Universidade de São Paulo (USP)
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP)
Pós-Graduação em Genética

Igor Lopes Coqueiro

**Sistematização de um método de análises quantitativas para a diferenciação
hematopoética de células-tronco embrionárias humanas *in vitro***

Ribeirão Preto
2019

Igor Lopes Coqueiro

**Sistematização de um método de análises quantitativas para a diferenciação
hematopoética de células-tronco embrionárias humanas *in vitro***

Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Genética da
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
(FMRP-USP) como parte dos pré-requisitos
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas (Genética)

Área de Concentração: Ciências Biológicas I
(Genética)

Orientador(a): Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Ribeirão Preto
2019

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

Ficha catalográfica

Coqueiro, Igor Lopes.

Sistematização de um método de análises quantitativas para a diferenciação hematopoética de células-tronco embrionárias humanas *in vitro*.

Ribeirão Preto, 2019

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) – Área de concentração: Ciências Biológicas (Genética)

Orientador(a): Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

1. Hematologia. 2. Diferenciação hematopoética. 3. Células-tronco hematopoética. 4. Células-tronco embrionárias. 5. High-content screening.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Igor Lopes Coqueiro

Sistematização de um método de análises quantitativas para a diferenciação hematopoética de células-tronco embrionárias humanas *in vitro*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP) como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Genética)

Área de Concentração: Ciências Biológicas I (Genética)

Orientador(a): Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Parecer: _____, ____/____/____

Banca examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

À minha família
Dedico

AGRADECIMENTOS

Neste momento em que encerro mais importante um ciclo da minha vida não poderia deixar de lembrar de todos aqueles que de maneira direta e indireta contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Sou grato ao Divino pelo dom maior da vida e pela luz que me emana mesmo nos momentos mais obscuros e tortuosos que eu venha a enfrentar. Agradeço pela sabedoria de fazer das minhas quedas um grande aprendizado.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci pela oportunidade de me orientar, pela generosidade em lidar com minhas limitações e dificuldades. Sem dúvidas esse período de convívio foi muito valioso para a minha formação pessoal e acadêmica.

Ao Laboratório de Citometria de Fluxo (Camila, Carmen, Natália e Patrícia), por terem cedido anticorpos que contribuíram imensamente na execução dos meus experimentos.

Ao Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID) especialmente à Natália Pellison, pela ajuda nas aquisições de imagens no equipamento de *High-content screening*.

Ao departamento de Genética, em especial à Susie Salon, por todo o suporte e esclarecimento de dúvidas que me foi dado.

À Fundação Hemocentro (FUNDHERP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), CAPES e FAEPA, obrigado pelo apoio técnico e financeiro que permitiu a execução desse trabalho.

Ao Laboratório de Terapia Celular (Sâmia, Taísa, Aline Garcia, Patrícia Tozetti), agradeço pelo convívio no período em que tive a oportunidade de estagiar ao lado de vocês, obrigado pelo carinho, pela amizade e por todas as contribuições que vocês deram à minha formação.

À Dr^a. Maristela Delgado Orellana, sou eternamente grato por ter me dado a primeira oportunidade de trabalhar em uma área que sempre foi uma grande utopia para mim. A admiração que tenho por você vai muito além do seu mérito profissional, você sem sombra de dúvidas é um grande exemplo que sigo também como pessoa. Obrigado por toda ajuda, pelo carinho e pela amizade.

Aos meus colegas de laboratório (Bruno, Helder, Sarah, Vitor, Felipe e Amanda), assim como as técnicas (Cláudia, Elizabete, Júlia, Amélia e Josiane) sou grato por terem sido muito mais do que companheiros de estrada, vocês se tornaram grandes amigos por quem desenvolvi um imenso carinho e admiração. Vocês fizeram dessa minha jornada algo leve e prazeroso mesmo com todas as turbulências.

À família que ribeirão preto me deu (Hudson, Ildercílio, Ernesto, Luiza, Simone, Gabi, Maritza, Diana, Dilo, Isabela, Dani, Jéssica e Aline Tolardo) agradeço por terem me recebido na cidade de Ribeirão Preto e na vida de vocês. Sou muito feliz por todos os momentos tão especiais que vivemos juntos.

Aos meus amigos que carregaram de toda minha vida (João Pedro, Rebeca, Robério, Alana, Emille e Luan) obrigado por fazerem parte da minha história e por estarem comigo em todos os momentos.

Agradeço aos meus familiares, meus avós Vera, Licindo, Núbia e Edson (*in memoriam*) obrigado pelo amor, pelo exemplo de bondade e dedicação. E aos meus pais José Orestes dos Santos Coqueiro e Peônia Lopes Coqueiro, e ao meu irmão José Orestes dos Santos Coqueiro Filho, a quem dedico todas as minhas pequenas porém grandiosas conquistas, obrigado pelo exercício diário desse amor incondicional que temos um pelo outro. Sem vocês certamente não conseguiria dar um passo à frente. Obrigado não me deixarem desistir das minhas escolhas, me ajudar a levantar das minhas quedas, por serem meus maiores incentivadores e por estarem ao meu lado lutando para a realização dos nossos sonhos.

À todos os demais que direta ou indiretamente contribuíram para que eu chegasse até aqui...

Muito Obrigado!

