD45	Hs04189704_m1	NM_080923.2
RUNX1	Hs00231079_m1	NM_001754.4
KIT	Hs00174029_m1	NM_000222.2
KDR	Hs00911700_m1	NM_002253.2
SRY/SOX2	Hs00976796_s1	NM_003140.1

* Disponível em [http:// www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)

** Sequências disponíveis em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>

3.16 Análise citogenética por bandamento GTG

Para a avaliação citogenética, as células tiveram seu ciclo celular interrompido na fase de metáfase por meio da adição do reagente colcemid (0,15 $\mu\text{L/mL}$) (Sigma-Aldrich, MO, USA) ao meio de cultivo. As células foram mantidas na incubadora Thermo 3307 (Thermo Scientific, MA, USA) a 80% de umidade, 37°C e 5% de CO_2 por no mínimo 4 horas. Após a incubação, as CTEhs foram tripsinizadas com *Tryple Select*® (Gibco, NY, USA), coletadas e transferidas para um tubo cônico tipo *Falcon* (Corning, USA) de 15 mL e centrifugada por 8 minutos a 500 x g. As células hematopoéticas não-aderentes, não passaram pelo passo de tripsinização, e foram somente coletadas e transferidas para um tubo cônico tipo *Falcon* de 15 mL e centrifugada por 8 minutos a 400 x g.

Seguido à centrifugação, o sobrenadante foi removido e 5 mL da solução de KCl 0,75M (Sigma-Aldrich, MO, USA), previamente aquecida a 37°C, foi adicionado ao *pellet* celular. A amostra foi homogeneizada, colocada em banho-maria a 37°C por 20 min., e posteriormente centrifugada a 400 x g por 8 minutos. O sobrenadante foi removido e a solução fixadora de *Carnoy* (metanol 3:1 ácido acético, Merck, Darmstadt, Germany) foi adicionada à amostra. Foram realizadas três lavagens das células no fixador de *Carnoy*, e ao final, ressuspensas em aproximadamente 400 μL do fixador. Após a fixação, o material foi gotejado com o auxílio de uma pipeta *Pasteur* sobre a superfície de uma lâmina (aproximadamente duas gotas por lâmina) previamente lavada, e deixada à TA por 72 horas para envelhecimento das lâminas

A técnica de bandamento cromossômico foi realizada com utilização de solução de tripsina 1% (Sigma-Aldrich, MO, USA) diluída em PBS 1X (4:45mL). As lâminas foram imersas em solução de tripsina por um tempo 8 segundos, aproximadamente, enxaguadas em água corrente e submetidas à coloração com Giemsa (1:30 em PBS 1X) (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 3 min. Para avaliação cromossômica, alguns critérios foram avaliados previamente às análises, tais como: espalhamento adequado dos cromossomos e boa qualidade de bandamento GTG (*G-banding trypsina-Giemsa*) com no mínimo 400 bandas. Quando esta avaliação não era satisfatória, outras lâminas eram processadas e coradas em diferentes tempos de digestão. Ao término da reação o cariótipo das células foi analisado por meio de microscopia ótica convencional. A avaliação do cariótipo das células foi feita utilizando a objetiva de imersão (100X) do microscópio Olympus BX-40 (Olympus, Toquio, Japan). Para cada amostra foram capturadas e analisadas pelo menos cinquenta metáfases com o auxílio do software BANDView®EXPO (Applied Spectral Imaging, CA, USA). Os cariótipos foram

descritos de acordo com os critérios internacionais de nomenclatura cromossômica (ISCN, 2005).

3.17 Análise morfológica por coloração com Giemsa

Para coloração com Giemsa, as células foram centrifugadas a 500 x g, o sobrenadante foi desprezado, as células contadas e confeccionadas lâminas por *Cytospin* (800rpm por 10min.) com concentração de 10^5 células. Em seguida, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 5 min., a TA, lavadas com água milli-Q e deixadas secar a TA. Depois de secas, as lâminas foram cobertas com solução de Giemsa (Sigma-Aldrich, MO, USA) diluída 1:30 em tampão fosfato (pH 7,4) durante 5 min., a TA e, em seguida, lavadas com água milli-Q, deixadas secar a TA e analisadas ao microscópio óptico de luz (Olympus Optical, Toquio, Japan) com objetiva de imersão (100X).

3.18 Análise morfológica por coloração de May-Grunwald Giemsa

Para coloração com Giemsa, as células foram centrifugadas a 500 x g, o sobrenadante foi desprezado, as células contadas e confeccionadas lâminas por *Cytospin* (800rpm por 10min.) com concentração de 10^5 células. Em seguida, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 5 min., a TA, lavadas com água milli-Q e deixadas secar a TA. Depois de secas, as lâminas foram cobertas com solução de May-Grunwald (Sigma-Aldrich, MO, USA) diluída 1:30 em tampão fosfato (pH 7,4) por 25 min., a TA. Após, o corante foi desprezado e as lâminas lavadas com água milli-Q. Em seguida, as lâminas foram cobertas com solução de Giemsa (Sigma-Aldrich, MO, USA) diluída 1:10 em tampão fosfato (pH 7,4) por 45-50 min., a TA e, após, o corante foi desprezado, as lâminas passadas rapidamente em água acética 0,1% (1 mL de ácido acético [Sigma-Aldrich, MO, USA] diluído em 999 mL de água milli-Q), lavadas com água milli-Q e deixadas secar a TA. As lâminas foram analisadas ao microscópio óptico de luz Olympus Axioskop 2 plus (Olympus, Toquio, Japan) com objetiva de imersão (100X).

3.19 Ensaio de formação de teratomas

Colônias de CTEhs indiferenciadas foram dissociadas mecanicamente em fragmentos menores, e aproximadamente 100-150 fragmentos (aproximadamente $1-2 \times 10^5$ células) foram misturados e homogeneizados com 700 μ L de matrigel e injetados via subcutânea em camundongos NOD/SCID (Fraga *et al.*, 2011). Após 8 semanas, os camundongos foram sacrificados e os tumores formados foram dissecados, fixados em formalina 4% por 24 horas, e depois equilibrados em sucrose 30% por 48 horas, congelados em OCT (Thomson *et al.*, 1998; Dar *et al.*, 2011) e confeccionadas lâminas pré-tratadas com poli-lisina contendo cortes de 5 a 20 μ m.

As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. Para isso, os cortes foram lavados com água destilada e, em seguida, passados rapidamente em ácido acético (Merck, Darmstadt, Germany) (99% de álcool 70% + 1mL de ácido clorídrico) e lavados em água corrente. Após, foram pingadas 2 gotas de hidróxido de amônia (Merck, Darmstadt, Germany) sobre os cortes e estes foram lavados em água corrente. Os cortes foram passados 2 vezes rapidamente em álcool 80% e em álcool 95% e, a seguir, corados com eosina alcoólica por 30 segundos. Em seguida, passou-se os cortes em álcool 95%, 2 vezes em álcool 100%, uma vez em xilol 1, uma vez em xilol 2, e montadas as lamínulas sobre as lâminas com itelan.

3.20 Análise Estatística

As análises por citometria de fluxo foram analisados com o auxílio do *software FlowJo*, e os dados apresentados em histogramas contendo as medianas e seus respectivos desvios padrões. As análises estatísticas e gráficos foram realizados com o auxílio do *software GraphPad Prism*, V4.03 (GraphPAD Software Inc., USA) para o sistema operacional Windows[®]. Foi adotado o nível de significância de 5% para as análises, ou seja, foram considerados estatisticamente significativos *p*-valores menores ou iguais a 0,05.

Figura 8 - Fluxograma esquemático ilustrando as atividades experimentais desenvolvidas neste trabalho. As CTEhs foram diferenciadas em sistema de co-cultivo com MEFs em meio de diferenciação suplementado com BMP4, VEGF, TPO e SCF nas 72 horas iniciais para a indução mesodérmica e, após esse período, o conjunto de citocinas indutoras de mesoderma foi trocado por um conjunto de citocinas hematopoéticas (SCF, G-CSF, IL-3, IL-6, IGF-I, FLT3L e EPO). As CTEhs foram então cultivadas neste segundo meio de diferenciação por adicionais 7 a 30 dias. As células-tronco hematopoéticas que surgiram no interior das colônias deram origem também a uma população de células progenitoras hematopoéticas no sobrenadante. As células hematopoéticas coletadas de ambos os compartimentos do sistema (colônias e sobrenadante) foram destinadas a: avaliação imunofenotípica, avaliação de marcadores de superfície por microscopia confocal, ensaio clonogênico em metilcelulose, caracterização citogenética, avaliação do potencial teratogênico e análise de expressão gênica.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Células-tronco embrionárias humanas expressam marcadores de pluripotência e são negativas para marcadores de células diferenciadas

Uma linhagem de célula-tronco embrionária humana H1 (CTEh H1) foi adquirida da WiCell® (USA) na passagem 23 (P23) e cultivada *in vitro* em nosso laboratório (Laboratório de Terapia Celular) para o estabelecimento de um banco de CTEhs para a realização de pesquisas com as mesmas. Essas células foram mantidas em cultivo por mais de 40 passagens, e ainda mantiveram sua morfologia em estado indiferenciado (Figura 11, Figura 12), com elevado percentual de células positivas para os marcadores de pluripotência Sox2, Nanog, SSEA-4 e TRA-1-60; expressão relativamente baixa para TRA-1-81, quando comparado aos demais marcadores de pluripotência (Figura 9); e negativas para marcadores de células hematopoéticas (CD34, CD45, CD117, CD43, CD38, CD11b, CD15, CD16, CD235a, CD3, CD4, CD19, CD20), endoteliais (CD31), mesenquimais (CD73), e para o marcador de célula diferenciada SSEA-1 (Figuras 9 e 10, Tabelas 2 e 3). As CTEhs foram avaliadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo nas passagens 26, 38 e 42.

Figura 9 – Perfil Imunofenotípico das CTEhs para marcadores de pluripotência. CTEhs nas passagens: P26, P38 e P42 foram caracterizadas quanto a positividade para os marcadores de pluripotência. Observa-se elevados níveis para os marcadores SOX2, Nanog e SSEA-4, níveis intermediários para TRA-1-60, baixos de TRA-1-81 e ausência de positividade para SSEA-1. N=3.

Não obstante, essas células foram positivas em elevado percentual para marcadores de células da linhagem hemato-endotelial primitivas, tais como AC133 e KDR (Figura 10), assim como para marcadores amplamente expressos em diversos outros tipos celulares como o CD90, CD13, CD56 (Figura 10) e CD71 (Tabela 2), revelando uma característica intrínseca dessas células, ou um efeito condicionado pela sua manutenção em cultivo durante as passagens avaliadas.

Figura 10 – Perfil imunofenotípico das CTEhs para marcadores hematopoéticos, endoteliais e mesenquimais. As CTEhs foram positivas para CD90, um marcador inespecífico expresso em uma ampla variedade de tipos celulares e células-tronco ativadas, e para o CD56 e CD13. Foram também relativamente positivas para marcadores de células hematoendoteliais primitivas (AC133 e KDR), embora em menor proporção se comparado ao CD90. Para os demais marcadores hematopoéticos (CD34, CD45, CD117, CD43, CD38 e CD11b) e endotelial (CD31), as CTEhs foram negativas. N=3.

Tabela 2 – Imunofenotipagem das CTEhs para marcadores hematopoéticos e mesenquimais.

	CD71	CD235a	CD15	CD16	CD73
% ± DP	20,17 ± 7,46%	0,31 ± 0,27%	0,05 ± 0,09%	0,12 ± 0,10%	0,13 ± 0,23%

DP = Desvio Padrão

Tabela 3 – Imunofenotipagem das CTEhs para marcadores hematopoéticos.

	CD3	CD4	CD19	CD20
% ± DP	0 ± 0%	0,08 ± 0,13%	0,05 ± 0,09%	0,05 ± 0,04%

DP = Desvio Padrão

4.2 CTEhs apresentam características morfológicas de células indiferenciadas

Devido à sua natureza epitelial, as CTEhs cresceram *in vitro* formando colônias de células justapostas. As colônias foram mantidas sobre matrigel em meio de cultivo mTeSR® (Figura 11A) ou sobre uma camada de células alimentadoras (MEFs) inativadas (Figura 11B) em meio DMEM/F12 suplementado (Ver Material e Métodos). As colônias foram repicadas mecanicamente a cada 7-10 dias ou quando atingiam um tamanho ótimo para repique.

Quando eram mantidas por mais de 10 dias, as colônias começavam a apresentar um centro com tonalidade marrom e sinais de diferenciação nas bordas (dados não mostrados). Independentemente, por fenômenos pouco conhecidos, mas que podem ser atribuídos a variações nas condições de cultivo, na viabilidade dos reagentes e a propriedades intrínsecas das próprias CTEhs, após o repique e aderência dos “clumps” de CTEhs ao matrigel, frequentemente algumas colônias iniciavam uma diferenciação espontânea e passavam a adquirir características fibroblastóides (dados não mostrados).

Contudo, a presença de regiões diferenciadas nas colônias não inviabilizou o seu uso para expansão e uso nos ensaios de diferenciação. Para evitar o repique de células diferenciadas, as regiões das colônias que ainda apresentavam características de estado indiferenciado eram criteriosamente selecionadas e repicadas mecanicamente. Colônias

indiferenciadas eram facilmente identificadas, pois se apresentavam claras e com células bem justapostas e pequenas (Figura 11).

Figura 11 – Morfologia das CTEhs em cultura. Análise por microscopia de contraste de fase mostra a presença de colônias de CTEhs com a morfologia indiferenciada característica em cultivo sobre matrigel (A) e sobre MEFs (B). A e B, aumento de 4x.

A análise morfológica das colônias de CTEhs foi realizada também por microscopia óptica de luz após a coloração com Giemsa. Conforme mostra a figura 12, observa-se a morfologia epitelial típica das células embrionárias, de crescimento justaposto, tamanho pequeno e núcleo grande em relação ao citoplasma, contendo um a dois nucléolos.

Figura 12 – Características morfológicas das CTEhs. Observa-se características de células epiteliais com conexões adjacentes com as demais células das colônias. As CTEhs são pequenas, com núcleo grande em relação ao citoplasma, contendo 1 a 2 nucléolos. A e C, 10x; B, 20x. Coloração com Giemsa.

4.3 As CTEhs matriz possuem cariótipo normal e propriedades de células pluripotentes *in vitro* e *in vivo*

A avaliação citogenética da linhagem de CTEh recebida da WiCell revelou um padrão cariotípico 46,XY normal quando analisado por bandamento G convencional (Figura 13).

Figura 13 – Caracterização citogenética da linhagem de CTEh H1 (WA01) recebida da WiCell em P23. As células apresentaram um perfil cariotípico normal 46, XY.

Avaliações posteriores relativas ao potencial pluripotente dessas células demonstraram que elas eram capazes de formar corpos embrióides *in vitro* (Figura 14) e teratomas *in vivo* (Figura 15).

Figura 14 – Avaliação do potencial pluripotente das CTEhs *in vitro*. As CTEhs foram capazes de formar estruturas esféricas, denominadas corpos embrióides, quando cultivadas em condições próprias em placas de baixa aderência. Os corpos embrióides são estruturas esféricas formadas *in vitro* a partir de células pluripotentes, as quais abrigam o desenvolvimento de diversos tipos celulares e tecidos em seu interior, demonstrando o potencial pluripotente *in vitro* dessas células. A e B, 10x.

Figura 15 – Avaliação do potencial pluripotente das CTEhs *in vivo*. As CTEhs foram capazes de formar teratomas, tumores que abrigam a formação de diversos tipos celulares e tecidos, quando injetadas em camundongos imunodeficientes NOD/Scid, demonstrando o seu potencial pluripotente *in vivo*. A, Cartilagem. B, estruturas de origem ectodérmica. C, tecido muscular. D, tecido epitelial. E, epitélio intestinal. F, vasos e células sanguíneas. A, B e E, 10X. C, D e F, 20x. Coloração com hematoxilina e eosina.

4.4 Caracterização morfológica e imunofenotípica dos fibroblastos de embriões de camundongos (MEFs)

As MEFs foram obtidas de culturas primárias de fibroblastos isolados de embriões de camundongos (E13.5 a E14.5), conforme descrito no Material e Métodos. Após o plaqueamento, as culturas das células aderentes constituíram-se de uma população bem heterogênea de células contendo principalmente fibroblastos que cresciam de forma isolada ou formando colônias (Figuras 16A). As MEFs foram cultivadas até a 3ª passagem para serem utilizadas na expansão das CTEhs e nos ensaios de diferenciação das CTEhs em células hematopoéticas. Quando as culturas atingiram a 3ª passagem, as colônias de células fibroblastóides e epiteliais haviam sido eliminadas, observando-se uma predominância de fibroblastos, maiores que os observados em 1ª passagem, em meio a uma população heterogênea de células (Figuras 16C).

Figura 16 – Caracterização morfológica das MEFs. Observa-se que as MEFs são constituídas por uma população heterogênea de células com predominância de fibroblastos. MEFs em 1^a passagem – P1 (A) frequentemente apresentam colônias de células fibroblastóides (seta), originadas de agregados celulares não digeridos durante a derivação das células. Em P2 (B) e P3 (C), a expansão das células promove o desaparecimento dessas colônias. A, 5X. B e C, 20x. Microscopia de contraste de fase.

Para avaliar possíveis reações inespecíficas entre os anticorpos anti-humanos empregados nos experimentos de caracterização das células hematopoéticas originadas, com epítomos presentes na superfície das células murinas, foi realizada a avaliação imunofenotípica das MEFs em 3^a passagem (N=1) para verificar a expressão dos principais marcadores de superfície avaliados durante a diferenciação das CTEhs em células hematopoéticas (Figura 17). Os resultados demonstraram que as MEFs são negativas ou apresentam baixa reatividade com os anticorpos utilizados, o que descarta a possibilidade da interferência das células murinas na avaliação do imunofenótipo das células hematopoéticas derivadas de células embrionárias humanas pelo presente método.