*Cultura é vida.
E é com o povo que a gente aprende a vida
e que a gente se faz realmente culto.
Jorge Amado*

RESUMO

Coqueiro, I. L. Sistematização de um método de análises quantitativas para a diferenciação hematopoética de células-tronco embrionárias humanas *in vitro*. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

As células-tronco e progenitores hematopoéticos (CTPH) são capazes de reconstituir todo o sistema sanguíneo de um indivíduo adulto e por isso apresentam um grande potencial terapêutico. Por muito tempo as células-tronco embrionárias humanas (CTEh) têm sido estudadas como fonte de CTPH *in vitro*. No entanto a transferência dessa tecnologia para a clínica ainda é um grande desafio. Parte disso se deve às limitações técnicas dos protocolos de diferenciação *in vitro* que impedem a sistematização de estudos funcionais em larga escala de genes e fatores implicados na regulação deste processo. Nesse sentido a realização de análises quantitativas de diferentes condições experimentais poderiam contribuir na compreensão dos mecanismos envolvidos no comprometimento de CTEh com a linhagem hematopoética. Para isso o presente trabalho propõe estabelecer um método de análise da diferenciação hematopoética de CTEh por um conjunto de abordagens de microscopia quantitativa conhecida como High-content screening (HCS). Utilizamos as linhagens de CTEh H1 e H9-GFP para induzir a diferenciação hematopoética em um sistema de cultivo em monocamada em microplacas de 96 poços utilizando um meio indutor quimicamente definido. Utilizamos marcadores envolvidos no processo de transição epitélio mesênquima (TEM) e marcadores hematopoéticos para a realização de ensaios de imunofluorescência que foram analisados por HCS. Em nossos ensaios vimos que a inibição seletiva da enzima GSK3 β por 24 h já causa alterações morfológicas significativas nas colônias de CTEh. As análises por HCS revelaram que até o 4º dia de diferenciação a família de fatores de transcrição Snail coordena a TEM das CTEh regulando negativamente os níveis de E-caderina ao passo que os níveis de N-caderina são aumentados. Nesse momento fomos capazes de formar um endotélio hemogênico *in vitro* de células CD34⁺ no qual emergem células progenitoras hematopoéticas CD34⁺CD43⁺ que progressivamente perdem sua assinatura endotelial à medida que se comprometem com a linhagem hematopoética até adquirir o marcador CD45 no 12º dia de diferenciação. Nossos dados sugerem que o presente método de análise consiste em um modelo operativo de grande valia para a realização de *screenings* funcionais em larga escala para o estudo dos estágios iniciais da hematopoese humana.

Palavras-chaves: Hematologia; Diferenciação hematopoética; Célula-tronco hematopoética; Células-tronco embrionárias; High-content screening.

ABSTRACT

Coqueiro, I. L. Systematizing a method of quantitative analysis for hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells in vitro. Master's thesis – Ribeirão Preto Medical School, São Paulo University, Ribeirão Preto, 2019.

Hematopoietic stem cells and progenitors (HSPC) are able to reconstitute the whole blood system of an adult recipient and therefore have great therapeutic potential. For a long time, human embryonic stem cells (hESC) have been studied as a source of HSPC in vitro. However, transferring this technology to the clinic is still a great challenge. Part of this is due to the technical limitations of in vitro differentiation protocols which prevent the systematization of large-scale functional studies of genes and factors involved in the regulation of this process. In this sense, the accomplishment of quantitative analyzes of different experimental conditions could contribute to the understanding of the mechanisms involved in the compromise of hESC with the hematopoietic lineage. For this, the present work proposes to establish a method of analysis of the hematopoietic differentiation of hESC by a set of quantitative microscopy approaches known as High-content screening (HCS). We used the H1 and H9-GFP hESC lineages to induce hematopoietic differentiation in a 96-well microplate monolayer culture system using a chemically defined inducer medium. We used markers involved in the mesenchymal-epithelial (EMT) transition process and hematopoietic markers for immunofluorescence assays that were analyzed by HCS. In our trials, we have seen that the selective inhibition of the GSK3 β enzyme for 24 h already causes significant morphological alterations in the colonies of hESC. HCS analysis revealed that up to the 4th day of differentiation the Snail transcription factor family coordinates the hESC of EMT by negatively regulating E-cadherin levels while N-cadherin levels are increased. At that time we were able to form an in vitro endogenous CD34⁺ cell in which emerged CD34 + CD43 + hematopoietic progenitor cells that progressively lose their endothelial signature as they compromise the hematopoietic lineage until they acquire the CD45 marker on the 12th day of differentiation. Our data suggest that the present method of analysis consists of an operative model of great value for the realization of large-scale functional screenings for the study of the initial stages of human hematopoiesis.

Keywords: Hematology; Hematopoietic differentiation; Hematopoietic stem cell; Embryonic stem cell; High-content screening.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Hierarquia das células-tronco hematopoéticas (CTH).** Modelo esquemático representando o comprometimento progressivo das CTH com as diferentes linhagens de células sanguíneas. Adaptado de Clément *et al.*, 2017.....20
- Figura 2. Sítios hematopoéticos embrionários.** Esquema demonstrativo do surgimento das primeiras células do sangue nos diferentes sítios anatômicos ao longo do desenvolvimento embrionário. Adaptado de Barom *et al.*, 2012.....23
- Figura 3. Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco embrionárias *in vitro*.** Modelo esquemático que representa o isolamento de CTE da massa celular interna do blastocisto, seu cultivo e diferenciação *in vitro* em diferentes tipos celulares. Adaptado de Washington, DC. National Academies Press, 2006.....25
- Figura 4. Etapas de maturação de células-tronco hematopoéticas *in vitro*.** Modelo esquemático que representa os fatores envolvidos na diferenciação hematopoética de CTE *in vitro* bem como a expressão de marcadores de superfície utilizados para identificar as diferentes etapas de maturação celular. Adaptado de Liu *et al.*, 2015.....27
- Figura 5. Modelo esquemático do protocolo de diferenciação baseado na formação de corpos embrioides.** Os corpos embrioides foram formados em placas de fundo em U com meio contendo BMP4, VEGF, FGFb, SCF, Activina A e CHIR99021. Após quatro dias de cultivo removemos o CHIR99021 e a Activina A e adicionamos IGF2 ao meio. No 8º dia, os corpos embrioides foram transferidos para placas de 96 poços de fundo chato/reto revestido com matrigel e foram estimuladas com SCF, VEGF, FLT3L, TPO, IL-6, IGF2 e FGFb.....37
- Figura 6. Modelo esquemático do ensaio de diferenciação baseado no método de plaqueamento em monocamada.** As CTE foram plaqueadas e mantidas em cultivo por quatro dias. No dia 0, início da diferenciação, o CHIR99021 foi adicionado. Após 24 horas, o meio foi substituído, e suplementado com BMP4. No dia seguinte, a troca de meio foi realizada com suplementação de BMP4 e VEGF. No 4º dia, as células foram estimuladas com um coquetel de citocinas contendo BMP4, SCF, FLT3L, IL-3, IL-6 e G-CSF.....38
- Figura 7. Segmentação celular.** Imagens representativas da segmentação celular com a delimitação no núcleo (linhas pretas) e citoplasma (linhas rosa) nas imagens adquiridas. Imagem referente à um ensaio realizado com CTE da linhagem H9-GFP.....42
- Figura 8. Descaracterização das colônias de CTE.** Fotomicrografias adquiridas por meio de microscopia eletrônica com objetiva de 20 X das culturas celulares após o tratamento com GSKi por 24h.....47
- Figura 9. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-OCT4 (vermelho) em condição de cultivo normal -mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias).** Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada tratamento. É possível notar a alta expressão de OCT4 nas células controle pela grande quantidade de vermelho no núcleo. Enquanto, o tratamento causou redução nesta marcação.....47

Figura 10. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoeschst 33342 e anti-OCT4 (vermelho) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação.

Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.....48

Figura 11. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-SNAIL/SLUG (vermelho) em condição de cultivo normal -mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias).

Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada tratamento. É possível notar o aumento na expressão do SNAIL/SLUG pela intensidade de vermelho na imagem com o tratamento.....51

Figura 12. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoeschst 33342 e anti-Snail/Slug (verde) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação.

Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.....52

Figura 13. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-E-caderina (vermelho) em condição de cultivo normal -mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias).

Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada tratamento. É possível notar a alta expressão de E-caderina nas células controle pela grande quantidade de vermelho na imagem. Enquanto, o tratamento causou redução nesta marcação.....55

Figura 14. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoeschst 33342 e anti-E-caderina (verde) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação.

Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.....55

Figura 15. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-N-Caderina (vermelho) em condição de cultivo normal -mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias).

Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada

tratamento. É possível notar o aumento na expressão de N-caderina pela intensidade de vermelho na imagem com o tratamento.....57

Figura 16. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoechst 33342 e anti-N-caderina (vermelho) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação. Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.....58

Figura 17. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-VIMENTINA (vermelho) em condição de cultivo normal -mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias). Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada tratamento. Apesar de conseguirmos detectar esse marcador não há uma diferença na sua intensidade entre as células controle e o tratamento.....59

Figura 18. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoechst 33342 e anti-Vimentina (vermelho) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação. Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.....60

Figura 19. Formação de PEH no quarto dia do ensaio de diferenciação. Fotomicrografias do ensaio de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no 4º e 8º dia, adquirida com objetiva de 10 X em sistema de HCS. Formação de estruturas proteicas em rede positivas para o marcador CD34 após o tratamento das CTE com BMP4 e VEGF. Em azul temos a marcação do núcleo com Hoechst 33342 (A), em verde a fluorescência da CTE da linhagem H9-GFP (B), em vermelho a marcação do CD34 (C) e a sobreposição dessas imagens (D).....62

Figura 20. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-CD43 (vermelho) cultivadas em meio indutor nos dias 8 e 12 do ensaio de diferenciação. Comparação apenas de células submetidas à diferenciação nos dias 8 e 12. Nos respectivos tempos essas células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico.....65

Figura 21. Fotomicrografias da linhagem H1 marcada com Hoechst 33342 (azul), anti-CD43 (vermelho) e anti-CD45 (verde) cultivadas em meio indutor no 12º dia do ensaio de diferenciação. Essas células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico.....67

Figura 22. Fotomicrografias da linhagem H1 marcada com Hoechst 33342 (azul), anti-CD34 (verde) e anti-CD43 (vermelho) após 12 dias submetidas à diferenciação. Essas células foram induzidas à diferenciação, e no 12º dia elas foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico. É possível observar a formação de estruturas tridimensionais (saco vitelino-like) por onde emergem células hematopoéticas.....70

Figura 23. Corpos embrióides de células-tronco embrionárias humanas. As células individualizadas plaqueadas no dia 0 (A) se agregam e formam estruturas tridimensionais ao longo de oito dias (B-I). Imagens referentes ao mesmo poço de uma placa de 96 poços, adquiridas por microscopia de contraste de fases com objetiva de 20X.....93

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação do OCT4. (A): Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Quantificação da marcação do OCT4 em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em CTE submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12). Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney(**** $p < 0,0001$).....49

Gráfico 2. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação do Snail/Slug. (A): Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Quantificações da marcação do Snail/Slug em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em CTE submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12). Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney(* $p < 0,05$).....52

Gráfico 3. Níveis de expressão gênica do SNAIL e SLUG. Representação gráfica dos níveis de expressão relativa do SNAIL (A) e SLUG (B) por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p < 0,05$).....53

Gráfico 4. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação da E-caderina e dos seus níveis de expressão gênica. (A) Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Comparação entre a média da intensidade da E-caderina no citoplasma e no núcleo das células da linhagem H9-GFP diferenciadas. (C): Quantificações da marcação da E-caderina em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em CTE submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12). (D): Representação gráfica dos níveis de expressão relativa da E-caderina por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).....56

Gráfico 5. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação da N-caderina e dos seus níveis de expressão gênica. (A) Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Quantificações da marcação da N-caderina em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em CTE submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12). (C): Representação gráfica dos níveis de expressão relativa da E-caderina por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).....58

Gráfico 6. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação da Vimentina. (A): Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Quantificações da marcação da Vimentina em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em CTE submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12).....60

Gráfico 7. Expressão gênica dos PEH. Representação gráfica dos níveis de expressão relativa do CD34 (A) e MIXL1 (B) por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p<0,05$).....63