Figura 17 – Avaliação imonufenotípica das MEFs para marcadores de células hematopoéticas humanas. Observa-se que as células murinas não apresentam reatividade com anticorpos anti-humanos quando avaliadas por citometria de fluxo. N=1.

4.5 Células-tronco hematopoéticas surgem através de um endotélio hemogênico e espontaneamente em íntima relação com células mesenquimais/endoteliais-like

A diferenciação das colônias de CTEhs mostrou-se bastante complexa, envolvendo o desenvolvimento de uma estrutura semelhante a um “cobblestone” (Blazsek, Chagraoui *et al.*, 2000) contendo diversos tipos celulares que, de certo modo, serviram de suporte para o surgimento, proliferação e expansão das células-tronco e células progenitoras hematopoéticas. Entre o 6º e o 10º dia de diferenciação, estruturas semelhantes a capilares começaram a emergir no interior das colônias (Figuras 18A e B, setas vermelhas). As células passaram a adquirir morfologia mais fibroblastóide e começaram a se organizar formando estruturas semelhantes aos capilares sanguíneos. Frequentemente, observava-se a formação de estruturas vasculares-like maiores (Figura 18D), constituídas por duas linhas de células fibroblastóides que se organizavam paralelamente uma à outra, com um lúmen no centro e células situadas externamente que abraçavam a estrutura, lembrando a histologia dos vasos sanguíneos.

Entre o 10º e o 17º dia de diferenciação, células com morfologia arredondada começaram a emergir no interior das colônias e a preencher o interior das estruturas capilares-like (Figuras 18A, B), conhecidas como endotélio hemogênico (Zambidis *et al.*, 2005; Lacrin *et al.*, 2009; Ferreras *et al.*, 2011), bem como podiam também ser observadas proliferando fora das estruturas vasculares (Figura 18C). Essas células passaram a proliferar no interior das colônias em íntimo contato com as células alimentadoras e com o “estroma” formado por outros tipos celulares que se diferenciaram a partir das CTEhs.

Figura 18 – Caracterização morfológica da diferenciação hematopoética via endotélio hemogênico. A e B, estruturas capilares-like formam-se no interior das colônias em diferenciação (setas vermelhas), e originam as CTHs (células arredondadas no interior das estruturas capilares-like), as quais começam a proliferar no interior dessas estruturas. C, CTHs também são observadas em expansão fora das estruturas capilares-like. D, formação de grandes estruturas vasculares (seta preta). A, B e C, 20X. D, 40X. Microscopia de contraste de fase.

Além de serem originadas do endotélio hemogênico, em determinadas regiões das colônias em processo de diferenciação, células arredondadas surgiram em contato íntimo com células que apresentavam morfologia mesenquimal/endotelial-like e que não formavam estruturas vasculares-like (Figuras 19A), demonstrando que células hematopoéticas podem surgir por outros mecanismos, e não necessariamente pelo endotélio hemogênico. Ainda, frequentemente, pequenos aglomerados de células arredondadas aderidas às colônias em diferenciação foram observados (Figuras 19B), lembrando o aspecto morfológico das colônias blásticas descritas por Lu e cols. (2007a), que são células mais primitivas com capacidade de se diferenciarem em ambas as linhagens endotelial e hematopoética. Em ambos os casos, as células arredondadas perderam posteriormente a aderência com as células alimentadoras e originaram uma população de CPHs que proliferava em suspensão no sistema de cultivo.

Figura 19 – Surgimento das CTHs via endotélio hemogênico-independente. CTHs surgiram também de maneira independente do endotélio hemogênico. A, observa-se o surgimento de CTHs (seta vermelha) em íntimo contato com células de morfologia mesenquimal/endotelial no interior de colônias em diferenciação que não formaram as estruturas capilares-like. B, observa-se a formação de colônias blásticas (setas pretas), constituídas por um aglomerado de poucas células arredondadas, conforme descrito por Lu et al. (2007a). A, 20X. B, 40X. Microscopia de contraste de fase.

4.5.1 Caracterização morfológica e imunofenotípica das colônias de CTEhs em diferenciação

As colônias diferenciadas foram avaliadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo para caracterizar a presença das células hematopoéticas em dois momentos (N=1) durante a diferenciação: nos dias 17 e 24 (Figuras 20 e 21), períodos nos quais as CTHs já podiam ser claramente visualizadas no início do seu desenvolvimento e quando puderam ser coletadas em grande quantidade, respectivamente. Para isso, as colônias foram extraídas mecanicamente e digeridas com *Tryple*® (Ver Materiais e Métodos). As análises revelaram um aumento de 2,7 vezes na população de células AC133⁺ (Figura 20) e de 1,3 vezes na população de células KDR⁺ (Figura 21) positivas entre o 17º e 24º dias, demonstrando um aumento na população de precursores hematopoéticos primitivos, descritos na literatura como detentores de potencial hematoendotelial.

Além disso, foi observada uma diminuição de 2,1 vezes na população de células positivas para CD71, ao passo que houve uma elevação de 4,8 vezes na população de células positivas para CD235a, evidenciando a diminuição na população de células progenitoras eritróides e o aumento de células eritróides mais maduras (Figura 21). Outros marcadores hematopoéticos também aumentaram entre o 17º e o 24º dias entre as populações de células isoladas das colônias em diferenciação: CD45 (3,5 vezes), CD34 (3,25 vezes), CD43 (2

vezes) e CD31 (1,6 vez) (Figura 20), refletindo um aumento nessas populações de células hematopoéticas.

Surpreendentemente, a avaliação da presença do antígeno Sox2 nas colônias demonstrou uma elevação considerável entre os dias 17 e 24 de diferenciação (Figura 21). Sox2 tem sido amplamente utilizado na identificação de células pluripotentes, a exemplo das CTEhs, e o aumento da sua expressão nas células das colônias em processo de diferenciação esteve diretamente associado ao período no qual as células hematopoéticas começaram a proliferar exponencialmente no interior das colônias.

Figura 20 – Caracterização imunofenotípica das células obtidas das colônias em diferenciação no 17º dia (D+17) e 24º dia (D+24). Observa-se um aumento na população de células positivas para o marcador de célula hematopoética primitiva (AC133) e para marcadores de células hematopoéticas mais diferenciadas (CD45, CD34, CD43, CD31) do 17º para o 24º dia de diferenciação das colônias. N=1.

Figura 21 – Caracterização imunofenotípica das células obtidas das colônias em diferenciação no 17º dia (D+17) e 24º dia (D+24). Observa-se uma diminuição na população de células positivas para CD71, em contraste ao aumento da população de células positivas para os marcadores CD235a, KDR e Sox2 entre o 17º e o 24º dia de diferenciação das colônias, demonstrando um aumento na população de células eritróides maduras (CD235a) e de CTHs primitivas (KDR). O aumento de Sox2 esteve correlacionado com a proliferação exponencial da população de células hematopoéticas entre os dias avaliados. N=1.

A avaliação morfológica das células que constituíam as colônias aos 24 dias de diferenciação, por coloração com Giemsa, revelou a presença de diversos tipos celulares hematopoéticos, tais como células progenitoras hematopoéticas mais primitivas sem sinais de comprometimento com a diferenciação em linhagens hematopoéticas específicas, células mais diferenciadas comprometidas com a linhagem mielóide, eritroblastos, e neutrófilos e macrófagos maduros (Figura 22).

Figura 22 – Caracterização morfologia das células hematopoéticas presentes nas colônias de CTEhs aos 24 dias (D+24) de diferenciação. A análise citológica das colônias permitiu verificar a predominância de células progenitoras hematopoéticas sem sinais de diferenciação em linhagens hematopoéticas específicas (CP), e de células progenitoras comprometidas com a linhagem mielóide (CPM), além da presença de eritroblastos (Er), e neutrófilos (N) e macrófagos (M) maduros. A, B, C e D, 63x. Coloração com Giemsa.

Também foram observadas nas culturas de diferenciação, regiões nas colônias de CTEhs que apresentavam um grande aglomerado de células que conferia uma tonalidade marrom-escuro a essas regiões, descritas aqui como “zonas de eritropoese” (Figuras 23A e B). Após o isolamento e digestão enzimática dessas colônias, a análise citológica por coloração de May-Grunwald Giemsa demonstrou que essas regiões com tonalidade marrom eram ricas

em eritrócitos em estágio final de maturação que se diferenciaram a partir das CTEhs, além de fibroblastos, provavelmente de origem murina (MEF) (Figuras 23C, 23D, 23E, 23F).

Figura 23 – Formação de zonas de eritropoese. A análise citológica das regiões das colônias com tonalidade marrom-escura demonstrou a riqueza dessas áreas em células da linhagem eritróide em estágio de maturação final, com a presença de eritroblastos (Er) e de eritrócitos maduros (E). A, 10X. B, 40X. C, D e F, 100X. E, 63X. Coloração de May-Grunwald Giemsa.

4.6 As células-tronco hematopoéticas originadas no interior das colônias de CTEhs diferenciadas proliferam, diferenciam-se e formam uma população de células progenitoras hematopoéticas que cresce em suspensão

Durante o processo de diferenciação das CTEhs em células hematopoéticas foi observado que, após o surgimento das CTHs dentro das colônias de CTEhs em diferenciação via endotélio hemogênico-dependente e endotélio hemogênico-independente, que permaneciam aderidas às células alimentadoras do sistema de diferenciação, começavam a proliferar intensamente no interior das colônias, perdiam gradualmente a aderência e passavam a proliferar de forma livre e individualizada em suspensão no meio de diferenciação (Figura 24). Adicionalmente, essas células que perdiam a adesão com as demais células da colônia, apresentavam potencial de aderência a outras regiões do sistema de cultivo sobre as células alimentadoras.

Figura 24 – Proliferação de células progenitoras hematopoéticas no sobrenadante do cultivo durante a diferenciação. As CTHs originadas nas colônias de CTEhs diferenciadas proliferam e originam uma população de células progenitoras hematopoéticas que crescem em suspensão no sistema de diferenciação. 20X. Microscopia de contraste de fase.

A avaliação da viabilidade dessas células presentes no sobrenadante do meio de cultivo por citometria de fluxo aos 19 dias de diferenciação, revelou que $71 \pm 9,54\%$ (N=3) delas eram células viáveis e constituíam uma população de células vivas que proliferavam em suspensão nas culturas de diferenciação. A posterior análise da expressão de marcadores de superfície hematopoéticos também por citometria de fluxo (N=3) demonstrou que metade dessa população de células, em média, expressava o marcador CD45, além dos marcadores eritróides CD71 e CD235a, e em menor quantidade, foram observadas células expressando CD34 ($5,33 \pm 1,15\%$) (Figura 25).

Figura 25 – Caracterização imunofenotípica das células hematopoéticas do sobrenadante do meio de cultivo aos 19 dias de diferenciação (D+19). A avaliação imunofenotípica dessa população de células revelou a sua riqueza em células hematopoéticas positivas para o marcador CD45, e em menor proporção para os marcadores hematopoéticos CD34, CD71 e CD235a. N=3.

Após a identificação das células hematopoéticas presentes no sobrenadante do meio de diferenciação, foi realizada a caracterização imunofenotípica dessas células durante diferentes períodos dos ensaios de diferenciação, mais precisamente nos dias 24 (N=3), 31 (N=3), 40 (N=1), 46 (N=1) e 51 (N=1).

As análises imunofenotípicas das células hematopoéticas obtidas do sobrenadante das culturas de diferenciação para marcadores hematopoéticos linhagem não-específicos (Figuras 26, 30 e Tabela 4) e linhagem-específicos (Figuras 27, 28, 29 e Tabela 4), revelaram a presença de células progenitoras hematopoéticas positivas para CD45 (correspondente a mais de 50% da população de células, em média) e para outros marcadores hematopoéticos, tais como CD34, CD43, CD38, CD31, CD14, CD15, CD16, CD56, marcadores linfóides (Figura 29) e marcadores de células hematopoéticas primitivas (Figura 30), e demonstraram um

aumento gradual dessa população de células, sendo o 31º dia de diferenciação, o dia no qual foi verificado a maior quantidade de células expressando antígenos hematopoéticos.

Exceto o marcador CD235a (Figura 28) cujo maior pico de expressão foi observado no 24º dia e aos 31 dias teve uma redução na sua expressão, em detrimento do aumento gradual de populações de células expressando outros marcadores mielóides específicos (Figura 27) de neutrófilos (CD15 e CD16) e monócitos (CD14). As caracterizações para marcadores hematopoéticos demonstraram que, ao passo que as CPHs realizavam sua expansão em suspensão elas diferenciavam-se progressivamente em células mielóides granulocíticas, monocíticas e eritróides maduras.

Foram realizados ensaios em triplicata (N=3) durante os dias 19, 24 e 31 de diferenciação para melhor caracterizar imunofenotipicamente as células hematopoéticas geradas, visto que aos 31 dias foi obtido a maior proporção de células expressando antígenos hematopoéticos. No entanto, até os 51 dias de cultivo as células ainda proliferavam intensamente em suspensão no meio de diferenciação, todavia, os resultados das análises imunofenotípicas dos dias 40, 46 e 51 (Tabela 4), estão baseados apenas em um estudo isolado (N=1), não tendo sido realizadas as replicatas por se tratar de um período demasiadamente longo. Contudo, mesmo sendo uma avaliação isolada, as análises imunofenotípicas demonstraram que as células hematopoéticas presentes no sobrenadante esgotaram-se gradativamente, como observado através da redução gradual na população de células expressando os antígenos hematopoéticos. Essa depleção da população de células hematopoéticas não-aderentes pode ser devido, em grande parte, às coletas seriadas realizadas semanalmente para a caracterização das mesmas, ou pode refletir o esgotamento da população de CPHs mais primitivas, uma vez que células mielóides e eritróide maduras pouco proliferam e tem um tempo de vida pequeno, ou até mesmo, ser um reflexo de ambos os fatores associados.

Figura 26 – Caracterização imunofenotípica das células hematopoéticas do sobrenadante para marcadores hematopoéticos não-específicos. Observa-se um aumento na população de células expressando tais marcadores. Uma sensível redução na expressão do marcador CD34 foi verificado. N=3.

Figura 27 – Caracterização imunofenotípica das células hematopoéticas do sobrenadante para marcadores da linhagem mielóide. Foi observado um expressivo aumento na população de células positivas para os marcadores de células da linhagem granulocítica (CD15 e CD16), uma sensível redução na expressão do marcador de célula monocítica (CD14), e um leve aumento na população de células positivas para o marcador de célula NK (CD56). N=3.

Figura 28 – Caracterização imunofenotípica das células hematopoéticas do sobrenadante para marcadores da linhagem eritróide. Observa-se um aumento na população de células positivas para o marcador CD71 e uma redução na população de células positivas para o marcador CD235a, indicando uma diminuição na população de células eritróides mais maduras, em contrapartida ao aumento de células hematopoéticas mais imaturas. N=3.

Interessantemente, as análises imunofenotípicas para marcadores de células linfóides T (CD3, CD4 e CD8) e para marcadores de células linfóides B (CD19 e CD20), revelaram uma pequena população de células expressando antígenos linfóides (Figura 29), demonstrando que o presente método de diferenciação favorece o surgimento e expansão das CPHs da linhagem mielóide e não exerce fortes estímulos sobre a diferenciação linfóide. Isso pode ser devido à ausência de citocinas no meio de diferenciação que direcionam a diferenciação linfóide, tais como IL2 e IL7, os quais têm sido amplamente empregados nos protocolos de diferenciação das CTEhs em células da linhagem linfóide.

Figura 29 – Caracterização imunofenotípica das células hematopoéticas do sobrenadante para marcadores de linhagem linfóide. Observa-se uma maior população de células positivas para marcadores de células linfóide T (CD3, CD4 e CD8), em relação à população de células positivas para marcadores de células linfóides B (CD19 e CD20), embora em todos os casos, ambas as classes de marcadores linfóides estiveram presentes em baixas proporções. N=3.

Com relação aos marcadores AC133 e KDR, populações de células positivas para esses marcadores não tiveram grandes alterações em quantidade entre dias 24 e 31 (Figura 30), nos quais foram coletadas as células hematopoéticas da sobrenadante do sistema de diferenciação. No entanto, as análises imunofenotípicas demonstraram que as células do sobrenadante são mais pobre em células progenitoras hematopoéticas mais primitivas em relação às células isoladas das colônias de CTEhs em diferenciação. Ainda, houve um sensível aumento na população de células expressando o marcador CD117, embora este tenha sido identificado em muito baixa proporção. Adicionalmente, foi observada uma leve diminuição do receptor de quimiocina CXCR4, um antígeno relacionado ao potencial de *homing* das CTHs (Figura 30).

Tabela 4 – Expressão dos marcadores hematopoéticos nos dias 40, 46 e 51 de diferenciação

	D+40	D+46	D+51
CD45	61%	41%	34%
CD34	5%	3%	3%
CD43	27%	22%	7%
CD38	25%	22%	15%
CD31	77%	77%	8%
CD71	30%	38%	3%
CD235a	8%	8%	11%
CD14	20%	29%	10%
CD15	0%	3%	0%
CD16	10%	7%	2%

Figura 30 – Caracterização imunofenotípica das células hematopoéticas do sobrenadante para marcadores de células progenitoras hematopoéticas primitivas. Populações de células positivas para marcadores de células progenitoras hematopoéticas primitivas estiveram presente em baixas proporções entre as células coletadas do sobrenadante tanto aos 24 dias quanto aos 31 dias de diferenciação, indicando a diminuída presença deste tipo de célula primitiva entre as células do sobrenadante. N=3.