Gráfico 8. Análises quantitativas das células geradas do ensaio de diferenciação no 8º e 12º dia. Gráficos representativos referentes à análises quantitativas das células geradas nos ensaios de diferenciação realizados com CTE da linhagem H9-GFP. (A): Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) das porcentagens de células positivas para o marcador CD43. (B): Mediana da intensidade de marcação do CD43 em células diferenciadas no 8º e 12º dia do ensaio de diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney(* $p<0,05$). (C): Porcentagem de células CD34+CD43+ no 8º e 12º dia de diferenciação. (D): Porcentagem de células CD45+ no 12º dia de diferenciação. (E): Porcentagem de células CD43+CD45+ no 12º dia de diferenciação.....66

Gráfico 9. Porcentagem de células geradas no ensaio de diferenciação. Gráficos representativos referentes às quantificações realizadas pelo softwares MetaXpress das porcentagens de células geradas nos ensaios de diferenciação realizados nas CTE da linhagem H1 no 4º, 8º e 12º dia. (A): CD34+CD43-CD45-. (B): CD34+CD43+CD45-. (C): CD34-CD43+CD45-. (D): CD34-CD43+CD45+. (E): CD34-CD43-CD45+. (F): Projeção das frequências de todos os fenótipos celulares observados ao longo do ensaio.....69

Gráfico 10. Níveis de expressão gênica do GATA4 e GATA6. Representação gráfica dos níveis de expressão relativa do GATA4 (A) e GATA6 (B) por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p<0,05$).....71

Gráfico 11. Níveis de expressão gênica de todos os genes analisados em nossos experimentos. GATA4 e GATA6. Representação gráfica dos níveis de expressão relativa do GATA4 (A) e GATA6 (B) por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p<0,05$).....91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- μL = Microlitro
- μM = Micromolar
- AGM = Aorta gônada-mesonefros
- APC = do inglês, *Allophycocyanin*
- BMP-4 = do inglês, *Bone Morphogenetic Protein 4*
- cDNA = do inglês, *Complementary Desoxirribonucleic Acid*
- CE = Corpos Embrióides
- CTE = Célula-tronco embrionária
- CTH = Célula-tronco hematopoética
- CTPH = Células-tronco e progenitores hematopoéticos
- Cy3 = do inglês, *Tricycclhexexylphosphine*
- DAPI = 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DEPEC = Dietilpirocarbonato
- DMEM = do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO = Dimetil Sulfóxido
- DNA = do inglês, *Desoxirribonucleic Acid*
- EDTA = Etilenodiamino tetra-acético
- EV = Endoderme visceral
- FGFb = do inglês, *Basic Fibroblast Growth Factor*
- FITC = do inglês, *Fluorescein Isothiocyanate*
- Flt3L = do inglês, *Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand*
- GAPDH = do inglês, *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
- G-CSF = do inglês, *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*
- GFP = do inglês, *Green Fluorescent Protein*
- GFR = do inglês, *Growth Factor Reduced*
- GSKi = do inglês, *Glycogen synthase kinase Inhibitor*
- HCS = do inglês, *High-Content Screening*
- IGF2 = do inglês, *Insulin-Like Growth Factor*
- IL-3 = Interleucina 3
- IL-6 = Interleucina 6
- M = Molar
- MeOH = Metanol
- MIXL1 = do inglês, *mesoderm inducer in xenopus like1*
- mL = Mililitro
- ng = Nanograma
- PBS = do inglês, *Phosphate Buffered Saline*
- PE = do inglês, *Phycoeritrin*
- PEH = Progenitores endoteliais hemogênicos
- PEH = Progenitores endoteliais hemogênicos
- qPCR = do inglês, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*
- RNA = do inglês, *Ribonucleic Acid*
- RNAi = do inglês, *Ribonucleic Acid Interference*
- RNase = Ribonuclease
- SCF = do inglês, *Stem Cell Factor*
- SFB = Soro Fetal Bovino
- TEH = Transição endotelial-hematopoética
- TEM = Transição Epitélio-Mesênquima
- TM = Temperatura de melting

- TPO = Trombopoietina
- TRIZOL = do inglês, *Guanidinium Thiocyanate*
- VEGF = do inglês, *Fibroblast Growth Factor*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Célula-tronco hematopoética.....	19
1.2 Hematopoese embrionária.....	21
1.3 Célula-tronco embrionária.....	23
1.4 Geração de células hematopoéticas <i>in vitro</i>	26
1.5 Sistematização de estudos funcionais por análises de <i>High-content screening</i>	29
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3. MÉTODOS.	33
3.1 Linhagem de células-tronco embrionárias humanas.	34
3.2 Cultivo de células-tronco embrionárias humanas.....	34
3.3 Diferenciação hematopoética.....	35
3.3.1 Diferenciação pelo método de formação de corpos embrióides.....	35
3.3.2 Diferenciação em monocamada.....	37
3.4 Ensaio de imunofluorescência.....	38
3.5 Análises por meio de abordagens de High-content screening.....	40
3.5.1 Imageamento automatizado por HCS.....	40
3.5.2 Análises das imagens com a ferramenta MetaXpress.....	40
3.5.3 Análise das imagens com a ferramenta CellProfiler.....	40
3.6 Extração de RNA.....	42
3.7 Quantificação das amostras de RNA.....	43
3.8 PCR quantitativo (qPCR).....	43
4. RESUSLTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1 Indução da transição epitélio-mesênquima.....	46
4.2 Caracterização molecular da transição epitélio-mesênquima.....	47
4.3 Formação de progenitores endoteliais hemogênicos.....	61
4.4 Diferenciação hematopoética dos progenitores endoteliais hemogênicos.....	64
5. CONCLUSÕES.....	73
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
7. ANEXOS.....	89
7.1 Lista de Primers.....	90
7.2 Painel de expressão dos genes avaliados.....	91
7.3 Diferenciação baseada na formação de corpos embrióides.....	92

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Célula-tronco hematopoética

Através da hematopoese o sistema sanguíneo produz milhares de células diariamente, que atuam na manutenção da homeostase corporal (Boulais & Frenette, 2015 e Goodell *et al.*, 2015), isto é possível graças a população de células-tronco hematopoéticas (CTH) que reside na medula óssea de um indivíduo adulto (Ema *et al.*, 2014).

As CTH são células consideradas multipotentes devido à sua capacidade limitada de diferenciação, podendo originar todos os tipos celulares do sangue (Wahlster & Daley, 2016 e Ali *et al.*, 2017). Elas podem realizar divisões celulares assimétricas assimétricas, as quais originam duas células filhas diferentes: uma célula-tronco e uma célula diferenciada (Venkei & Yamashita, 2018). Assim o *pool* de CTH é mantido por divisões simétricas e assimétricas que caracteriza seu potencial de autorrenovação celular (Seita & Weissman, 2010). A manutenção dessas células na medula óssea se deve ao estado de quiescência, ou seja, as células permanecem estacionadas na fase G0 do ciclo celular e, apenas sob demanda do organismo, como alguma injúria, sua atividade proliferativa é ativada (Jude *et al.*, 2008 e Rossi *et al.*, 2017).

Dessa forma, as CTH ocupam o topo da hierarquia de células progenitoras que perdem progressivamente seu potencial de diferenciação e autorrenovação à medida que se comprometem com linhagens mais específicas do sangue, como células linfóides, mielóides, eritrócitos e megacariócitos (Figura 1) (Orkin & Zon, 2008 e Seita & Weissman, 2010).

Figura 1. Hierarquia das células-tronco hematopoéticas (CTH). Modelo esquemático representando o comprometimento progressivo das CTH com as diferentes linhagens de células sanguíneas. Adaptado de Clément *et al.*, 2017.

Do ponto de vista terapêutico, as CTH podem ser isoladas basicamente de duas fontes: a medula óssea (MO) e o sangue de cordão umbilical (SCU), podendo ser ainda mobilizadas da MO para o sangue periférico (Risueño *et al.*, 2012); porém essas células correspondem a pequena fração celular, cerca de 0,05 a 5% (Satterthwaite *et al.*, 1992; DiGiusto *et al.*, 1994 e Krause *et al.*, 1996). A identificação e isolamento dessas células é efetuada por meio de marcadores de superfície, dentre eles o CD34 (Abe *et al.*, 2017 e Tasev *et al.*, 2016). Contudo, este marcador possui expressão promíscua com outras populações de células progenitoras, como as endoteliais e outras subpopulações vasculares e mesenquimais (Kim *et al.*, 2016 e Sidney *et al.*, 2014), sendo necessária a co-expressão com outros marcadores para a identificação das CTH, como o CD43 e o CD45 (Stella *et al.*, 1995; Slukvin, 2013 e Lim *et al.*, 2013).

1.2 Hematopoese embrionária

O desenvolvimento hematopoético em mamíferos é um processo complexo e envolve eventos sequenciais que levam à maturação das CTH (Kaufman, 2009). Após a formação do zigoto e as primeiras divisões celulares do desenvolvimento embrionário, as células da massa celular interna do blastocisto, segregam-se para formar a endoderme e o epiblasto (Huber *et al.*, 2004).

Durante a gastrulação as células epiblasticas passam por alterações morfológicas, ganham motilidade e migram no embrião em desenvolvimento para formar uma estrutura transiente chamada de linha primitiva, de onde emergem os três folhetos embrionários (ectoderme, mesoderme e endoderme) (Nieto *et al.*, 2002; Rossant & Tam, 2009 e Yoshino *et al.*, 2018).

Essas alterações ocorrem por meio de um processo biológico conhecido como transição epitélio-mesênquima (TEM) em que alterações moleculares conduzem essas células epiblasticas a convergirem de um fenótipo epitelial para um fenótipo mesenquimal (Bommi *et al.*, 2018). A indução da TEM é ativada por vias de sinalizações intracelulares complexas que envolvem inúmeros fatores de transcrição como Snail, Slug, Twist e Zeb (Fontana *et al.*, 2019 e Liu, 2019). Estes fatores reprimem transcricionalmente a expressão de genes relacionados à formação de junções de adesão celular como a E-caderina (Yang *et al.*, 2013; Karicheva *et al.*, 2016 e Rout-Pitt *et al.*, 2018). Concomitantemente essas células adquirem marcadores mesodermiais como a N-caderina e Vimentina que são moléculas associadas à um perfil celular migratório (Johnson *et al.*, 2013).

Uma vez estabelecido o tecido mesodérmico, o sistema hematopoético emerge em momentos e locais distintos (Al-drees *et al.*, 2015) (Figura 2), assim, a hematopoese

embrionária é dividida em duas fases: a hematopoese primitiva e a definitiva (Sugiyama *et al.*, 2007). A hematopoese primitiva inicia-se no saco vitelino logo nas primeiras semanas de gestação (Palis *et al.*, 1999). O saco vitelino é uma membrana bilaminar que circunda o embrião e é constituída basicamente de uma camada de células epiteliais conhecidas como endoderme visceral (EV) e uma camada de células mesodermas (Al-drees *et al.*, 2015). Durante a hematopoese primitiva as células da EV produzem fatores que, por sua vez, induzem às células progenitoras mesodermas a se comprometerem com o destino hematopoético (Ferkowicz & Yoder, 2005). As células geradas na hematopoese primitiva possuem um potencial de diferenciação restrito à macrófagos, eritrócitos e megacariócitos primitivos (Palis, 2014).