4.7 Células progenitoras hematopoéticas CD45⁺ coexpressam marcadores *pan*-hematopoéticos e hematopoéticos linhagem-específicos

Para verificar se alguns marcadores avaliados eram coexpressos com os marcadores CD43, CD31, CD71, CD38, CD15 e CD16 na população de células hematopoéticas CD45⁺, foram coletadas no 31º dia as células do sobrenadante do sistema de diferenciação e realizado o ensaio de dupla marcação para tais marcadores contra o anticorpo anti-CD45 (N=1). Ficou demonstrado que a população de células CD45⁺ coexpressava todos os demais marcadores analisados (Figura 31), sendo em quase sua totalidade (mais de 92%) CD45⁺CD43⁺, CD45⁺CD31⁺, CD45⁺CD71⁺. Foi observado também que aproximadamente metade da população de células CD45⁺ coexpressavam marcadores de células hematopoéticas comprometidas com a linhagem mielóide granulocítica (CD38, CD15 e CD16).

Figura 31 – Avaliação da coexpressão de marcadores hematopoéticos em células CD45⁺ coletadas do sobrenadante do meio de diferenciação. Verifica-se que as células CD45⁺ são em quase sua totalidade CD45⁺CD43⁺, CD45⁺CD31⁺ e CD45⁺CD71⁺, e aproximadamente 50% das células CD45⁺ coexpressam o marcador de célula hematopoética mais diferenciada (CD38) e marcadores da linhagem granulocítica (CD15, CD16). N=1.

4.8 Caracterização imunofenotípica das células progenitoras hematopoéticas por microscopia confocal

Para validar os resultados obtidos por imunofenotipagem das células pela técnica de citometria de fluxo, foram realizados ensaios de imunocitoquímica por microscopia confocal para alguns marcadores de superfície. As células obtidas das colônias em processo de diferenciação revelaram uma intensa marcação para o KDR (Figura 32), um marcador de superfície que tem emergido como sendo expresso em células hematopoéticas primitivas.

Figura 32 – Marcação para o antígeno de superfície KDR em células coletadas das colônias em diferenciação aos 17 dias. Observa-se uma grande quantidade de células KDR⁺, demonstrando a riqueza das colônias de CTEhs diferenciadas, em células progenitoras hematopoéticas mais primitivas, o que explica a propriedade das colônias, citadas anteriormente, de originarem estruturas capilares-like e CTHs, como tem sido relatada essa propriedade das células KDR⁺ na literatura. Marcação: KDR(488) + Faloidina + DAPI.

Em contrapartida, o sobrenadante das culturas de diferenciação demonstraram a presença de células positivas para marcações anti-CD45 (Figura 33), anti-CD43 (Figura 34), anti-CD90 (Figura 35), anti-CD31 (Figuras 33 e 35), e anti-CD235a (Figura 36), corroborando os dados obtidos pelos ensaios de citometria de fluxo.

Interessantemente, as marcações com anticorpos anti-CD45 foram positivas em células que apresentavam também morfologia de células hematopoéticas pouco diferenciadas (Figura 33, seta vermelha) e não somente em células apresentando características morfológicas de células hematopoéticas mielóides mais diferenciadas (Figura 33, seta roxa), corroborando a hipótese de que a população de células obtida a partir da diferenciação das CTEhs era constituída em parte de células progenitoras hematopoéticas mais indiferenciadas, aparentemente, sem comprometimento com nenhuma linhagem específica.

Células CD31⁺ também foram visualizadas, no entanto, com marcação menos intensa e em menor frequência quando comparadas às marcações de células CD45⁺. Foi verificada também por microscopia confocal, a coexpressão dos antígenos CD31 tanto em células CD45⁺ quanto em células CD90⁺ (Figuras 33 e 35). Adicionalmente, foram observadas células CD43⁺, e células com características morfológicas de eritroblastos CD235a⁺, demonstrando presença deste tipo de célula após a diferenciação e a especificidade da marcação (Figura 36).

Figura 33 – Marcação para os antígenos de superfície CD45 e CD31 em células coletadas do sobrenadante no 24º dia de diferenciação. Foi verificada a presença de células positivas somente para o marcador CD45 (marcação em verde), como também de células CD45⁺CD31⁺ (verde + vermelho). A seta vermelha indica a marcação para o antígeno CD45 em células com morfologia indiferenciada. A seta roxa indica a marcação para o antígeno CD45 em células hematopoéticas com características da linhagem mielóide. Marcação: CD45(FITC) + CD31(A594) + DAPI.

Figura 34 – Marcação para o antígeno de superfície CD43 em células coletadas do sobrenadante no 24º dia de diferenciação. Observa-se a presença de células fortemente positivas para o marcador CD43. Marcação: CD43(FITC) + DAPI

Figura 35 – Marcação para os antígenos de superfície CD90 e CD31 em células coletadas do sobrenadante no 24º dia de diferenciação. Verifica-se a presença de células coexpressando ambos os antígenos ($CD90^+CD31^+$). Marcação: CD90(FITC) + CD31(A594) + DAPI.

Figura 36 – Marcação para o antígeno de superfície CD235a em células coletadas do sobrenadante no 24º dia de diferenciação. Foram observadas células fortemente CD235a⁺. Marcação: CD235a(FITC) + DAPI.

4.9 Caracterização morfológica das células progenitoras hematopoéticas isoladas do sobrenadante do sistema de diferenciação

Para caracterizar morfológicamente as células hematopoéticas derivadas da diferenciação das CTEhs e isoladas a partir do sobrenadante das diferenciações, foram preparadas lâminas das células por *cytospin* e coradas com giemsa (Ver Material e Métodos). As preparações citológicas permitiram observar que foram originados todos os tipos celulares das linhagens mielóide e eritróide em diferentes estágios de maturação.

As células obtidas do sobrenadante do sistema de diferenciação aos 19 e 24 dias de diferenciação demonstraram uma grande concentração de eritroblastos em diferentes estágios de maturação e eritrócitos maduros (Figura 37). Aos 31 dias, neutrófilos segmentados maduros (Figura 38), células mielomonocitárias primitivas em estágios iniciais de diferenciação e sem evidências de granulação citoplasmáticas específicas, macrófagos maduros, e células hematopoéticas muito pouco diferenciadas (Figura 38C e 39) passaram a ser observadas em maior proporção.

Figura 37 – Análise citológica do sobrenadante no 19° (A) e 24° (B) dias de diferenciação. A análise morfológica das células do sobrenadante do sistema de diferenciação revelou uma grande quantidade de eritrócitos maduros (A e B, setas), eritroblastos (A e B, Er) e macrófagos (B, M). A e B, 63X. Coloração com Giemsa.

Figura 38 – A análise morfológica das células do sobrenadante no 31° dia de diferenciação revela a presença de células da linhagem neutrofílica. As análises morfológicas do sobrenadante aos 31 dias de diferenciação revelaram uma grande quantidade de neutrófilos maduros (setas) e de células progenitoras mielóides (CPM). A, B e C, 63X. Coloração com Giemsa.

Frequentemente, foram observados eritroblastos localizados no interior de macrófagos (Figura 39D), como já relatado na literatura que macrófagos e eritroblastos exibem íntima interação durante a hematopoese, uma vez que os macrófagos auxiliam na maturação dos eritroblastos por meio da fagocitose do seu núcleo. Além disso, pôde ser observada claramente ainda a presença de células progenitoras hematopoéticas pouco diferenciadas e uma grande quantidade de células mielóides da linhagem granulocítica em diferenciação final, tais como neutrófilos segmentados com granulações citoplasmáticas específicas (Figuras 38 e 40C), e em menor quantidade, células granulocíticas eosinofílicas mais primitivas sem

lobulação nuclear (Figura 40C), como também células com núcleo bilobulado e possuindo granulações mais grosseiras que as dos neutrófilos em tonalidade vermelho-alaranjada (Figuras 40A e B).

Figura 39 – A análise citológica do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de células precursoras mielomonocíticas. Além da presença de células da linhagem neutrofílica, as análises morfológicas revelaram uma grande quantidade de células progenitoras mielomonocíticas (A, B, C e D), bem como de granulócitos (A, B e C), monócitos (C) e macrófagos maduros (D). M, macrófago. Er, eritroblasto. A, B, C e D, 63X. Coloração com Giemsa.

Figura 40 – A análise citológica do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de células da linhagem eosinofílica. Células da linhagem eosinofílica (Eo) também foram observadas aos 31 dias de diferenciação, bem como a presença de células progenitoras mielóides (CPM) e neutrófilos (N). A, B e C, 63X. Coloração com Giemsa.

As análises revelaram também uma grande quantidade de células com morfologia de núcleo variada e com granulação escura e bem grosseira, semelhantes a basófilos em diferentes estágios de maturação (Figura 41). Ainda, células gigantes possuindo mais de um núcleo e com características de megacariócitos foram observadas nas preparações citológicas das células colhidas do sobrenadante das diferenciações (Figura 42).

Figura 41 – A análise citológica do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de células da linhagem basofílica. Observa-se a presença de células da linhagem basofílica (Ba) com granulação escura e grosseira. A, B e C, 63X. Coloração com Giemsa.

Figura 42 – A análise citológica do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de megacariócitos. Foi observada a presença de dois megacariócitos (Meg) entre a população de células mielóides. A e B, 63X. Coloração com Giemsa.

Adicionalmente, as análises evidenciaram células da linhagem granulocítica com conformação nuclear aberrante (Figura 43), o que pode ter sido causada por artefato da técnica de *cytospin*, visto que se trata de uma técnica agressiva e que pode, eventualmente, danificar a morfologia das células, ou, pode mesmo ser evidências da produção de células

morfologicamente alteradas durante a diferenciação, demonstrando um assincronismo e/ou uma deficiência no processo de maturação das células granulocíticas.

Figura 43 – A análise citológica do sobrenadante no 31º dia de diferenciação revela a presença de células hematopoéticas da linhagem granulocítica com morfologia anormal. As análises morfológicas também revelaram a presença de células da linhagem granulocítica com características morfológicas nucleares aberrantes (setas). A, B e C, 63X. Coloração com Giemsa.

4.10 As células progenitoras hematopoéticas derivadas de células-tronco embrionárias humanas apresentam potencial clonogênico *in vitro*

Para avaliar se a população de células que foram isoladas das colônias diferenciadas e das células hematopoéticas recolhidas do sobrenadante do meio de diferenciação eram enriquecidas em CTHs/CPHs, foram realizados ensaios de cultivo dessas células em meio de cultivo semi-sólido de metilcelulose (Ver Material e Métodos) (N=3). As células isoladas das colônias diferenciadas foram capazes de originar todos os tipos de CFU (BFU-E, CFU-GEMM, CFU-GM e CFU-M), como demonstrado na figura 44. Em contrapartida, as células isoladas do sobrenadante também produziram CFU-GM, CFU-GEMM e BFU-E (Figura 45), mas não foram capazes de produzir colônias do tipo CFU-M.

Os resultados demonstraram um maior potencial clonogênico das células isoladas das colônias quando comparadas às células do sobrenadante, visto que elas foram capazes de produzir um maior número e mais variados tipos de colônias no ensaio clonogênico em meio semi-sólido ($p=0,020$) (Figura 46), principalmente colônias eritróides do tipo BFU-E. Em contrapartida, as células obtidas do sobrenadante obtiveram maior potencial de geração de colônias multilinhagens CFU-GEMM ($p=0,007$, Figura 46), e apesar de ter produzido maior número colônias de granulócitos e macrófagos CFU-GM, em média, a diferença não foi significativa.

Figura 44 – Unidades Formadoras de Colônias Hematopoéticas (CFUs) originadas a partir da população de células obtidas das colônias aos 17 dias de diferenciação. A, BFU-E (20X). B, CFU-GEMM (20X). C, CFU-GM (20X). D, CFU-M (20X). Microscopia de contraste de fase. BFU-E, Unidade Formadora de Colônias Eritróides primitivas. CFU-GEMM, Unidade Formadora de Colônias de Granulócitos, Eritrócitos, Macrófagos e Megacariócitos. CFU-GM, Unidade Formadora de Colônias de Granulócitos e Macrófagos. CFU-M, Unidade Formadora de Colônias de Macrófagos.

Figura 45 – Unidades Formadoras de Colônias Hematopoéticas (CFUs) originadas a partir da população de células isoladas do sobrenadante aos 19 dias de diferenciação. A, CFU-GM (10X). B, CFU-GEMM (40X). C, BFU-E (10X). CFU-GM, Unidade Formadora de Colônias de Granulócitos e Macrófagos. CFU-GEMM, Unidade Formadora de Colônias de Granulócitos, Eritrócitos, Macrófagos e Megacariócitos. BFU-E, Unidade Formadora de Colônias Eritróides primitivas.

Figura 46 – Quantificação das CFUs geradas *in vitro* pelas populações de células obtidas das colônias diferenciadas e do sobrenadante do sistema de diferenciação. As colônias apresentaram um maior potencial clonogênico se comparadas às células do sobrenadante.

* $p=0,020$, ** $p=0,008$, *** $p=0,007$, **** $p=0,009$.

4.11 Células-tronco embrionárias humanas são cromossomicamente instáveis

Apesar de terem apresentado cariótipo 46, XY normal quando compradas, para avaliar possíveis alterações citogenéticas decorrentes do prolongado período em cultivo e das técnicas de congelamento e descongelamento, foi realizado o cariótipo das CTEhs no dia em que foram iniciados os ensaios de diferenciação (D0) e, depois, das células hematopoéticas delas derivadas pelo presente método.

A cariotipagem das amostras demonstraram que as CTEhs são cromossomicamente instáveis, uma vez que apresentaram cariótipos variados entre as diferentes passagens e as diferentes alíquotas de células congeladas utilizadas nos ensaios de diferenciação. Uma alíquota de CTEh descongelada em P32 e cultivada até P38 para o início do ensaio de diferenciação mostrou perfil cariotípico 46, XY normal, quando avaliada pelo técnica de bandamento G (Figura 47A), e as células progenitoras hematopoéticas obtidas a partir deste ensaio também revelaram cariótipo 46, XY normal (Figura 47B).

Figura 47 – CTEhs em P38 utilizadas na diferenciação e as células progenitoras hematopoéticas delas derivadas apresentaram perfil cariotípico 46, XY normal.

Outra alíquota de CTEh descongelada em P32 e expandida até a P42 para realização da replicata do ensaio de diferenciação hematopoética apresentou cariótipo 50,XY,+6,+8,+12,+13[20] (Figura 48A) e as células progenitoras hematopoéticas obtidas deste ensaio apresentaram perfil cariotípico 50,XY,+6,+6,+7,+mar[20] (Figura 48B), evidenciando a instabilidade cromossômica das CTEhs, as quais adquiriram tal perfil cariotípico durante o seu cultivo e expansão e, por consequência, geraram células progenitoras hematopoéticas também cromossomicamente instáveis, que preservaram algumas das alterações observadas nas CTEhs em D0 e adquiriram novas alterações durante as etapas de diferenciação hematopoética.

Corroborando os resultados de instabilidade cromossômica das CTEhs através das análises cariotípicas, um dos ensaios de diferenciação hematopoética não foi bem-sucedido, uma vez que não foi capaz de produzir células progenitoras hematopoéticas viáveis. Este ensaio foi realizado sob as mesmas condições de diferenciação dos demais, no entanto, as células arredondadas que surgiram no interior das colônias, perderam a aderência e quando foram analisadas por citometria de fluxo por meio da marcação com iodeto de propídio (PI), evidenciaram que o sobrenadante era constituído por uma população de células mortas. Contanto, quando analisado o seu perfil cariotípico em das CTEhs em D0 utilizadas neste ensaio de diferenciação também mostraram alterações citogenéticas, com cariótipo 45, XO (Figura 49).

Figura 48 – Avaliação cariotípica das CTEhs P42 (A) e das células progenitoras hematopoéticas após a diferenciação (B). (A) As análises cariotípicas revelaram que as CTEhs utilizadas em P42 eram cromossomicamente instáveis e apresentaram cariótipo 50,XY,+6,+8,+12,+13[20]. As células progenitoras hematopoéticas (B) derivadas desta diferenciação mostraram cariótipo 50,XY,+6,+6,+7,+mar[20].

Figura 49 – Avaliação cariotípica das CTEhs P40. CTEhs em P40 apresentaram cariótipo 45, X0, e não foram capazes de produzir células progenitoras hematopoéticas.

Os resultados demonstraram que as CTEhs utilizadas nos ensaios de diferenciação hematopoética eram citogeneticamente instáveis, pois apresentaram variadas alterações com relação ao perfil cariotípico. Dos 3 ensaios de diferenciação que foram realizados com sucesso para caracterização das células progenitoras hematopoéticas, somente 2 tiveram seu perfil cariotípico por bandamento G realizado. Interessantemente, ambas as diferenciações que foram caracterizadas citogeneticamente tiveram uma eficiência na produção de células hematopoéticas menor (aproximadamente 50-65% de células CD45⁺) que o primeiro ensaio realizado (mais de 90% de células CD45⁺), o qual não teve sua análise cariotípica realizada. E, como mencionado, também foi realizada a avaliação cariotípica da CTEh em P40, da qual não foi possível obter células progenitoras hematopoéticas.

As CTEhs utilizadas nos ensaios de diferenciação corresponderam a diferentes alíquotas de células criopreservadas em nosso banco de células, o que justifica as variadas alterações citogenéticas observadas, visto que não partiram de um único clone, e sofreram diferentes influências dos métodos de cultivo para sua expansão e criopreservação. Foram observadas evidentes alterações cariotípicas numéricas por bandamento G em 2 das amostras analisadas, no entanto, análises de alterações estruturais por técnicas mais sensíveis e estudos adicionais são necessárias para avaliar mais precisamente quão instáveis são essas células e qual o impacto dessas alterações sobre a diferenciação hematopoética.

4.12 Células progenitoras hematopoéticas derivadas de CTEhs não apresentam potencial teratogênico

Para verificar se as células progenitoras hematopoéticas obtidas a partir da diferenciação das CTEhs pelo presente método, foi realizado o ensaio de formação de teratoma (Figura 50) (Ver Material e Métodos), com as células que apresentaram cariótipo 46, XY normal (CTEhs P38 D0 e população mista decélulas progenitoras hematopoéticas derivadas da CTEh P38). Os ensaios foram realizados em triplicata (N=3) e as análises revelaram que as CTEhs foram capazes de formar diversos tipos de tecidos, tais como cartilagem (Figura 50B), estruturas de origem ectodérmica (Figura 50C), tecido muscular (Figura 50D), tecido epitelial (Figura 50E) e epitélio intestinal (Figura 50F), demonstrando o potencial teratogênico dessas células. As células progenitoras hematopoéticas (população mista), por sua vez, não formaram outros tecidos além de estruturas vasculares e células sanguíneas (Figuras 50G, H e I), demonstrando que essas células não possuíam potencial

teratogênico, mas ainda detinham propriedades de CPHs primitivas com potencial hematopoético e endotelial. Contudo, estudo mais detalhados sobre as propriedades biológicas dessas células para verificação do potencial de reconstituição hematopoética ainda precisam ser realizados.

Figura 50 – Células progenitoras hematopoéticas derivadas de CTEhs não apresentam potencial teratogênico. Observa-se que as CTEhs foram capazes de originar diversos tipos de tecidos (B-F), ao passo que as células progenitoras hematopoéticas foram capazes apenas de gerar capilares e células sanguíneas (G-I). A, controle negativo (10X). B, osso (10X). C, tecido de origem ectodérmica (10X). D, tecido muscular (63X). E, tecido epitelial (63X). F, epitélio intestinal (10X). G (10X), H (100X) e I (63X), capilares e células sanguíneas. Coloração com hematoxilina e eosina. Experimento realizado em triplicata com as células hematopoéticas de um dos ensaios de diferenciação.

4.13 Células progenitoras hematopoéticas derivadas de células-tronco embrionárias humanas expressam em altos níveis genes relacionados à hematopoese

No intuito de avaliar algumas das características moleculares das CPHs obtidas a partir do sobrenadante do sistema de diferenciação, foi realizada a análise da expressão gênica por RT-PCR em Tempo Real para genes descrito na literatura como envolvidos no desenvolvimento das células hematopoéticas, tais como *tall* (*scl*), *prom1*, *notch1*, *lmo2*, *pecam1*, *CD34*, *ptprc* (*CD45*), *runx1*, *kit*, *kdr* e *sox2*, para verificar o quanto esses genes tiveram suas expressões moduladas nas populações mistas de CPHs em relação às CTEhs no dia 0 (D0) de diferenciação. Para tanto, foram analisadas as células coletadas em diferentes períodos do sistema de diferenciação, mais precisamente nos seguintes dias: 19 (D+19), 27 (D+27), 31 (D+31) e 40 (D+40). As análises de expressão gênica foram realizadas somente a partir de uma amostra de cada dia citado anteriormente (N=1), não tendo sido realizadas replicatas.

A maior diferença na expressão gênica relativa foi observada para o gene *CD45*, que teve sua expressão aumentada em mais de 600.000 vezes nas células D+19, mais de 800.000 vezes nas amostras D+27, e em mais de 1.000.000 de vezes nas células coletadas no 31º dia de diferenciação (D+31) em relação às CTEhs D0 (Figura 51A). Outro gene superexpresso foi o *CD31*, o qual teve sua expressão aumentada em todas as amostras, com um aumento de mais de 3.200 vezes no período D+31 em relação às CTEhs D0 (Figura 51B). Em ambos os casos, a expressão dos genes *CD45* e *CD31* esteve diretamente relacionada ao aumento progressivo das populações de células positivas para os marcadores CD45 e CD31 (codificadas por estes genes, respectivamente) observado pelas análises realizadas por citometria de fluxo, atingindo um pico máximo no 31º dia de diferenciação.

Com relação ao gene *runx1*, foi observado um aumento relativo na sua expressão superior a 600 vezes nos períodos D+19, D+31 e D+40 em relação às CTEhs D0 (Figura 51C). Do mesmo modo, os genes *tall* (Figura 51D) e *lmo2* (Figura 51E), apresentaram expressão relativa aumentada em mais de 30 vezes em todas as amostras analisadas em relação à CTEh D0.

O gene *prom1*, por sua vez, teve sua expressão modulada positivamente em mais de 15 vezes nas CPHs nos diferentes dias (Figura 51F). Adicionalmente, foi observado um aumento gradual na expressão do gene *CD34* nos dias 19 e 27, com pico no período D+31, dia no qual foi observada uma expressão relativa aumentada em 7,34 vezes desse gene nas CPHs em relação às CTEhs D0 (Figura 51G). De modo contrário aos resultados obtidos por citometria de fluxo, que demonstraram que a maior quantidade de células hematopoéticas positivas para o marcador CD34 foi no 19º dia de diferenciação ($5,33 \pm 1,15\%$), indicando que não houve uma correlação entre o período de pico na expressão desse gene com a proporção de células que expressavam na sua superfície a proteína por ele codificado.

Notch1 mostrou um aumento na sua expressão relativa em CPHs superior a 2 vezes no períodos D+27, D+31 e D+40 em relação às CTEhs D0 (Figura H). E, com relação aos demais genes *kdr* (Figura 51I), *kit* (Figura 51J) e *sox2* (Figura 51K), todos apresentaram expressão gênica *down-regulada* em todos os períodos analisados em relação às CTEhs D0, corroborando os resultados de imunofenotipagem que demonstraram que as proteínas de superfície codificadas por estes genes foram detectadas em baixa frequência pelo método de citometria de fluxo.

Para eliminar a possibilidade de células murinas que, eventualmente, pudessem estar presente entre a população de CPHs do sobrenadante que foram analisadas, uma vez que elas estiveram presentes (embora inativadas) no sistema de diferenciação, realizamos as análises da expressão dos mesmos genes analisados em CPHs, com MEFs cultivadas em meio próprio para expansão (MEF RP N6 P3) (N=1) e com MEFs cultivadas sob as mesmas condições das diferenciações e meio de cultivo empregados na diferenciação das CTEhs (MEF C(-) D+24) (N=1). Os resultados demonstraram que as células murinas não apresentaram expressão relativa desses genes, indicando que não houve interferência de células murinas nas análises e corroborando a fidedignidade dos resultados.

Figura 51 – Análise da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento das células hematopoéticas. Observa-se que as populações mistas de CPHs analisadas durante os diferentes dias de diferenciação (19, 27, 31 e 40) apresentam uma hiperexpressão do gene *CD45* (A), e expressam em altos níveis os genes *CD31* (B) e *runx1* (C); em níveis intermediários os genes *tal1* (D), *lmo2* (D) e *prom1* (F); em baixos níveis *CD34* (G) e *notch1* (H); e, apresentam os genes *kdr* (I), *kit* (J) e *sox2* (K) down-regulados. N=1.

DISCUSSÃO

4 Discussão

O desenvolvimento do presente trabalho permitiu o estabelecimento de um modelo de diferenciação de células-tronco embrionárias humanas (CTEhs) em células progenitoras hematopoéticas (CPHs) e células hematopoéticas maduras, o que possibilitou a obtenção de populações enriquecidas em células progenitoras hematopoéticas (CPHs) CD45⁺ que corresponderam, em média, a 70% ($71,5 \pm 17,67\%$) da população total de células, com coexpressão de outros marcadores hematopoéticos, tais como CD43, CD31, CD71, CD38, CD11b. Essas células apresentaram viabilidade de 71% ($\pm 9,54\%$), ao longo de todo o processo de diferenciação.

Funcionalmente, quando cultivadas em meio semi-sólido de metilcelulose, apresentaram potencial clonogênico *in vitro* e foram capazes de formar colônias hematopoéticas (CFUs) quando cultivadas em meio semi-sólido da ordem 1/574 células, em média, demonstrando a existência populações de células progenitoras hematopoéticas primitivas com capacidade de diferenciação multinhagem. E quando testadas quanto ao seu potencial teratogênico em modelos murinos, essas células não foram capazes de formar tumores, mas deram origem estruturas vasculares que abrigavam células hematopoéticas maduras.

Mimetizando o que ocorre nas regiões de hematopoese *in vivo*, tais como saco vitelino (Baron, 2003; Lensch e Daley, 2004), região AGM (Cumano, Ferraz *et al.*, 2001), placenta (Robin, Bollerot *et al.*, 2009), fígado fetal (Mikkola e Orkin, 2006) durante o desenvolvimento em humanos e modelos murinos, as células-tronco hematopoéticas (CTHs) se diferenciaram a partir das CTEhs em íntima relação com o fibroblastos de embrião murino (MEFs) e aos demais tipos celulares que surgiram a partir das colônias de CTEhs em diferenciação, formando um estroma para o desenvolvimento das CTHs em meio de diferenciação contendo soro fetal bovino (SFB) e um *cocktail* de citocinas e fatores de crescimento humano em baixas concentrações. Neste sistema, as CTHs proliferaram em íntimo contato com o estroma e originaram populações de CPHs, em grande parte positivas para o marcador CD45, que passaram a se multiplicar em suspensão após perderem a aderência ao estroma, mantendo o *pool* de células progenitoras e também originando células hematopoéticas maduras, que puderam ser coletadas do sobrenadante do sistema de diferenciação.

Diversos estudos têm relatado a obtenção de CPHs a partir da diferenciação das CTEhs por diferentes métodos. Os dois métodos mais comumente empregados para a diferenciação das CTEh em células da linhagem hematopoética são: a formação de corpos embrióides e o co-cultivo com células estromais (Kaufman *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Vodyanik *et al.*, 2005). Os corpos embrióides são estruturas esféricas tridimensionais formadas quando células pluripotentes são cultivadas em placas de baixa aderência, que abrigam o desenvolvimento de diversos tipos celulares, inclusive células hematopoéticas. Acredita-se que as interações célula-célula dentro dos corpos embrióides, de certa forma, favoreçam a diferenciação celular e supram a necessidade do contato célula-estroma para o surgimento das células hematopoéticas *in vivo*. Entretanto, trata-se de um processo altamente complexo, pouco controlável e, em alguns casos, desvantajoso no controle da indução da diferenciação por causa da dificuldade dos fatores externos alcançarem as células que se encontram no interior dessas estruturas (Doetschman, Eistetter *et al.*, 1985; Wiles e Keller, 1991).

Em sistemas de co-cultivo, a linhagem de célula estromal mais utilizada na diferenciação hematopoética a partir de CTEhs é a OP9 (Nakano, Kodama *et al.*, 1994), que foi estabelecida de camundongos *op/op* deficientes em fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), o qual possui efeitos nocivos durante o início do desenvolvimento das células hematopoéticas (Mukouyama, Hara *et al.*, 1998). Em suma, utilizando alguma dessas metodologias ou a associação de ambas, já foram publicados trabalhos produzindo células eritróides (Qiu, Olivier *et al.*, 2008), células dendríticas (Slukvin, Vodyanik *et al.*, 2006), megacariócitos (Gaur, Kamata *et al.*, 2006), macrófagos (Anderson, Bandi *et al.*, 2006), e linfócitos (Woll, Martin *et al.*, 2005; Galic, Kitchen *et al.*, 2006).

Aqui, nós descrevemos um protocolo de diferenciação para a obtenção de CPHs utilizando MEFs derivadas *in house* a partir de embriões de camundongos C57/BL6 entre os períodos E13.5 e E14.5, como células estromais. As MEFs têm sido amplamente empregadas na derivação e nos protocolos para expansão das CTEhs (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998; Kaufman, Hanson *et al.*, 2001; Draper, Pigott *et al.*, 2002; Stojkovic, Lako *et al.*, 2004). Baseado em estudos que demonstraram que a região AGM (aorta-gônada-mesonefros) formada durante o desenvolvimento de camundongos e humanos são os locais de início da hematopoese definitiva (Cumano, Ferraz *et al.*, 2001; Tavian, Robin *et al.*, 2001), foi hipotetizado que as MEFs, derivadas a partir da digestão de todos os tecidos dos embriões de camundongos exceto cabeça e fígado, tecidos estes que se apresentam em um estágio

posterior ao surgimento da região AGM (aproximadamente 3 dias de diferença entre o surgimento da região AGM em murinos [E9.5] e o isolamento das MEFs [E13.5-E14.5]), possuiriam, em parte, propriedades de potencial hematopoético dos tecidos isolados dessa região, e seriam mais fáceis de serem derivados e empregados nos estudos de diferenciação hematopoética das CTEhs, pois não exigiriam a dissecação microcirúrgica para isolamento das regiões de aorta, gônada e mesonefros.

Para promover a diferenciação hematopoética de forma mais eficiente, foi elaborado um meio de diferenciação contendo SFB e outros suplementos conforme descrito no item “Materiais e Métodos”, ao qual foram adicionadas citocinas e fatores de crescimento hematopoéticos que têm sido mais comumente descritos nos protocolos de diferenciação hematopoética via corpos embrióides (Chadwick, Wang *et al.*, 2003; Zhan, Dravid *et al.*, 2004), em baixas doses, uma vez que as células alimentadoras, em tese, já secretariam certa quantidade desses fatores. Inicialmente, foram adicionadas citocinas indutoras da formação de mesoderma durante os três primeiros dias, tais como BMP4, VEGF, TPO e SCF. Este período inicial de diferenciação utilizando tais citocinas tem sido descrito na literatura como tempo ótimo para o surgimento e proliferação de células com potencial hematoendoteliais primitivas (Chadwick, Wang *et al.*, 2003; Zhan, Dravid *et al.*, 2004). Passadas as 72 horas iniciais da diferenciação mesodérmica, tais citocinas foram trocadas por sete citocinas hematopoéticas (SCF, EPO, IL-3, IL-6, G-CSF, FLT3L e IGF) para dirigir a diferenciação hematopoética. O uso dessas citocinas justifica-se pela tentativa de mimetizar a influência do microambiente hematopoético que atua através da secreção de fatores solúveis que induzem e controlam a hematopoese.

Sabe-se atualmente, que os componentes que constituem o microambiente hematopoético, bem como os fatores solúveis por eles produzidos ou que chegam ao nicho de forma parácrina e as interações célula-célula, são os principais responsáveis pelos eventos de proliferação, diferenciação e sobrevivência das CTHs, CPHs e células hematopoéticas maduras. Todos esses fatores juntos atuam de forma integrada através de uma complexa e bem-regulada rede de vias regulatórias que exerce importante influência sobre as células hematopoéticas (Evans, 1997). No total, já foram descritos mais de vinte fatores hematopoéticos solúveis nas últimas quatro décadas que são essenciais para o desenvolvimento de todas as linhagens hematopoéticas e que atuam como estimuladores multilinhagem ou linhagem-específicos. Estes fatores apresentam uma grande variedade de funções biológicas sobre os mais variados tipos celulares e, em alguns casos, apresentam

redundância funcional e exercem funções sobrepostas a outros fatores de crescimento (Horiguchi, Warren *et al.*, 1987; Bociek e Armitage, 1996; Alexander, 1998; Reddy, Korapati *et al.*, 2000).

O estudo da citocina de BMP4 em modelos murinos demonstrou que esse fator é requerido para a eficiente formação do mesoderma. O desenvolvimento de camundongos deficientes no ligante do BMP4 (Winnier, Blessing *et al.*, 1995), no receptor tipo I (Mishina, Suzuki *et al.*, 1995) ou no receptor tipo II para BMP4 (Beppu, Kawabata *et al.*, 2000), não foram capazes de formar o folheto embrionário mesoderma e, conseqüentemente, os tecidos dele derivados. Em CTEmS também foi demonstrado que BMP4 também atua na indução da diferenciação mesodérmica (Johansson e Wiles, 1995; Wiles e Johansson, 1997; 1999; Kramer, Hegert *et al.*, 2000; Nakayama, Lee *et al.*, 2000; Czyz e Wobus, 2001; Loebel, Watson *et al.*, 2003; Park, Afrikanova *et al.*, 2004; Ng, Azzola *et al.*, 2005; Suzuki, Raya *et al.*, 2006).

O VEGF (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), um fator de crescimento multifuncional, possui importantes funções no desenvolvimento da vasculogênese regulando a proliferação, diferenciação, migração e apoptose de células precursoras endoteliais e células endoteliais maduras (Leung, Cachianes *et al.*, 1989; Breier, Albrecht *et al.*, 1992; Roberts e Palade, 1995; Gerber, Dixit *et al.*, 1998; Ferrara, 2000). Um subtipo de VEGF em específico, o VEGF-A₁₆₅, exerce importante papel na diferenciação hematopoética (Broxmeyer, Cooper *et al.*, 1995; Choi, Kennedy *et al.*, 1998; Nakayama, Fang *et al.*, 1998; Liang, Chang *et al.*, 2001) e tem sido implicado na formação de CTHs derivadas de CTEmS com grande capacidade de repovoamento medular após transplantadas (Miyagi, Takeno *et al.*, 2002), e também na determinação do desenvolvimento das linhagens eritróides primitiva e definitiva a partir de CTEmS (Keller, Kennedy *et al.*, 1993) e de CTEhs (Cerdan, Rouleau *et al.*, 2004)

Diversos estudos têm demonstrado também a importante influência da trombopoietina (TPO) nos eventos iniciais da hematopoese, atuando principalmente na proliferação e diferenciação de megacariócitos imaturos (Falkenburg, Harrington *et al.*, 1990). A combinação com IL-3, IL-6 e TPO é potencializa e promove um aumento na quantidade de Unidades Formadoras de Colônias de Megacariócitos (CFU-Mk), com aumento na ploidia dos megacariócitos (Horiguchi, Warren *et al.*, 1986). Não obstante, apesar de ser um forte indutor da megacariopoese, TPO não é específico para essa linhagem e notáveis efeitos sobre a mielopoese e eritropoese (Oster, Lindemann *et al.*, 1988). Foi relatado que a presença de TPO combinado com SCF e IL-3 ao meio de cultivo de células CD34⁺c-kit^{low}CD38^{low} isoladas da

MO humana, promove um aumento na produção de CFU-GM, CFU-E e CFU-GEMM (Morris, Valentine *et al.*, 1991; Saltman, Dolganov *et al.*, 1992).