Já a hematopoese definitiva é caracterizada pela produção das CTH multipotentes, com o potencial de reconstituir o sistema hematopoético adulto (Matsuoka *et al.*, 2001). Essa fase se inicia logo após a hematopoese primitiva e, ocorre em diferentes sítios anatômicos: como a placenta, o saco vitelino e, principalmente, dentro da aorta gônada-mesonefros (AGM) (Zovein *et al.*, 2008 e Lacrin *et al.*, 2009). A emergência das CTH na AGM ocorre através do endotélio hemogênico, onde células progenitoras passam pelo processo de transição endotelial-hematopoética (TEH) (Bigas & Waskow, 2016 e Liu *et al.*, 2015). Estas, posteriormente, entram na circulação e migram pro fígado fetal, onde se expandem e diferenciam em todas as linhagens de células sanguíneas (Lacrin *et al.*, 2009 e Zovein *et al.*, 2008). Mais tarde, próximo ao nascimento, as CTH se alojam na medula óssea onde sustentarão a hematopoese por toda a vida adulta (Mikkola & Orkin, 2006 e Medvinsky *et al.*, 2011).

Figura 2. Sítios hematopoéticos embrionários. Esquema demonstrativo do surgimento das primeiras células do sangue nos diferentes sítios anatômicos ao longo do desenvolvimento embrionário. Adaptado de Barom *et al.*, 2012.

Devido às questões éticas, o estudo das fases iniciais do desenvolvimento do sistema hematopoético, e em particular a emergência das CTH, foi por muito tempo restrito a modelos murinos. Neste contexto, o estabelecimento de linhagens de célula-tronco embrionária (CTE), e de protocolos para sua diferenciação *in vitro*, tem se mostrado uma ferramenta essencial para a compreensão dos estágios iniciais do desenvolvimento hematopoético humano (Chin *et al.*, 2016), além de possibilitar a geração de células com potencial clínico, sobretudo as células-tronco e progenitores hematopoéticos (CTPH) (Qui *et al.*, 2008 e Rafii *et al.*, 2012).

1.3 Célula-tronco embrionária

As célula-tronco embrionária (CTE) são tipicamente derivadas da massa celular interna do embrião, no estágio de blastocisto (Strom *et al.*, 2007; Tanaka *et al.*, 2006 e Turetsky *et al.*, 2007) e, detém a habilidade de gerar todos os tipos de células de um indivíduo adulto, ou seja, são pluripotentes, mantendo a capacidade de autorrenovação e, podendo ser cultivadas *in vitro* por várias passagens em condições especiais, com estabilidade genética (Desai *et al.*, 2015 e Monti *et al.*, 2012).

Em cultura, as CTE apresentam morfologia epitelial com bordas distintas e colônias compactas (Desai *et al.*, 2015 e Xu *et al.*, 2001). O cultivo dessas células consiste em um processo delicado, que exige grande rigor quanto à sua manipulação, além de necessitarem de células alimentadoras, matrizes extracelulares, proteínas ou polímeros sintéticos para sua propagação (Reubinoff *et al.*, 2000 e Chen *et al.*, 2014). Sua caracterização pode ser baseada no seu metabolismo, por meio da alta atividade de fosfatase alcalina, aliado a expressão de genes associados à manutenção da pluripotência como o OCT4, NANOG e SOX2 (Martí *et al.*, 2013 e Reubinoff *et al.*, 2000).

As CTE foram isoladas pela primeira vez da massa celular interna do embrião em estágio de blastocisto (Thompson *et al.*, 1998), desde então elas têm sido utilizadas para a geração de diversos tipos celulares *in viro*, dentre eles células neurais, cardíacas e sanguíneas (Figura 3) (Feyen *et al.*, 2016; Loser *et al.*, 2010 e Reubinoff *et al.*, 2000).

Figura 3. Isolamento, cultivo e diferenciação de células-tronco embrionárias *in vitro*. Modelo esquemático que representa o isolamento de CTE da massa celular interna do blastocisto, seu cultivo e diferenciação *in vitro* em diferentes tipos celulares. Adaptado de Washington, DC. National Academies Press, 2006.

1.4 Geração de células hematopoéticas *in vitro*

Os protocolos de geração de células hematopoéticas a partir de CTE, descritos na literatura, buscam mimetizar as sequências de eventos naturais do desenvolvimento embrionário (Zambidis *et al.*, 2005 e Kennedy & Keller, 2007), e envolvem a formação de corpos embrióides ou o co-cultivo com células alimentadoras (Chadwick *et al.*, 2003; Ledran *et al.*, 2008; Vodyanik *et al.*, 2005 e Kennedy & Keller, 2007). Entretanto, os protocolos de diferenciação podem promover a formação de diferentes populações, sendo algumas dessas intermediárias ao aparecimento das células hematopoéticas propriamente dita (Liu *et al.*, 2015).

O processo de diferenciação hematopoético depende da ação conjunta e coordenada de diversos fatores e vias de sinalização. Inicialmente, há a ação cooperativa entre as vias de sinalização WNT/ β -catenina, activina/nodal e a proteína morfogenética óssea 4 (BMP4, do inglês, *bone morphogenetic protein 4*) que induzem a diferenciação mesodérmica e a formação da linha primitiva, sendo caracterizada pela expressão de genes como o Brachyury (T) e MixL1 (Zhang *et al.*, 2008; Sumi *et al.*, 2008; Wang & Nakayama, 2009; Cerdan *et al.*, 2012; Naito *et al.*, 2006; Ueno *et al.*, 2007 e Raymond *et al.*, 2014).

Em seguida, o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*) em sinergia com o fator de crescimento de fibroblasto (FGF, do inglês, *fibroblast growth factor*) especificam o surgimento dos hemangioblastos, precursores de células endoteliais e sanguíneas, originando o endotélio hemogênico, identificado pela expressão de algumas moléculas como o KDR e CD34 (Ditadi *et al.*, 2015 e Daniel *et al.*, 2016).

Em cultivo com fatores de expansão de CTH: SCF, Flt3L, trombopoietina (TPO), interleucina (IL)-3 e IL-6 os progenitores endoteliais hemogênicos (PEH) maturam-se em células-tronco e progenitores hematopoéticos (CTPH) até a aquisição do marcador CD45, um indicador de células hematopoéticas maduras (Sauvageau *et al.*, 2004 e Kim *et al.*, 2017) (Figura 4).