O SCF (*Stem Cell Factor*) é um fator de crescimento hematopoético que exerce funções cruciais na regulação da hematopoese. A adição de SCF às combinações de citocinas em meio de cultivo promove a expansão e maturação de células hematopoéticas humanas. Como foi demonstrado que a adição de SCF em combinação com IL-3 e GM-CSF resulta no aumento do potencial de formação de colônias das CPHs, principalmente de colônias eritróides (Hanamura, Motoyoshi *et al.*, 1988; Shadle, Allen *et al.*, 1989).

Durante o desenvolvimento humano, sítios de hematopoese como o fígado fetal e a MO, expressam altos níveis de SCF, e parecem exercer importantes funções na manutenção das CTHs no nicho hematopoético (Broudy, 1997). E como relatado em humanos adultos, regularmente uma fração ínfima de CTHs deixa o microambiente medular, cai na circulação sistêmica e retorna ao nicho da MO (Ross, Pollak *et al.*, 1980; Verma, Fisher *et al.*, 1980; Mendez-Ferrer, Lucas *et al.*, 2008). Acredita-se que os diferentes gradientes de concentração de SCF atuando em conjunto com a quimiocina SDF-1, fazem com que, mesmo após saírem do microambiente hematopoético, as CTHs retornem ao microambiente medular e voltem a aderir ao estroma (Broudy, 1997; Nervi, Link *et al.*, 2006). Dessa forma, o efeito da mobilização das CTHs/CPHs que se desenvolveram no interior das colônias de CTEhs em diferenciação para o sobrenadante observado em nosso estudo, pode estar relacionado à presença do SCF no meio de diferenciação.

A eritropoietina (EPO) é um hormônio glicoprotéico essencial para a sobrevivência, crescimento, proliferação e diferenciação das células progenitoras eritróides (Jacobson, Goldwasser *et al.*, 1957; Krantz, 1991; Fisher, Koury *et al.*, 1996; Jelkmann, 2007a; b). A presença do EPO durante a hematopoese estimula o desenvolvimento de células da linhagem eritróide dos estágios iniciais de BFU-E (do inglês, *Erythroid Burst Colony-Forming Unit*) para os estágios mais maduro de CFU-E (do inglês, *Erythroid Colony-Forming Unit*). A BFU-E é uma célula eritróide mais imatura com baixa capacidade proliferativa. É altamente dependente de EPO e de outros fatores de crescimento hematopoéticos como IL-3, SCF e GM-CSF, requeridos para a formação de grandes colônias eritroblásticas (*bursts*) contendo aproximadamente 500 eritroblastos após 15 dias de cultivo em meio semi-sólido. Ao passo que a CFU-E é uma célula responsiva a baixas concentrações de EPO, com alta capacidade proliferativa, e que dá origem a colônias eritroblásticas constituídas por 8-49 células após 7 dias de cultivo em meio semi-sólido (Gregory e Eaves, 1977; 1978). Em nosso estudo, foi

observada somente a formação BFU-Es nos ensaios clonogênicos em metilcelulose, demonstrando a ocorrência de eritropoese primitiva somente. No entanto, estudos mais detalhados, tal como a determinação das globinas presentes nos eritrócitos originados, precisam ser realizados para melhor esclarecer este ponto.

Outra citocina comumente empregada na diferenciação hematopoética, é a IL-3. Um fator de crescimento hematopoético que atua no crescimento, proliferação e diferenciação de todas as linhagens hematopoéticas, agindo principalmente sobre as CPHs mais primitivas (Leary et al., 1987). Quando utilizado como suplemento em meio semi-sólido de diferenciação hematopoética, IL-3 promove o crescimento de CFU-GEMM, CFU-GM, CFU-G, CFU-M, CFU-MK, CFU-Eo e CFU-B, e quando em combinação com EPO, promove também o desenvolvimento de BFU-E e CFU-E (Koike, Ogawa *et al.*, 1987; Leary, Yang *et al.*, 1987). Adicionalmente, foi demonstrado que IL-3 atua em sinergismo com outras citocinas como SCF, IL-1, IL-6, IL-11 e G-CSF induzindo a saída das CTHs do estado de quiescência e o seu crescimento (Leary, Ikebuchi *et al.*, 1988; Leary, Hirai *et al.*, 1989; Huang, Chen *et al.*, 1999).

O G-CSF, estimula o crescimento das CPHs quando combinada com IL-3, atuando sinergicamente e promovendo a proliferação e migração das CPHs e células endoteliais (Nicola, Metcalf *et al.*, 1983). Este fator também exerce um papel central na ativação da resposta imune, crescimento, diferenciação e sobrevivência dos neutrófilos e de seus precursores (Nicola, 1987b; a; Demetri e Griffin, 1991). Entretanto, apesar da combinação de G-CSF e IL-3 parecer ser fundamental para o crescimento das células mielóides granulocíticas progenitoras nos estágios iniciais, somente G-CSF parece ser requerido para a maturação final dos granulócitos neutrófilos (Nicola, Metcalf *et al.*, 1983; Hammond, Csiba *et al.*, 1991). Tendo em vista os efeitos relacionados às suas funções, o uso do G-CSF em associação ao SCF em nosso estudo, pode ter contribuído de maneira sinérgica para a mobilização das CTHs/CPHs do estroma para o sobrenadante, bem como para o direcionamento da diferenciação em células progenitoras mielóides e células granulocíticas maduras.

O FLT3L, embora tenha sido demonstrado que isoladamente exerce pouca atividade sobre as CTHs, quando combinado a outros fatores como SCF, IL-3 e GM-CSF, essa citocina passa a apresentar efeitos sinérgicos no desenvolvimento e maturação das CTHs, atuando principalmente no direcionamento da diferenciação mielóide, estimulando a proliferação e inibindo a apoptose de CPHs CD133⁺/CD34⁺ (Lyman, James *et al.*, 1993; Sigurjonsson,

Gudmundsson *et al.*, 2002; Vavrova, Vokurkova *et al.*, 2002). Em nosso estudo, o FLT3L, devido à sua propriedade anti-apoptótica, pode ter colaborado para com a manutenção e proliferação das CTHs/CPHs, o que promoveu a geração de células linhagens específicas mais diferenciadas.

Por último, o IGF-I, um polipeptídeo de cadeia simples membro de uma família de dois peptídeos altamente homólogos (IGF-I e II) é requerido por diversos tipos celulares, incluindo as células hematopoéticas, para sua proliferação e diferenciação, sendo que tanto IGF-I quanto IGF-II exibem importantes funções durante o desenvolvimento pré-natal. No entanto, somente IGF-I parece ser essencial para o crescimento e desenvolvimento pós-natal. Foi demonstrado que as células hematopoéticas progenitoras e maduras produzem IGF-I e expressam receptores para esse peptídeo em sua superfície, recebendo a sua influência, isoladamente ou em sinergismo com outros fatores de crescimento hematopoéticos (Merchav, 1998).

Em conjunto, os dados obtidos em nosso estudo de obtenção de CTHs/CPHs e células hematopoéticas maduras a partir de CTEhs, corroboram os estudos anteriores que caracterizaram o papel dessas citocinas na diferenciação hematopoética. No entanto, por possuírem funções sinérgicas e, muitas vezes, redundantes, possivelmente nem todos estes fatores em conjunto são necessários para a produção de CTHs e de suas progênes neste sistema aqui descrito, carecendo ainda de maiores estudos para determinar quais destes fatores são realmente essenciais para a diferenciação. No entanto, apesar da possibilidade de ainda poder ser refinada, esta metodologia favoreceu a obtenção de células progenitoras hematopoéticas multilinhagens e células hematopoéticas maduras, servindo como um modelo para o estudo da hematopoese e para posterior obtenção de células hematopoéticas linhagem-específicas.

Durante o processo de diferenciação, CTHs emergiram em íntima relação com células com características mesenquimais/endoteliais. Estudos em humanos e em modelos murinos (Oberlin, El Hafny *et al.*, 2010), e utilizando CTEhs (Lu, Feng, Caballero *et al.*, 2007; Lu, Feng *et al.*, 2008; Feng, Lu *et al.*, 2010), têm postulado que as CTHs surgem a partir de uma célula precursora hematoendotelial comum, denominado hemangioblasto. Alguns trabalhos demonstram que, em sistemas de cultivo *in vitro*, os hemangioblastos crescem formando agrupamentos de células arredondadas, conhecidos como colônias de células blásticas (Wang *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2007). Dessa forma, essas células precursoras dariam origem a

duas linhagens de células simultaneamente, ao passo que se diferenciariam em células endoteliais e hematopoéticas.

Outros estudos têm relatado que as células hematopoéticas surgiriam a partir de células endoteliais primitivas que se organizam na forma de capilares, conhecidos como endotélio hemogênico (Wang *et al.*, 2004; Zambidis *et al.*, 2005; Lancrin *et al.*, 2009; Ferreras *et al.*, 2011). Os resultados das observações estruturais e morfológicas da diferenciação das CTEhs pelo método aqui descrito, demonstraram que CTHs com potencial de originar progênes de CPHs *in vitro* podem surgir por três mecanismos principais, tais como o já relatado endotélio hemogênico; a partir das colônias blásticas; e a partir de células endoteliais/mesenquimais-like que perdem gradativamente suas propriedades de aderência e diferenciam-se gradualmente em células mais esféricas contendo um leve protuberância citoplasmática e que crescem formando colônias de células arredondadas. Todavia, se essas células endoteliais/mesenquimais-like transformam-se ou dividem-se originando células hematopoéticas, ainda não está claro. Contudo, este último mecanismo, parece ser o principal contribuinte para com a formação do *pool* de CTHs/CPHs durante o processo de diferenciação. No entanto, o sistema e as observações descritos, ainda carecem de estudos mais detalhados acerca das verdadeiras origens das CTHs, bem como dos mecanismos celulares e moleculares que determinam o seu surgimento.

Adicionalmente, nosso estudo mostrou uma maior eficiência na geração de populações enriquecidas de células progenitoras hematopoéticas CD45⁺ (aproximadamente 70% em média) com intenso potencial clonogênico, se comparados a alguns estudos anteriormente publicados. Kaufman *et al.* (2001), utilizando células estromais S17 da medula óssea murina ou células C166 do saco vitelino irradiadas, descreveram um protocolo de diferenciação no qual eles co-cultivaram CTEhs com as células estromais descritas, durante 17 dias em meio suplementado com SFB sem citocinas e sem fatores de crescimento hematopoéticos exógenos, e foram capazes de produzir CTHs caracterizadas pela expressão do antígeno CD34 (embora com baixa eficiência pois representavam somente 1-2% do total de células) e pela ausência na expressão do antígeno de superfície CD45. Quando analisada a população de células CD34⁺, aproximadamente 50% das células co-expressavam o antígeno CD31, e quando cultivadas em meio semi-sólido por 14 dias, essa população de células purificada foi capaz de produzir colônias mielóides, eritróides e megacariocíticas características.

Com relação à obtenção de células CD34⁺ pelo método que descrevemos, estas foram geradas em pequenas quantidades com uma eficiência próxima a 5% ($5,33 \pm 1,15\%$) durante

todo o período de diferenciação, similar à porcentagem de células CD34⁺ encontradas no *pool* de células mononucleares isoladas da medula óssea de humanos adultos, que tem sido relatado na literatura como sendo entre 1-5% (Terstappen *et al.*, 1991; Bender *et al.*, 1991; Baur *et al.*, 2000; Torlakovic *et al.*, 2002). Não obstante, diversos estudos versando sobre diferenciação hematopoética a partir de CTEhs têm focado principalmente no isolamento de células CD34⁺ e verificação do seu potencial clonogênico (Kaufman *et al.*, 2001; Vodyanik *et al.*, 2005; Vodyanik *et al.*, 2006).

Vodyanik e cols. (2005) demonstraram que a linhagem de célula estromal murina OP9 induz de forma mais eficiente a diferenciação de células hematopoéticas CD34⁺ a partir de CTEhs, quando comparadas às células S17 e C166 utilizadas nos estudos de Kaufman *et al.* (2001) (1-2% de células CD34⁺), visto que o grupo do Vodyanik e cols. obtiveram uma porcentagem de 15-20% de células CD34⁺, quantidade bem superior ao encontrado também pelo nosso trabalho e à proporção de menos de 5% descrita como presente na medula óssea humana adulta (Terstappen *et al.*, 1991; Bender *et al.*, 1991; Baur *et al.*, 2000; Torlakovic *et al.*, 2002), demonstrando a forte influência do sistema descrito por Vodyanik e cols. sobre a produção de células CD34⁺.

Foi observado por este grupo que as células CD34⁺ surgiam um dia após o aparecimento de células CD31⁺, que ocorreu por volta do 3º dia, sendo que o maior pico de população de células CD34⁺ e CD31⁺ foi observado no 7º dia de co-cultivo das CTEhs com as células OP9 (12-14% do total de células), momento no qual começaram a emergir células CD45⁺. Neste ponto da diferenciação, 88,5% ($\pm$ 3,5%) das células CD34⁺ co-expressavam CD31, além dos marcadores CD90 (Thy-1), CD117 (c-kit), CD133 e CD164, mas não expressavam CD38, um marcador de linhagem hematopoética diferenciada.

Todavia, grandes são as controvérsias acerca do marcador CD34. Estudos têm demonstrado que CTHs/CPHs com potencial clonogênico não são exclusivamente populações de células CD34⁺ (Osawa *et al.*, 1996; Bhatia *et al.*, 1998; Zanjani *et al.*, 1998). Como demonstrado em nosso estudo, populações mistas ricas em células que não expressam este antígeno também possuem propriedades de CTHs/CPHs. Assim, apesar da pequena quantidade de células CD34⁺, foram obtidas grandes populações de células positivas o antígeno CD45, que coexpressavam outros antígenos hematopoéticos como CD43, CD31, CD71, CD11b, CD90, CD38, e diversos outros antígenos das linhagens granulocítica (CD15 e CD16), monocítica (CD14) e eritróide (235a).

Estudos posteriores realizados Vodyanik *et al.* (2006), revelaram um novo marcador na identificação de CPHs primitivas, o antígeno de superfície CD43. Eles observaram que, segundo o modelo utilizado, células progenitoras CD43⁺ poderiam ser identificadas durante o desenvolvimento hematopoético a partir de CTEhs anteriormente à emergência do marcador CD45. Células CD34⁺CD43⁺ foram caracterizadas como progenitoras hematopoéticas, enquanto células com fenótipo CD34⁺CD43⁻ apresentaram potencial endotelial e mesenquimal. Eles relataram que células hematopoéticas adquirem gradual e sucessivamente a expressão dos antígenos CD34, CD43 e CD45, ao passo que perdem a expressão de marcadores endoteliais Ve-Caderina (CD144) e KDR (Flk-1 ou VEGF-R), e passam a expressar genes relacionados ao potencial linfohematopoético. Em contrapartida, esta correlação entre o aparecimento de tais marcadores e o surgimento das células hematopoéticas não foi evidenciado em nosso estudo. Em nosso sistema, a porcentagem de células CD34⁺ permaneceu praticamente constante durante todo o processo de diferenciação, e o surgimento do marcador CD43 esteve diretamente associado à presença do marcador CD45. Ambos aumentaram simultaneamente e foram detectados como co-expressos nas células hematopoéticas.

Outros estudos utilizando o sistema de corpos embrióides demonstraram que a diferenciação das CTEhs em placas de baixa aderência e em meio contendo SCF, FLT3L, IL-3, IL-6, G-CSF e BMP4 também induz a hematopoese. Foi observado que no 15º dia de diferenciação, aproximadamente 15% das células derivadas dos corpos embrióides expressavam o marcador CD45, e possuíam propriedades de progenitores hematopoéticos multilinhagens e potencial de formação de colônias hematopoéticas *in vitro*. No 22º dia, mais de 90% das células eram CD45⁺ e apresentavam o mesmo potencial hematopoético detectado no 15º dia. Todavia, células com potencial de formação de colônias hematopoéticas não foram identificáveis antes do 10º dia de diferenciação, as quais começaram a surgir de forma gradual e exponencial somente a partir do 11º dia (Chadwick, Wang *et al.*, 2003; Zhan, Dravid *et al.*, 2004). De maneira semelhante ao nosso estudo, ficou demonstrado que células hematopoéticas CD45⁺ obtidas da diferenciação de CTEhs também apresentam grande capacidade clonogênica *in vitro* com potencial hematopoético multilinhagem.

Semelhante aos estudos de Chadwick *et al.* (2003), Zhan *et al.* (2004) diferenciaram CTEhs através de EBs por 10-20 dias e após, plaquearam essas estruturas em placas comuns para aderência e cultivaram-nas em meio KO-DMEM (*Knock-out Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com SFB, SCF, FLT3L, TPO, IL-3, IL-4 e G-CSF. Através desta

metodologia, os autores demonstraram o surgimento de células hematopoéticas 7 a 10 dias após o segundo replaqueamento, o que corresponde a 20-30 dias de diferenciação e ao período no qual CPHs puderam ser identificadas crescendo em suspensão pelo nosso método. Segundo este estudo, as células originadas eram, majoritariamente, CD45⁺, que passaram a ser liberadas no meio de cultura por um período de 6 a 7 semanas dando origem a progenitores eritróides e mielóides, dos quais 25% expressavam MHC-II; 37% CD2; 20% CD14; 15% CD16; além de populações de células expressando outros antígenos: 3% CD34⁺; 10% PECAM-1⁺; 15% CD40⁺; e, 69% CD33⁺; embora os autores não tenham identificado a co-expressão desses marcadores por populações específicas de células.

Embora tenham sido utilizados protocolos distintos para a geração de células progenitoras hematopoéticas, mas empregando um conjunto de fatores de crescimento semelhante em concentrações distintas, associado ao meio de diferenciação, nossos resultados mostraram resultados similares aos obtidos por Chadwick e cols. (2003) e Zhan e cols. (2004), no que se refere à quantidade de células CD45⁺ obtidas e no período de manutenção dessas células em cultura. Contudo, sistemas de diferenciação envolvendo a formação de corpos embrióides são menos controláveis e apresentam grandes variações conforme já descrito na literatura (Doetschman *et al.*, 1985; Wiles *et al.*, 1991; Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000). Em nosso protocolo, por se tratar de um sistema “aberto”, pois as colônias crescem aderidas a uma camada de células alimentadoras, os eventos da diferenciação são mais facilmente observáveis e a acessibilidade às células hematopoéticas torna-se mais simples, uma vez que as CPHs podem ser facilmente isoladas a partir do sobrenadante das culturas e não há a necessidade da formação de corpos embrióides por longos períodos (maior que 22 dias).

Os protocolos de diferenciação hematopoética de CTEhs descritos até o momento geraram números variáveis e populações heterogêneas de células. Os resultados discrepantes obtidos por diferentes grupos de pesquisa na geração de células hematopoéticas a partir de CTEhs tem sido atribuído aos seguintes fatores: diferenças intrínsecas relativas às próprias linhagens de CTEhs; grau de diferenciação espontânea e passagem das CTEhs; diferenças nas metodologias empregadas na manutenção e expansão das CTEhs; diferenças nos protocolos de diferenciação; e, diversas outras condições variáveis como fonte, viabilidade, concentrações e estabilidade dos fatores de crescimento e reagentes utilizados nas diferenciações (Kaufman, Hanson *et al.*, 2001; Chadwick, Wang *et al.*, 2003; Cerdan, Rouleau *et al.*, 2004; Cowan, Klimanskaya *et al.*, 2004; Park, Lee *et al.*, 2004; Vodyanik, Bork *et al.*, 2005).

O sistema de diferenciação que descrevemos neste trabalho, apesar de ter sido empregada a mesma metodologia para a realização das replicatas, também exibiu grandes variações quanto à diferenciação das CTEhs e à produção de CPHs, o que pode ser devido a variações na qualidade e viabilidade dos reagentes utilizados, à qualidade das MEFs e a propriedades intrínsecas das CTEhs utilizadas nos experimentos.

A qualidade das MEFs produzidas *in house* demonstrou ser primordial para que as diferenciações fossem realizadas com sucesso. A utilização de MEFs em 3ª passagem para eliminar contaminações com tipos celulares murinos diversos, as suas características morfológicas e a concentração de células utilizadas como estroma para a diferenciação das CTEhs são fatores cruciais para a eficiente obtenção. MEFs em 3ª passagem e com características morfológicas de células fibroblastóides, mostraram-se mais adequadas para os ensaios de diferenciação bem como para a manutenção das CTEhs durante a sua expansão. Algumas vezes, as MEFs passaram a adquirir uma morfologia mais espalhada e apresentaram maior dificuldade para seu cultivo e expansão (dados não mostrados). Neste caso, essas células não foram utilizadas nem para a expansão nem para a diferenciação das CTEhs. Para a realização das diferenciações foram utilizadas MEFs inativadas com uma confluência de aproximadamente 80-90%. O excesso de MEF pareceu prejudicar o crescimento e diferenciação das CTEhs.

Adicionalmente, importantes alterações cariotípicas nas CTEhs empregadas nos ensaios de diferenciação e das CPHs delas originadas foram observadas em nosso estudo. Tem sido relatado na literatura que o cultivo *in vitro* contínuo e prolongado das CTEhs (Cowan *et al.*, 2004; Draper *et al.*, 2004; Inzunza *et al.*, 2004; Rosler *et al.*, 2004; Mitalipova *et al.*, 2005; Maitra *et al.*, 2005; Amps *et al.*, 2011), assim como o uso de agentes crioprotetores genotóxicos como o dimetilsulfóxido (DMSO) (Li, 2002; Iwatani *et al.*, 2006) para a criopreservação dessas células, levam ao surgimento de alterações cromossômicas nas mesmas. As anormalidades cromossômicas mais descritas em CTEhs são a trissomia do cromossomo 12 (Cowan *et al.*, 2004; Draper *et al.*, 2004; Mitalipova *et al.*, 2005), alterações no cromossomo 17 (Draper *et al.*, 2004; Maitra *et al.*, 2005) e no cromossomo X (Inzunza *et al.*, 2004; Mitalipova *et al.*, 2005), e a trissomia do cromossomo 20 (Rosler *et al.*, 2004; Amps *et al.*, 2011). Destes relatados, somente alterações numéricas no cromossomo 12 foram observados em nosso estudo, no entanto, foram verificadas alterações numéricas adicionais envolvendo os cromossomos 6, 7, 8 e Y. Embora os estudos descritos na literatura tenham dado grande ênfase à correlação entre alterações cromossômicas e a manutenção do estado

pluripotente das CTEhs (Catalina *et al.*, 2008; Amps *et al.*, 2011), a influência das alterações cromossômicas sobre as diferenciações em células específicas, em especial as células hematopoéticas, ainda precisam ser determinadas. Muito embora, acreditamos que as alterações cromossômicas relatadas nos ensaios de diferenciação hematopoética do presente trabalho, tenham exercido importante influência no sucesso da diferenciação, e análises envolvendo metodologias mais acuradas para melhor avaliação de alterações estruturas sejam necessárias.

Os resultados obtidos pelas análises para caracterização imunofenotípica, morfológica e funcional das CPHs, conduziram às análises de expressão gênica dessas células para uma caracterização mais acurada dessas células. Os resultados das análises de expressão gênica revelaram que as CPHs obtidas a partir de CTEhs expressam altos níveis de genes relacionados com a hematopoese. A hiperexpressão relativa da ordem de 1.000.000 vezes do gene *CD45* foi observada nas populações de CPHs durante os períodos analisados. Este gene codifica uma proteína tirosina fosfatase transmembrana conhecida como PTPRC (CD45), a qual tem sido descrita como expressa na superfície de leucócitos (Nandedkar *et al.*, 1998). As funções dessa molécula na regulação das CPHs ainda é pouco compreendida. No entanto, foi observado que CD45 exerce importante influência sobre a sua mobilidade e retenção ao estroma medular (Shivtiel *et al.*, 2008).

O gene *CD31*, também encontrado como superexpresso nas populações de CPHs em nosso estudo, codifica uma proteína tirosina imunoreceptora de superfície PECAM1 (CD31), que é expressa em células do endotélio vascular (Muller *et al.*, 1989; Albelda *et al.*, 1990) e, principalmente, na superfície das células endoteliais (Newman, 1994). Não obstante, foi demonstrado que PECAM1 também é expresso por células hematopoéticas, tais como plaquetas, monócitos e neutrófilos (Ohto *et al.*, 1985; Newman *et al.*, 1992), bem como em populações de células T e B-naïve (Torimoto *et al.*, 1992; Tanaka *et al.*, 1992). Estudos focando sobre a expressão de PECAM1 durante o desenvolvimento das células hematopoéticas revelaram que esta molécula de adesão pode ser detectada em CPHs presentes na MO e no sangue periférico mobilizado (Turner *et al.*, 1995; Chan *et al.*, 2001).

Em conjuntos, os resultados das análises da expressão de ambos os genes *CD45* e *CD31*, corroboram os resultados obtidos pelas análises de imunofenotipagem por citometria de fluxo, que demonstraram uma grande quantidade de CPHs positivas para os antígenos de superfície por estes genes produzidos, sendo o 31º dia da diferenciação o período no qual foi

observada uma maior proporção de células positivas para estes marcadores e uma maior expressão relativa para estes genes.

A expressão do gene *runx1*, mostrou-se também *up*-regulada em mais de 600 vezes em três dos quatro períodos da diferenciação analisados. *Runx1* é bem conhecido na literatura como um importante fator na hematopoese. Estudos demonstraram que este gene exibe papel fundamental na biologia das CTHs durante o desenvolvimento murino (Okuda *et al.*, 2006; Yokomizo *et al.*, 2001; Yokomizo *et al.*, 2008), e parece atuar de forma direta sobre o controle do ciclo celular nas CTHs. Motoda *et al.* (2007), demonstraram que CTHs de camundongos *runx1-knockout* apresentaram um aumento na capacidade de auto-renovação e uma maior resistência à apoptose.

Dos três outros genes avaliados que tiveram sua expressão aumentada em níveis intermediários estão o *tal1*, *lmo2* e *prom1*. *Tal1* tem sido descrito como um regulador da hematopoese primitiva e definitiva durante o desenvolvimento murino, visto que camundongos *tal1-knockout* demonstraram um prejuízo na hematopoese primitiva que ocorre no saco vitelino resultando na morte dos embriões (Robb *et al.*, 1995; Shivdasani *et al.*, 1995). Outros estudos que geraram quimeras através da introdução de CTEs *scl*^{-/-} em blastocistos de camundongos normais demonstraram que tanto a hematopoese primitiva quanto a definitiva eram dependentes deste gene (Robb *et al.*, 1996; Porcher *et al.*, 1996). Em adição, foi demonstrado que o *scl* é requerido para a diferenciação das CTHs em eritrócitos e megacariócitos (Mikkola *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2003; Curtis *et al.*, 2004), para a proteção das CTHs contra a apoptose e para a ativação da sua proliferação, além de estar relacionado com a manutenção de CTHs *long term* (Condorelli *et al.*, 1997; Mikkola *et al.*, 2003; Ravet *et al.*, 2004).

As funções do gene *lmo2* têm sido descritas em camundongos *knockout* para este gene (Warren *et al.*, 1994), *Xenopus* (Mead *et al.*, 2001) e *Zebrafish* (Gering *et al.*, 2003). Foi observado que camundongos *lmo2* mutantes (Warren *et al.*, 1994), apresentaram falhas na eritropoese que ocorre no saco vitelino e apresentam letalidade embrionária no estágio E10.5, demonstrando um papel crucial para o *lmo2* na eritropoese. Em embriões de *Xenopus* (Mead *et al.*, 2001) e *Zebrafish* (Gering *et al.*, 2003), foi demonstrado que a proteína LMO2 também possui importante papel na eritropoese formando complexos proteicos com TAL1 e GATA1. Outro estudo com camundongos quiméricos verificou que células *lmo2*^{-/-} não contribuem para o desenvolvimento do sistema hematopoético, ao passo que quando tiveram sua expressão restaurada por meio de um vetor que expressava *lmo2*, essas células foram capazes de gerar

progênes hematopoéticas, demonstrando a importância do *lmo2* também no desenvolvimento inicial da hematopoese (Warren *et al.*, 1994).

O gene *prom1*, por sua vez, codifica uma proteína de membrana denominada CD133 (Corbeil *et al.*, 2001). E, a expressão do epítipo AC133, que é uma porção da molécula de CD133, tem sido relatada como presente em CTHs primitivas com capacidade de reconstituição hematopoética *long term* maior que CTHs CD34⁺ (Yin *et al.*, 1997). No entanto, foi observado que na MO de camundongos o gene *prom1* é expresso em aproximadamente 36% das células CD34⁺.

Estes estudos corroboram os resultados para a expressão desses genes nas populações de células analisadas, e fortalecem os relatos da importância dos mesmos tanto na hematopoese fisiológica em modelos *in vivo* quanto na hematopoese induzida *in vitro* a partir de CTEhs.

A expressão do gene *CD34* codifica uma molécula de adesão que recebe seu nome, CD34 ou sialomucina, que tem sido descrita como um ótimo marcador para CTHs (Terstappen *et al.*, 1991; Bender *et al.*, 1991). Esse antígeno é expresso em 1-5% do total de células mononucleares da MO, em subpopulações de CTHs e CPHs pouco diferenciadas (Terstappen *et al.*, 1991; Bender *et al.*, 1991; Baur *et al.*, 2000; Torlakovic *et al.*, 2002), as quais demonstraram capacidade de diferenciação hematopoética multilinhagem. E, embora estudos tenham demonstrado que CTH humanas CD34⁻ também são capazes de promover reconstituição hematopoética em camundongos NOD/SCID e em ovelhas quiméricas (Terstappen *et al.*, 1991; Bender *et al.*, 1991; Baur *et al.*, 2000; Torlakovic *et al.*, 2002), e nós não tenhamos observado grandes populações de células positivas para este marcador, nossos resultados demonstram que as CPHs expressam níveis moderados do RNAm que codifica essa proteína, se comparados aos demais genes citados anteriormente, corroborando as análises imunofenotípicas que demonstraram que as populações de células CD34⁺ obtidas neste trabalho são realmente menores que as populações de células positivas para CD45 e CD31.

Com relação ao gene *notch1*, este foi relatado como parte fundamental para a geração das CTHs a partir do endotélio hemogênico encontrado no saco vitelino de camundongos durante o desenvolvimento, como demonstrado por Kumano *et al.* (2003). Foi demonstrado também em modelos murinos a importância da expressão de *notch1* nos processos de auto-renovação e diferenciação das CTHs (Stier *et al.*, 2002). Os estudos relatados justificam a abundância de *notch1* em níveis baixos nas amostras analisadas em nosso trabalho, uma vez

que essas amostras representaram populações de CPHs já em estágio de expansão e proliferação, em período pós-surgimento das CTHs e do endotélio hemogênico (dias 19, 27, 31 e 40 de diferenciação), como demonstrado em nossos resultados de caracterização das CPHs presentes no sobrenadante do meio de diferenciação.

Os produtos proteicos dos genes *kdr* e *kit* têm sido encontrados na literatura como expressos em CTHs primitivas. O *kdr* codifica um receptor de tirosina quinase conhecido como VEGFR2 (KDR, VEGFR ou FLK1) (Magnusson *et al.*, 2004) e está implicado na hematoangiogênese embrionária em murinos e humanos (Shalaby *et al.*, 1997; Risau e Flamme, 1997). O gene *kit*, por sua vez, codifica uma proteína de superfície receptora de SCF conhecida como SCFR (c-kit ou CD117) (Ikuta e Weissman, 1992). Estudos revelaram que esta proteína é expressa em CTHs em estado quiescente presente na MO (Ikuta e Weissman, 1992) e no fígado fetal (Bradford *et al.*, 1997; Cheshier *et al.*, 1999; Nygren *et al.*, 2006), e ativam as CTHs após a ligação do c-kit ligante desencadeando a sua proliferação (Keller *et al.*, 1995; Li e Johnson, 1994; Lyman e Jacobsen, 1998). Estes achados estão de acordo com a *down*-regulação na abundância de RNAm encontrado para estes genes nas amostras analisadas em nosso trabalho, o que indica o estágio mais avançado da diferenciação das CTHs. Como demonstrado em nossos resultados, CTEhs indiferenciadas apresentam expressão moderada de KDR, o que corrobora a *down*-regulation observada nos resultados.

De modo similar ao observado nas análises de expressão gênica para os genes *kdr* e *kit*, não foi observada expressão do gene *sox2*, cuja expressão tem sido demonstrada como essencial para a manutenção do estado pluripotente das CTEhs (Thomson *et al.*, 1998), nas populações de CPHs, indicando uma *down*-regulação na expressão desse gene após a diferenciação das CTEhs. A ausência na expressão desse gene não corrobora os resultados da imunofenotipagem das CPHs derivadas de CTEhs por citometria de fluxo, pois foi verificado uma elevada expressão da proteína nas células hematopoéticas. No entanto, uma explicação plausível para este fenômeno pode ser que, apesar de cessada a expressão do gene as proteínas que já estavam presentes na superfície das CTEhs permaneceram mesmo após estas serem diferenciadas, sendo, portanto, detectadas pela metodologia de citometria de fluxo.

Em conclusão, nosso estudo permitiu o estabelecimento de um método para geração de CPHs e células hematopoéticas maduras a partir da diferenciação de CTEhs, e corrobora com os estudos recentes de que provavelmente as células hematopoéticas apresentam duas origens distintas: a partir do endotélio hemogênico e a partir de células com potencial hematoendotelial que surgem de modo independente da formação do endotélio hemogênico.

As caracterizações imunofenotípicas, morfológicas, de expressão gênica, e de potencial clonogênico das populações de células hematopoéticas geradas permitiu verificar que estas eram enriquecidas em CPHs positivas para o marcador CD45, coexpressavam diversos outros antígenos de superfície característicos das células do sistema hematopoético, e possuíam grande potencial clonogênico *in vitro*.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

As células-tronco hematopoéticas podem surgir por dois mecanismos distintos durante a diferenciação das CTEhs: a partir de estruturas vasculares conhecidas como endotélio hemogênico, e a partir de células mesenquimais/endoteliais-*like* com propriedades hemangioblásticas capazes de produzirem células hematopoéticas.

As células progenitoras hematopoéticas obtidas da diferenciação das CTEhs neste trabalho, foram caracterizadas como células CD45⁺ que coexpressavam diversos outros marcadores *pan*-hematopoéticos tais como CD43, CD31, CD71 e CD38. Adicionalmente, células progenitoras hematopoéticas mais diferenciadas foram caracterizadas pela sua positividade para marcadores específicos da linhagem mielóide granulocítica (CD15 e CD16), monocitária (CD14), eritróide (CD71 e CD235a) e linfóide (CD3, CD4, CD8, CD19 e CD20).

As populações mistas enriquecidas em células progenitoras hematopoéticas CD45⁺ apresentaram grande potencial clonogênico e capacidade de formação de todas as linhagens hematopoéticas *in vitro* quando cultivadas em metilcelulose, evidenciando a presença de células hematopoéticas com natureza primitiva. Em adição, mesmo sendo originada de células pluripotentes, as populações de células progenitoras hematopoéticas não apresentaram potencial teratogênico.