Figura 4. Etapas de maturação de células-tronco hematopoéticas *in vitro*. Modelo esquemático que representa os fatores envolvidos na diferenciação hematopoética de CTE *in vitro* bem como a expressão de marcadores de superfície utilizados para identificar as diferentes etapas de maturação celular. Adaptado de Liu *et al.*, 2015.

Apesar dos estudos de diferenciação *in vitro* a partir de CTE terem permitido grandes avanços no entendimento das fases iniciais da hematopoese humana, ainda existe uma enorme limitação técnica que impede a sistematização dos estudos visando a avaliação funcional dos inúmeros genes e fatores implicados na regulação deste processo (Lim *et al.*, 2013 e Liu *et al.* 2015). Em parte, isto se deve à complexidade dos protocolos de diferenciação e aos métodos utilizados para a quantificação dos diferentes tipos celulares emergindo ao longo do processo (Naito *et al.*, 2006 e Ledran *et al.*, 2008).

Por exemplo, em um método conhecido como *spinEB* no qual são formados corpos embrióides (CE) em placas de 96 poços de fundo em U, é necessário coletar células de vários poços de uma mesma placa para se ter uma amostragem substancial que seja viável a realização de quantificações de CTPH (Ng *et al.*, 2008). Outras abordagens

como a diferenciação em co-cultivo com células estromais ou por formação de CE de cultura de CTE em suspensão que se diferenciam espontaneamente são realizadas em geral em placas de 6 poços que limitam as condições experimentais exploradas bem como aumenta o volume de reagentes que torna os ensaios ainda mais onerosos (Chadwick *et al.*, 2003; Ledran *et al.*, 2008; Vodyanik *et al.*, 2005 e Kennedy & Keller, 2007).

Tendo em vista as limitações técnicas destacadas acima, o estudo da hematopoese se beneficiaria amplamente do estabelecimento de uma abordagem capaz de sistematizar a avaliação quantitativa da geração de CTPH, em um grande número de condições experimentais (Chen *et al.*, 2014 e Mattiazzi Usaj *et al.*, 2016). Neste sentido, o estabelecimento de um protocolo de diferenciação em placas de 96 poços, associado a um método de quantificação capaz de detectar eventos raros num conjunto limitado de células, seria de grande valia (Bray *et al.*, 2017). Neste sentido, um conjunto de abordagens de microscopia quantitativa referidas em conjunto por *High-content screening* (HCS), apresenta um grande potencial para o êxito desta tarefa (Eiken *et al.*, 2009 e Keating *et al.*, 2018).

De fato, os avanços na compreensão do sistema hematopoético coincidem com o desenvolvimento de novas ferramentas tecnológicas (Goodell *et al.*, 2015). As primeiras informações a respeito da origem das CTH foram obtidas através de observações microscópicas, o que, posteriormente, elevou a hematologia à um patamar de estudos quantitativos (Weissman & Shizuru, 2008).

1.5 Sistematização de estudos funcionais por análises de *High-content screening*

A abordagem de *High-content screening* (HCS) consiste na combinação de microscopia automatizada baseada em imunofluorescência com sistemas computacionais (Buggenthin *et al.*, 2013). Ela foi desenvolvida pela indústria farmacêutica e biotecnológica inicialmente para a prospecção de moléculas candidatas a serem utilizadas (como drogas) e desde então, por conta do seu alto poder de análise passou a ser empregada na pesquisa básica e aplicada para diversas finalidades (Xia & Wong, 2012).

As novas tecnologias ao proporcionar à esses equipamentos fontes de luz mais estáveis, rápido mecanismos de autofoco e automação do processo elevaram as funções dos microscópios que hoje vão além da ampliação de imagens (Boutros *et al.*, 2015; Zanella *et al.*, 2010). Paralelamente e não menos importante, a descoberta e o desenvolvimento de reagentes fluorescentes dos mais diversos, ampliaram as aplicações da microscopia de fluorescência (Goodell *et al.*, 2015).

Basicamente nos ensaios de HCS são estudadas respostas celulares frente à estímulos que levem à alterações fenotípicas (O'Brien & Edvardsson, 2017). A miniaturização de ensaios celulares em microplacas permite capturar imagens de forma automatizada de inúmeras condições experimentais simultaneamente gerando uma alta quantidade de dados em um curto espaço de tempo (Abraham *et al.*, 2004). A combinação de reagentes (anticorpos, corantes e sondas) específicos para diferentes estruturas e compartimentos celulares possibilita avaliar a presença e a localização de moléculas gerando informações a nível de célula individualizada o que viabiliza a distinção de fenótipos entre populações de células heterogêneas (Zanella *et al.*, 2010; Ang & Pethe, 2016).

Com a utilização de *softwares* é possível extrair dados quantitativos de imagens digitais e classificar as alterações citológicas em cada condição experimental (Conrad & Gerlich, 2010; Ang & Pethe, 2016). Essas informações geram um perfil fenotípico multiparamétrico, de cada célula em uma determinada condição experimental, que pode ser utilizada para a dissecção de mecanismos moleculares envolvidos nos mais variados fenômenos biológicos, incluindo a autorrenovação e diferenciação de CTE (Outten *et al.*, 2011; Shah & Cheng, 2014).

Por conta disso, o presente trabalho buscou estabelecer um método de diferenciação em monocamada com meio quimicamente definido para a realização de estudos funcionais quantitativos das etapas iniciais do desenvolvimento do sistema hematopoético.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estabelecer um ensaio de diferenciação hematopoética utilizando células-tronco embrionárias humanas como modelo para a realização de ensaios quantitativos.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar um protocolo de diferenciação hematopoética com meio quimicamente definido,
- Avaliar as alterações moleculares e fenotípicas que ocorrem nas CTE durante o seu comprometimento com células da linhagem hematopoética,
- Validar o modelo na forma de um ensaio de high content screening

MÉTODOS

3. MÉTODOS

3.1 Linhagem de células-tronco embrionárias humanas

Para este estudo duas linhagem de células-tronco embrionárias humanas foram utilizadas: a linhagem H1 e H9-eGFP, ambas cedidas pelo Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto, adquiridas do banco WiCell (University of Wisconsin, Madison, EUA).