Células hematopoéticas mais progenitoras e linhagem-comprometidas, ambas puderam ser caracterizadas através de sua morfologia típica relacionada à primitividade das células progenitoras e seu estado menos diferenciado, e às características próprias das linhagens dos eritrócitos, granulócitos neutrófilos, monócitos, eosinófilos, basófilos e megacariócitos em menor proporção. No entanto, a presença de células da linhagem linfóide não foi morfológicamente distinguida.

Ficou demonstrado também que células-tronco embrionárias humanas são cromossomicamente instáveis, e apresentaram alterações numéricas no seu cariótipo. Contudo, ressalta-se a necessidade de estudos citogenéticos mais detalhados para investigar a frequência dessas alterações e outras alterações cromossômicas estruturais, e qual a influência destas na manutenção das células embrionárias em estado indiferenciado e nos ensaios de diferenciação.

Finalmente, este estudo demonstrou um método próprio de diferenciação hematopoética, fundamentado nos estudos prévios de diferenciação das células-tronco embrionárias humanas realizados por outros grupos, e contribui para o entendimento do

desenvolvimento hematopoético e de novas tecnologias visando à obtenção de células hematopoéticas linhagem-específicas aplicáveis à medicina transfusional.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albelda, S. M., P. D. Oliver, *et al.* (1990). EndoCAM: a novel endothelial cell-cell adhesion molecule. J Cell Biol **110**(4): 1227-37.

Alexander, W. S. Cytokines in hematopoiesis. Int Rev Immunol, v.16, n.5-6, p.651-82. 1998.

Alvarez-Silva, M., P. Belo-Diabangouaya, *et al.* Mouse placenta is a major hematopoietic organ. Development, v.130, n.22, Nov, p.5437-44. 2003.

Amit, M., M. K. Carpenter, *et al.* Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol, v.227, n.2, Nov 15, p.271-8. 2000.

Anderson, J. S., S. Bandi, *et al.* Derivation of normal macrophages from human embryonic stem (hES) cells for applications in HIV gene therapy. Retrovirology, v.3, p.24. 2006.

Andrews, R. G., J. W. Singer, *et al.* Precursors of colony-forming cells in humans can be distinguished from colony-forming cells by expression of the CD33 and CD34 antigens and light scatter properties. J Exp Med, v.169, n.5, May 1, p.1721-31. 1989.

_____. Human hematopoietic precursors in long-term culture: single CD34+ cells that lack detectable T cell, B cell, and myeloid cell antigens produce multiple colony-forming cells when cultured with marrow stromal cells. J Exp Med, v.172, n.1, Jul 1, p.355-8. 1990.

Baron, M. H. Embryonic origins of mammalian hematopoiesis. Exp Hematol, v.31, n.12, Dec, p.1160-9. 2003.

Baum, C. M., I. L. Weissman, *et al.* Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.7, Apr 1, p.2804-8. 1992.

Baur, A. S., C. Meuge-Moraw, *et al.* CD34/QBEND10 immunostaining in bone marrow biopsies: an additional parameter for the diagnosis and classification of myelodysplastic syndromes. Eur J Haematol, v.64, n.2, Feb, p.71-9. 2000.

Belaoussoff, M., S. M. Farrington, *et al.* Hematopoietic induction and respecification of A-P identity by visceral endoderm signaling in the mouse embryo. Development, v.125, n.24, Dec, p.5009-18. 1998.

Bender, J. G., K. L. Unverzagt, *et al.* Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. Blood, v.77, n.12, Jun 15, p.2591-6. 1991.

Bensinger, W. I., C. D. Buckner, *et al.* Transplantation of allogeneic CD34+ peripheral blood stem cells in patients with advanced hematologic malignancy. Blood, v.88, n.11, Dec 1, p.4132-8. 1996.

Beppu, H., M. Kawabata, *et al.* BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. Dev Biol, v.221, n.1, May 1, p.249-58. 2000.

Berardi, A. C., A. Wang, *et al.* Functional isolation and characterization of human hematopoietic stem cells. Science, v.267, n.5194, Jan 6, p.104-8. 1995.

Bhatia, M., D. Bonnet, *et al.* A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. Nat Med, v.4, n.9, Sep, p.1038-45. 1998.

Blazsek, I., J. Chagraoui, *et al.* Ontogenic emergence of the hematopoietic stromal unit that supports multipotential hematopoietic progenitors in mouse bone marrow. Blood, v.96, n.12, Dec 1, p.3763-71. 2000.

Bociek, R. G. e J. O. Armitage. Hematopoietic growth factors. CA Cancer J Clin, v.46, n.3, May-Jun, p.165-84. 1996.

Bowers, E., S. Tamaki, *et al.* Differing functional recovery of donor-derived immune cells after purified haploidentical and fully mismatched hematopoietic stem cell transplantation in mice. Exp Hematol, v.28, n.12, Dec, p.1481-9. 2000.

Bowles, K. M., L. Vallier, *et al.* HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. Stem Cells, v.24, n.5, May, p.1359-69. 2006.

Breier, G., U. Albrecht, *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. Development, v.114, n.2, Feb, p.521-32. 1992.

Broudy, V. C. Stem cell factor and hematopoiesis. Blood, v.90, n.4, Aug 15, p.1345-64. 1997.

Broxmeyer, H. E., S. Cooper, *et al.* Myeloid progenitor cell regulatory effects of vascular endothelial cell growth factor. Int J Hematol, v.62, n.4, Dec, p.203-15. 1995.

Cardoso, A. A., M. L. Li, *et al.* Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.18, Sep 15, p.8707-11. 1993.

Cerdan, C., A. Rouleau, *et al.* VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. Blood, v.103, n.7, Apr 1, p.2504-12. 2004.

Chadwick, K., L. Wang, *et al.* Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Blood, v.102, n.3, Aug 1, p.906-15. 2003.

Chan, K. M., S. Bonde, *et al.* Hematopoiesis and immunity of HOXB4-transduced embryonic stem cell-derived hematopoietic progenitor cells. Blood, v.111, n.6, Mar 15, p.2953-61. 2008.

Cheng, J., S. Baumhueter, *et al.* Hematopoietic defects in mice lacking the sialomucin CD34. Blood, v.87, n.2, Jan 15, p.479-90. 1996.

Cho, S. K., A. Bourdeau, *et al.* Expression and function of CD105 during the onset of hematopoiesis from Flk1(+) precursors. Blood, v.98, n.13, Dec 15, p.3635-42. 2001.

Choi, K., M. Kennedy, *et al.* A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. Development, v.125, n.4, Feb, p.725-32. 1998.

Civin, C. I., M. L. Banquerigo, *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow. Exp Hematol, v.15, n.1, Jan, p.10-7. 1987.

Conley, B. J., J. C. Young, *et al.* Derivation, propagation and differentiation of human embryonic stem cells. Int J Biochem Cell Biol, v.36, n.4, Apr, p.555-67. 2004.

Cowan, C. A., I. Klimanskaya, *et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. N Engl J Med, v.350, n.13, Mar 25, p.1353-6. 2004.

Cumano, A., F. Dieterlen-Lievre, *et al.* Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura. Cell, v.86, n.6, Sep 20, p.907-16. 1996.

Cumano, A., J. C. Ferraz, *et al.* Intraembryonic, but not yolk sac hematopoietic precursors, isolated before circulation, provide long-term multilineage reconstitution. Immunity, v.15, n.3, Sep, p.477-85. 2001.

Cumano, A., C. Furlonger, *et al.* Differentiation and characterization of B-cell precursors detected in the yolk sac and embryo body of embryos beginning at the 10- to 12-somite stage. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.14, Jul 15, p.6429-33. 1993.

Czyz, J. e A. Wobus. Embryonic stem cell differentiation: the role of extracellular factors. Differentiation, v.68, n.4-5, Oct, p.167-74. 2001.

De Jong, M. O., G. Wagemaker, *et al.* Separation of myeloid and erythroid progenitors based on expression of CD34 and c-kit. Blood, v.86, n.11, Dec 1, p.4076-85. 1995.

Demetri, G. D. e J. D. Griffin. Granulocyte colony-stimulating factor and its receptor. Blood, v.78, n.11, Dec 1, p.2791-808. 1991.

Doetschman, T. C., H. Eistetter, *et al.* The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol, v.87, Jun, p.27-45. 1985.

Donnelly, D. S., D. Zeltermann, *et al.* Functional activity of murine CD34+ and CD34- hematopoietic stem cell populations. Exp Hematol, v.27, n.5, May, p.788-96. 1999.

Draper, J. S., C. Pigott, *et al.* Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture. J Anat, v.200, n.Pt 3, Mar, p.249-58. 2002.

Evans, T. Developmental biology of hematopoiesis. Hematol Oncol Clin North Am, v.11, n.6, Dec, p.1115-47. 1997.

Falkenburg, J. H., M. A. Harrington, *et al.* Gene-expression and release of macrophage-colony stimulating factor in quiescent and proliferating fibroblasts. Effects of serum,

fibroblast growth-promoting factors, and IL-1. J Immunol, v.144, n.12, Jun 15, p.4657-62. 1990.

Feng, Q., S. J. Lu, *et al.* Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. Stem Cells, v.28, n.4, Apr, p.704-12. 2010.

Ferrara, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis. Recent Prog Horm Res, v.55, p.15-35; discussion 35-6. 2000.

Fisher, J. W., S. Koury, *et al.* Erythropoietin production by interstitial cells of hypoxic monkey kidneys. Br J Haematol, v.95, n.1, Oct, p.27-32. 1996.

Fraga, A. M., M. Sukoyan, *et al.* Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. Cell Transplant, v.20, n.3, p.431-40. 2011.

Galic, Z., S. G. Kitchen, *et al.* T lineage differentiation from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.31, Aug 1, p.11742-7. 2006.

Gaur, M., T. Kamata, *et al.* Megakaryocytes derived from human embryonic stem cells: a genetically tractable system to study megakaryocytopoiesis and integrin function. J Thromb Haemost, v.4, n.2, Feb, p.436-42. 2006.

Gekas, C., F. Dieterlen-Lievre, *et al.* The placenta is a niche for hematopoietic stem cells. Dev Cell, v.8, n.3, Mar, p.365-75. 2005.

Gekas, C., E. R. K., *et al.* Isolation and analysis of hematopoietic stem cells from the placenta. J Vis Exp, n.16. 2008.

Gerber, H. P., V. Dixit, *et al.* Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem, v.273, n.21, May 22, p.13313-6. 1998.

Godin, I., F. Dieterlen-Lievre, *et al.* Emergence of multipotent hemopoietic cells in the yolk sac and paraortic splanchnopleura in mouse embryos, beginning at 8.5 days postcoitus. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.3, Jan 31, p.773-7. 1995.

Gregory, C. J. e A. C. Eaves. Human marrow cells capable of erythropoietic differentiation in vitro: definition of three erythroid colony responses. Blood, v.49, n.6, Jun, p.855-64. 1977.

_____. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. Blood, v.51, n.3, Mar, p.527-37. 1978.

Gunji, Y., M. Nakamura, *et al.* Human primitive hematopoietic progenitor cells are more enriched in KITlow cells than in KIThigh cells. Blood, v.82, n.11, Dec 1, p.3283-9. 1993.

Hammond, W. P., E. Csiba, *et al.* Chronic neutropenia. A new canine model induced by human granulocyte colony-stimulating factor. J Clin Invest, v.87, n.2, Feb, p.704-10. 1991.

Hanamura, T., K. Motoyoshi, *et al.* Quantitation and identification of human monocytic colony-stimulating factor in human serum by enzyme-linked immunosorbent assay. Blood, v.72, n.3, Sep, p.886-92. 1988.

Hassan, H. T., W. Zeller, *et al.* Comparison between bone marrow and G-CSF-mobilized peripheral blood allografts undergoing clinical scale CD34+ cell selection. Stem Cells, v.14, n.4, Jul, p.419-29. 1996.

Healy, L., G. May, *et al.* The stem cell antigen CD34 functions as a regulator of hemopoietic cell adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.26, Dec 19, p.12240-4. 1995.

Heimfeld, S. HLA-identical stem cell transplantation: is there an optimal CD34 cell dose? Bone Marrow Transplant, v.31, n.10, May, p.839-45. 2003.

Hirata, T., P. B. Bitterman, *et al.* Expression of the transferrin receptor gene during the process of mononuclear phagocyte maturation. J Immunol, v.136, n.4, Feb 15, p.1339-45. 1986.

Horiguchi, J., M. K. Warren, *et al.* Expression of the macrophage-specific colony-stimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood, v.69, n.4, Apr, p.1259-61. 1987.

_____. Expression of the macrophage specific colony-stimulating factor (CSF-1) during human monocytic differentiation. Biochem Biophys Res Commun, v.141, n.3, Dec 30, p.924-30. 1986.

Huang, S., Z. Chen, *et al.* Correlation between IL-3 receptor expression and growth potential of human CD34+ hematopoietic cells from different tissues. Stem Cells, v.17, n.5, p.265-72. 1999.

Huang, S. e L. W. Terstappen. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. Blood, v.83, n.6, Mar 15, p.1515-26. 1994.

Hwang, W. S., Y. J. Ryu, *et al.* Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. Science, v.303, n.5664, Mar 12, p.1669-74. 2004.

Itskovitz-Eldor, J., M. Schuldiner, *et al.* Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. Mol Med, v.6, n.2, Feb, p.88-95. 2000.

Jacobson, L. O., E. Goldwasser, *et al.* Role of the kidney in erythropoiesis. Nature, v.179, n.4560, Mar 23, p.633-4. 1957.

Jelkmann, W. Control of erythropoietin gene expression and its use in medicine. Methods Enzymol, v.435, p.179-97. 2007a.

_____. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. Eur J Haematol, v.78, n.3, Mar, p.183-205. 2007b.

- Johansson, B. M. e M. V. Wiles. Evidence for involvement of activin A and bone morphogenetic protein 4 in mammalian mesoderm and hematopoietic development. Mol Cell Biol, v.15, n.1, Jan, p.141-51. 1995.
- Johnson, G. R. e M. A. Moore. Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. Nature, v.258, n.5537, Dec 25, p.726-8. 1975.
- Kaufman, D. S. Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. Blood, v.114, n.17, Oct 22, p.3513-23. 2009.
- Kaufman, D. S., E. T. Hanson, *et al.* Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.19, Sep 11, p.10716-21. 2001.
- Kaufman, D. S. e J. A. Thomson. Human ES cells--haematopoiesis and transplantation strategies. J Anat, v.200, n.Pt 3, Mar, p.243-8. 2002.
- Kawano, Y., Y. Takaue, *et al.* Partially mismatched pediatric transplants with allogeneic CD34(+) blood cells from a related donor. Blood, v.92, n.9, Nov 1, p.3123-30. 1998.
- Keller, G., M. Kennedy, *et al.* Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. Mol Cell Biol, v.13, n.1, Jan, p.473-86. 1993.
- Kennedy, M., S. L. D'souza, *et al.* Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. Blood, v.109, n.7, Apr 1, p.2679-87. 2007.
- Kennedy, M., M. Firpo, *et al.* A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive haematopoiesis. Nature, v.386, n.6624, Apr 3, p.488-93. 1997.
- Kingsley, P. D., J. Malik, *et al.* Yolk sac-derived primitive erythroblasts enucleate during mammalian embryogenesis. Blood, v.104, n.1, Jul 1, p.19-25. 2004.
- Koike, K., M. Ogawa, *et al.* Recombinant murine granulocyte-macrophage (GM) colony-stimulating factor supports formation of GM and multipotential blast cell colonies in culture: comparison with the effects of interleukin-3. J Cell Physiol, v.131, n.3, Jun, p.458-64. 1987.
- Kramer, J., C. Hegert, *et al.* Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation in vitro: activation by BMP-2 and BMP-4. Mech Dev, v.92, n.2, Apr, p.193-205. 2000.
- Krantz, S. B. Erythropoietin. Blood, v.77, n.3, Feb 1, p.419-34. 1991.
- Krause, D. S., T. Ito, *et al.* Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. Blood, v.84, n.3, Aug 1, p.691-701. 1994.
- Kyba, M., R. C. Perlingeiro, *et al.* HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. Cell, v.109, n.1, Apr 5, p.29-37. 2002.
- Labastie, M. C., F. Cortes, *et al.* Molecular identity of hematopoietic precursor cells emerging in the human embryo. Blood, v.92, n.10, Nov 15, p.3624-35. 1998.
-

Lancrin, C., P. Sroczynska, *et al.* The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. Nature, v.457, n.7231, Feb 12, p.892-5. 2009.

Lansdorp, P. M. e W. Dragowska. Long-term erythropoiesis from constant numbers of CD34+ cells in serum-free cultures initiated with highly purified progenitor cells from human bone marrow. J Exp Med, v.175, n.6, Jun 1, p.1501-9. 1992.

Lapillonne, H., L. Kobari, *et al.* Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. Haematologica, v.95, n.10, Oct, p.1651-9. 2010.

Leary, A. G., Y. Hirai, *et al.* Survival of hemopoietic progenitors in the G0 period of the cell cycle does not require early hemopoietic regulators. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.12, Jun, p.4535-8. 1989.

Leary, A. G., K. Ikebuchi, *et al.* Synergism between interleukin-6 and interleukin-3 in supporting proliferation of human hematopoietic stem cells: comparison with interleukin-1 alpha. Blood, v.71, n.6, Jun, p.1759-63. 1988.

Leary, A. G., Y. C. Yang, *et al.* Recombinant gibbon interleukin 3 supports formation of human multilineage colonies and blast cell colonies in culture: comparison with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. Blood, v.70, n.5, Nov, p.1343-8. 1987.

Lensch, M. W. e G. Q. Daley. Origins of mammalian hematopoiesis: in vivo paradigms and in vitro models. Curr Top Dev Biol, v.60, p.127-96. 2004.

Leung, D. W., G. Cachianes, *et al.* Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science, v.246, n.4935, Dec 8, p.1306-9. 1989.

Liang, D., J. R. Chang, *et al.* The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in vasculogenesis, angiogenesis, and hematopoiesis in zebrafish development. Mech Dev, v.108, n.1-2, Oct, p.29-43. 2001.

Link, H., L. Arseniev, *et al.* Transplantation of allogeneic CD34+ blood cells. Blood, v.87, n.11, Jun 1, p.4903-9. 1996.

Liu, G. H., B. Z. Barkho, *et al.* Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Nature, v.472, n.7342, Apr 14, p.221-5. 2011.

Loebel, D. A., C. M. Watson, *et al.* Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. Dev Biol, v.264, n.1, Dec 1, p.1-14. 2003.

Loken, M. R., V. O. Shah, *et al.* Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. Blood, v.69, n.1, Jan, p.255-63. 1987.

Lu, L., M. Xiao, *et al.* Enrichment, characterization, and responsiveness of single primitive CD34 human umbilical cord blood hematopoietic progenitors with high proliferative and replating potential. Blood, v.81, n.1, Jan 1, p.41-8. 1993.

Lu, S. J., Q. Feng, *et al.* Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells. Nat Methods, v.4, n.6, Jun, p.501-9. 2007.

_____. Recombinant HoxB4 fusion proteins enhance hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells Dev, v.16, n.4, Aug, p.547-59. 2007.

_____. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. Blood, v.112, n.12, Dec 1, p.4475-84. 2008.

Lu, S. J., F. Li, *et al.* CD34+CD38- hematopoietic precursors derived from human embryonic stem cells exhibit an embryonic gene expression pattern. Blood, v.103, n.11, Jun 1, p.4134-41. 2004.

Lyman, S. D., L. James, *et al.* Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells. Cell, v.75, n.6, Dec 17, p.1157-67. 1993.

Mayani, H., W. Dragowska, *et al.* Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. Blood, v.82, n.9, Nov 1, p.2664-72. 1993a.

_____. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. Blood, v.81, n.12, Jun 15, p.3252-8. 1993b.

Mcgrath, K. E. e J. Palis. Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. Exp Hematol, v.33, n.9, Sep, p.1021-8. 2005.

Medvinsky, A. L., N. L. Samoylina, *et al.* An early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. Nature, v.364, n.6432, Jul 1, p.64-7. 1993.

Mendez-Ferrer, S., D. Lucas, *et al.* Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. Nature, v.452, n.7186, Mar 27, p.442-7. 2008.

Merchav, S. The haematopoietic effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I. J Pediatr Endocrinol Metab, v.11, n.6, Nov-Dec, p.677-85. 1998.

Mikkola, H. K., C. Gekas, *et al.* Placenta as a site for hematopoietic stem cell development. Exp Hematol, v.33, n.9, Sep, p.1048-54. 2005.

Mishina, Y., A. Suzuki, *et al.* Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. Genes Dev, v.9, n.24, Dec 15, p.3027-37. 1995.

Miyagi, T., M. Takeno, *et al.* Flk1+ cells derived from mouse embryonic stem cells reconstitute hematopoiesis in vivo in SCID mice. Exp Hematol, v.30, n.12, Dec, p.1444-53. 2002.

Morel, F., A. Galy, *et al.* Equal distribution of competitive long-term repopulating stem cells in the CD34+ and CD34- fractions of Thy-1^{low}Lin-/lowSca-1+ bone marrow cells. Exp Hematol, v.26, n.5, May, p.440-8. 1998.

Morel, F., S. J. Szilvassy, *et al.* Primitive hematopoietic cells in murine bone marrow express the CD34 antigen. Blood, v.88, n.10, Nov 15, p.3774-84. 1996.

Morris, S. W., M. B. Valentine, *et al.* Reassignment of the human CSF1 gene to chromosome 1p13-p21. Blood, v.78, n.8, Oct 15, p.2013-20. 1991.

Muench, M. O., J. Cupp, *et al.* Expression of CD33, CD38, and HLA-DR on CD34+ human fetal liver progenitors with a high proliferative potential. Blood, v.83, n.11, Jun 1, p.3170-81. 1994.

Mukouyama, Y., T. Hara, *et al.* In vitro expansion of murine multipotential hematopoietic progenitors from the embryonic aorta-gonad-mesonephros region. Immunity, v.8, n.1, Jan, p.105-14. 1998.

Murray, L., B. Chen, *et al.* Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood. Blood, v.85, n.2, Jan 15, p.368-78. 1995.

Nakano, T., H. Kodama, *et al.* Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. Science, v.265, n.5175, Aug 19, p.1098-101. 1994.

Nakayama, N., I. Fang, *et al.* Natural killer and B-lymphoid potential in CD34+ cells derived from embryonic stem cells differentiated in the presence of vascular endothelial growth factor. Blood, v.91, n.7, Apr 1, p.2283-95. 1998.

Nakayama, N., J. Lee, *et al.* Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells in vitro. Blood, v.95, n.7, Apr 1, p.2275-83. 2000.

Negrin, R. S., K. Atkinson, *et al.* Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. Biol Blood Marrow Transplant, v.6, n.3, p.262-71. 2000.

Nervi, B., D. C. Link, *et al.* Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. J Cell Biochem, v.99, n.3, Oct 15, p.690-705. 2006.

Ng, E. S., L. Azzola, *et al.* The primitive streak gene Mixl1 is required for efficient haematopoiesis and BMP4-induced ventral mesoderm patterning in differentiating ES cells. Development, v.132, n.5, Mar, p.873-84. 2005.

Nicola, N. A. Granulocyte colony-stimulating factor and differentiation-induction in myeloid leukemic cells. Int J Cell Cloning, v.5, n.1, Jan, p.1-15. 1987a.

_____. Hemopoietic growth factors and their interactions with specific receptors. J Cell Physiol Suppl, v.Suppl 5, p.9-14. 1987b.

Nicola, N. A., D. Metcalf, *et al.* Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia cells. Identification as granulocyte colony-stimulating factor. J Biol Chem, v.258, n.14, Jul 25, p.9017-23. 1983.

Nishikawa, S. I., S. Nishikawa, *et al.* Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hemopoietic lineages. Development, v.125, n.9, May, p.1747-57. 1998.

Oberlin, E., B. El Hafny, *et al.* Definitive human and mouse hematopoiesis originates from the embryonic endothelium: a new class of HSCs based on VE-cadherin expression. Int J Dev Biol, v.54, n.6-7, p.1165-73. 2010.

Olweus, J., F. Lund-Johansen, *et al.* Expression of cell surface markers during differentiation of CD34+, CD38-/lo fetal and adult bone marrow cells. Immunomethods, v.5, n.3, Dec, p.179-88. 1994.

_____. CD64/Fc gamma RI is a granulo-monocytic lineage marker on CD34+ hematopoietic progenitor cells. Blood, v.85, n.9, May 1, p.2402-13. 1995.

Olweus, J., L. W. Terstappen, *et al.* Expression and function of receptors for stem cell factor and erythropoietin during lineage commitment of human hematopoietic progenitor cells. Blood, v.88, n.5, Sep 1, p.1594-607. 1996.

Orlic, D., S. Anderson, *et al.* Pluripotent hematopoietic stem cells contain high levels of mRNA for c-kit, GATA-2, p45 NF-E2, and c-myb and low levels or no mRNA for c-fms and the receptors for granulocyte colony-stimulating factor and interleukins 5 and 7. Proc Natl Acad Sci U S A, v.92, n.10, May 9, p.4601-5. 1995.

Orlic, D., R. Fischer, *et al.* Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor. Blood, v.82, n.3, Aug 1, p.762-70. 1993.

Osawa, M., K. Hanada, *et al.* Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. Science, v.273, n.5272, Jul 12, p.242-5. 1996.

Oster, W., A. Lindemann, *et al.* Regulation of gene expression of M-, G-, GM-, and multi-CSF in normal and malignant hematopoietic cells. Blood Cells, v.14, n.2-3, p.443-62. 1988.

Otersbach, K. e E. Dzierzak. The murine placenta contains hematopoietic stem cells within the vascular labyrinth region. Dev Cell, v.8, n.3, Mar, p.377-87. 2005.

Palis, J., S. Robertson, *et al.* Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. Development, v.126, n.22, Nov, p.5073-84. 1999.

Papapetrou, E. P., N. C. Zoumbos, *et al.* Genetic modification of hematopoietic stem cells with nonviral systems: past progress and future prospects. Gene Ther, v.12 Suppl 1, Oct, p.S118-30. 2005.

Papayannopoulou, T., M. Brice, *et al.* Isolation of c-kit receptor-expressing cells from bone marrow, peripheral blood, and fetal liver: functional properties and composite antigenic profile. Blood, v.78, n.6, Sep 15, p.1403-12. 1991.

Park, C., I. Afrikanova, *et al.* A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. Development, v.131, n.11, Jun, p.2749-62. 2004.

Park, I. H., R. Zhao, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature, v.451, n.7175, Jan 10, p.141-6. 2008.

Park, S. P., Y. J. Lee, *et al.* Establishment of human embryonic stem cell lines from frozen-thawed blastocysts using STO cell feeder layers. Hum Reprod, v.19, n.3, Mar, p.676-84. 2004.

Peyrard, T., L. Bardiaux, *et al.* Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. Transfus Med Rev, v.25, n.3, Jul, p.206-16. 2011.

Qiu, C., E. N. Olivier, *et al.* Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. Blood, v.111, n.4, Feb 15, p.2400-8. 2008.

Reddy, E. P., A. Korapati, *et al.* IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. Oncogene, v.19, n.21, May 15, p.2532-47. 2000.

Reems, J. A. e B. Torok-Storb. Cell cycle and functional differences between CD34+/CD38hi and CD34+/38lo human marrow cells after in vitro cytokine exposure. Blood, v.85, n.6, Mar 15, p.1480-7. 1995.

Reubinoff, B. E., M. F. Pera, *et al.* Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol, v.18, n.4, Apr, p.399-404. 2000.

Roberts, W. G. e G. E. Palade. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J Cell Sci, v.108 (Pt 6), Jun, p.2369-79. 1995.

Robin, C., K. Bollerot, *et al.* Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development. Cell Stem Cell, v.5, n.4, Oct 2, p.385-95. 2009.

Ross, D. D., A. Pollak, *et al.* Diurnal variation of circulating human myeloid progenitor cells. Exp Hematol, v.8, n.7, Aug, p.954-60. 1980.

Saltman, D. L., G. M. Dolganov, *et al.* Reassignment of the human macrophage colony stimulating factor gene to chromosome 1p13-21. Biochem Biophys Res Commun, v.182, n.3, Feb 14, p.1139-43. 1992.

Sansilvestri, P., A. A. Cardoso, *et al.* Early CD34^{high} cells can be separated into KIT^{high} cells in which transforming growth factor-beta (TGF-beta) downmodulates c-kit and KIT^{low} cells in which anti-TGF-beta upmodulates c-kit. Blood, v.86, n.5, Sep 1, p.1729-35. 1995.

Sasaki, K., Y. Nagao, *et al.* Hematopoietic microchimerism in sheep after in utero transplantation of cultured cynomolgus embryonic stem cells. Transplantation, v.79, n.1, Jan 15, p.32-7. 2005.

Schuldiner, M., O. Yanuka, *et al.* Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.21, Oct 10, p.11307-12. 2000.

Shadle, P. J., J. I. Allen, *et al.* Detection of endogenous macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) in human blood. Exp Hematol, v.17, n.2, Feb, p.154-9. 1989.

Shizuru, J. A., L. Jerabek, *et al.* Transplantation of purified hematopoietic stem cells: requirements for overcoming the barriers of allogeneic engraftment. Biol Blood Marrow Transplant, v.2, n.1, Feb, p.3-14. 1996.

Siena, S., M. Bregni, *et al.* Flow cytometry for clinical estimation of circulating hematopoietic progenitors for autologous transplantation in cancer patients. Blood, v.77, n.2, Jan 15, p.400-9. 1991.

Sigurjonsson, O. E., K. O. Gudmundsson, *et al.* Flt3/Flk-2-ligand in synergy with thrombopoietin delays megakaryocyte development and increases the numbers of megakaryocyte progenitor cells in serum-free cultures initiated with CD34⁺ cells. J Hematother Stem Cell Res, v.11, n.2, Apr, p.389-400. 2002.

Slukvin, Ii, M. A. Vodyanik, *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional dendritic cells through the myeloid pathway. J Immunol, v.176, n.5, Mar 1, p.2924-32. 2006.

Stojkovic, M., M. Lako, *et al.* Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. Reproduction, v.128, n.3, Sep, p.259-67. 2004.

Strauss, L. C., S. D. Rowley, *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. V. Characterization of My-10 antigen expression by normal lymphohematopoietic progenitor cells. Exp Hematol, v.14, n.9, Oct, p.878-86. 1986.

Suss-Toby, E., S. Gerecht-Nir, *et al.* Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. Hum Reprod, v.19, n.3, Mar, p.670-5. 2004.

Suzuki, A., A. Raya, *et al.* Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.27, Jul 5, p.10294-9. 2006.

Szilvassy, S. J., R. K. Humphries, *et al.* Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. Proc Natl Acad Sci U S A, v.87, n.22, Nov, p.8736-40. 1990.

Takahashi, K., K. Okita, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. Nat Protoc, v.2, n.12, p.3081-9. 2007.

Takahashi, K., K. Tanabe, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, v.131, n.5, Nov 30, p.861-72. 2007.

Tavian, M., L. Coulombel, *et al.* Aorta-associated CD34+ hematopoietic cells in the early human embryo. Blood, v.87, n.1, Jan 1, p.67-72. 1996.

Tavian, M., C. Robin, *et al.* The human embryo, but not its yolk sac, generates lymphomyeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. Immunity, v.15, n.3, Sep, p.487-95. 2001.

Terstappen, L. W., S. Huang, *et al.* Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. Blood, v.77, n.6, Mar 15, p.1218-27. 1991.

Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, v.282, n.5391, Nov 6, p.1145-7. 1998.

Tian, X., P. S. Woll, *et al.* Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity. Stem Cells, v.24, n.5, May, p.1370-80. 2006.

Tober, J., A. Koniski, *et al.* The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. Blood, v.109, n.4, Feb 15, p.1433-41. 2007.

Torlakovic, G., R. Langholm, *et al.* CD34/QBEND10 immunostaining in the bone marrow trephine biopsy: a study of CD34-positive mononuclear cells and megakaryocytes. Arch Pathol Lab Med, v.126, n.7, Jul, p.823-8. 2002.

Vandesompele, J., K. De Preter, *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol, v.3, n.7, Jun 18, p.RESEARCH0034. 2002.

Vavrova, J., D. Vokurkova, *et al.* Antiapoptotic cytokine IL-3 + SCF + FLT3L influence on proliferation of gamma-irradiated AC133+/CD34+ progenitor cells. Folia Biol (Praha), v.48, n.2, p.51-7. 2002.

Verma, D. S., R. Fisher, *et al.* Diurnal changes in circulating myeloid progenitor cells in man. Am J Hematol, v.9, n.2, p.185-92. 1980.

Vodyanik, M. A., J. A. Bork, *et al.* Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. Blood, v.105, n.2, Jan 15, p.617-26. 2005.

Vodyanik, M. A., J. A. Thomson, *et al.* Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. Blood, v.108, n.6, Sep 15, p.2095-105. 2006.

Wang, L., L. Li, *et al.* Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. Immunity, v.21, n.1, Jul, p.31-41. 2004.

Wang, L., P. Menendez, *et al.* Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression. J Exp Med, v.201, n.10, May 16, p.1603-14. 2005.

Watanabe, K., M. Ueno, *et al.* A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol, v.25, n.6, Jun, p.681-6. 2007.

Watt, S. M., K. Karhi, *et al.* Distribution and epitope analysis of the cell membrane glycoprotein (HPCA-1) associated with human hemopoietic progenitor cells. Leukemia, v.1, n.5, May, p.417-26. 1987.

Wiles, M. V. e B. M. Johansson. Analysis of factors controlling primary germ layer formation and early hematopoiesis using embryonic stem cell in vitro differentiation. Leukemia, v.11 Suppl 3, Apr, p.454-6. 1997.

_____. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium. Exp Cell Res, v.247, n.1, Feb 25, p.241-8. 1999.

Wiles, M. V. e G. Keller. Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. Development, v.111, n.2, Feb, p.259-67. 1991.

Winnier, G., M. Blessing, *et al.* Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. Genes Dev, v.9, n.17, Sep 1, p.2105-16. 1995.

Woll, P. S., C. H. Martin, *et al.* Human embryonic stem cell-derived NK cells acquire functional receptors and cytolytic activity. J Immunol, v.175, n.8, Oct 15, p.5095-103. 2005.

Woll, P. S., J. K. Morris, *et al.* Wnt signaling promotes hematoendothelial cell development from human embryonic stem cells. Blood, v.111, n.1, Jan 1, p.122-31. 2008.

Xu, M. J., S. Matsuoka, *et al.* Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. Blood, v.97, n.7, Apr 1, p.2016-22. 2001.

Yu, J., M. A. Vodyanik, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, v.318, n.5858, Dec 21, p.1917-20. 2007.

Zambidis, E. T., B. Peault, *et al.* Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. Blood, v.106, n.3, Aug 1, p.860-70. 2005.

Zanjani, E. D., G. Almeida-Porada, *et al.* Human bone marrow CD34- cells engraft in vivo and undergo multilineage expression that includes giving rise to CD34+ cells. Exp Hematol, v.26, n.4, Apr, p.353-60. 1998.

Zhan, X., G. Dravid, *et al.* Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells in vitro. Lancet, v.364, n.9429, Jul 10-16, p.163-71. 2004.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 08 de fevereiro de 2012

Ofício nº 419/2012
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DAS CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS EM CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOÉTICAS”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 339ª Reunião Ordinária realizada em 06/02/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Processo HCRP nº 15908/2011.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
EVERTON DE BRITO OLIVEIRA COSTA
APARECIDA MARIA FONTES
Depto. de Genética – FMRP-USP