3.2 Cultivo de células-tronco embrionárias humanas

As CTE da linhagem H1 e H9-eGFP estavam congeladas em criotubos, em nitrogênio líquido, contendo uma solução de 90% de Soro Fetal Bovino (SFB, HyClone, Thermo Scientific) e 10% de DMSO (Dimetil Sulfóxido, Inlab). Para o seu cultivo e expansão os criotubos foram descongelados em banho-maria a 37°C, e seu conteúdo transferido para tubos falcon de 15 mL com 9 mL de meio DMEM/F12 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD EUA), este foi centrifugado a 160 x *G* por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* de células ressuspensão em 3 mL de meio mTeSR-1 (StemCell Technologies, Vancouver, CA). Distribuímos cuidadosamente 1 mL da suspensão celular em 3 poços de uma placa de 6 poços, que havia sido recoberta com matrigel (Corning, NY, EUA) com no mínimo 2 horas de antecedência.

As células foram cultivadas em incubadoras de CO₂ a 37°C, realizando trocas diárias do meio, até atingirem 70-80% de confluência. Para a realização da passagem, os poços foram lavados com solução PBS 1X e incubados com a solução EDTA 0,5M a temperatura ambiente por 4 minutos. Posteriormente o EDTA foi retirado, e dispensamos uma única vez um jato de meio de cultura (1,5 mL) para dissociar as colônias, o qual foi

dividido em três poços recobertos com matrigel. A cada poço completávamos 2 mL de meio para o cultivo e expansão das colônias de CTE (Beers, J. *et al.* 2012).

3.3 Diferenciação hematopoética

O escalonamento e reprodutibilidade de dois protocolos de diferenciação hematopoética foram avaliados em relação a viabilidade para a realização de análises baseada no imageamento de ensaios celulares pela plataforma de High-content screening:

- 1- Protocolo de diferenciação baseado na formação de corpos embrióides.
- 2- Protocolo de diferenciação baseado no cultivo de células em monocamada.

3.3.1 Diferenciação pelo método de formação de corpos embrióides

O método de diferenciação hematopoética baseado na formação de corpos embrióides (CE) em placas de 96 poços de fundo em U foi desenvolvido por Ng *et al.*, 2008 (Figura 5). Antes de iniciar o experimento, o meio de cultura das CTE em confluência foi removido e, mTeSR-1 suplementado com 10 μ M de um inibidor de Rho-quinase (Y27632, StemCell Technologies, Vancouver, CA) foi adicionado, após, cerca de duas horas, as células foram submetidas à dissociação. Para isso, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com solução de PBS 1X, e incubadas com 1 mL de Acutase® (STEMCELL Technologies™, Vancouver, CA) por 10 minutos a 37°C. Em seguida, 3 mL de DMEM/F12 foi adicionado e este volume foi transferido à um tubo falcon de 15 mL, este foi centrifugado a 160 x *G* por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e, as células foram ressuspensas em 2 mL de meio StemDiff Apel 2® (StemCell Technologies, Vancouver, CA). Após a contagem celular, aproximadamente 3 mil células foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo em U em meio StemDiff Apel 2® suplementado com 10 ng/mL de BMP4 (Peprotech, Rocky Hill, EUA), 20 ng/mL de VEGF (Peprotech, Rocky Hill, EUA), 10 ng/mL de FGFb

(PeproTech, Rocky Hill, EUA), 25 ng/mL de SCF (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 10 ng/mL de Activina A (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 3 μ M de um inibidor seletivo da GSK3, o CHIR99021 (StemCell Technologies, Vancouver, CA) e 10 μ M de Y27632 (StemCell Technologies, Vancouver, CA). Em seguida a placa foi centrifugada a 160 x G por 10 minutos para favorecer a agregação celular e formação dos CE (Figura 6).

Após quatro dias de cultivo, o meio de cultura de cada poço foi removido cuidadosamente e 100 μ L de StemDiff Apel 2® suplementado com 10 ng/mL de BMP4 (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 50 ng/mL de VEGF (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 10 ng/mL de FGFb (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 50 ng/mL de SCF (PeproTech, Rocky Hill, EUA) e 30 ng/mL de IGF2 (PeproTech, Rocky Hill, EUA) foram adicionados.

No 8º dia, os CE foram transferidos para uma placa de fundo chato de 96 poços revestida com matrigel (*growth factor reduced*, Corning, NY, EUA). A placa foi centrifugada a 160 x G por 10 minutos, o sobrenadante foi removido e, 100 μ L de StemDiff Apel 2® suplementado com 100 ng/mL de SCF (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 50 ng/mL de VEGF (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 25 ng/mL de FLT3L (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 25 ng/mL de TPO (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 25 ng/mL de IL-6 (PeproTech, Rocky Hill, EUA), 20 ng/mL de IGF2 (PeproTech, Rocky Hill, EUA) e 10 ng/mL de FGFb (PeproTech, Rocky Hill, EUA) foram adicionados. No 12º dia, foi realizada a troca de meio (com as mesmas suplementações) e as células foram cultivadas até o 16º dia .

Figura 5. Modelo esquemático do protocolo de diferenciação baseado na formação de corpos embrioides. Os corpos embrioides foram formados em placas de fundo em U com meio contendo BMP4, VEGF, FGFb, SCF, Activina A e CHIR99021. Após quatro dias de cultivo removemos o CHIR99021 e a Activina A e adicionamos IGF2 ao meio. No 8º dia, os corpos embrioides foram transferidos para placas de 96 poços de fundo chato/reto revestido com matrigel e foram estimuladas com SCF, VEGF, FLT3L, TPO, IL-6, IGF2 e FGFb.

3.3.2 Diferenciação em monocamada

Para induzir a diferenciação hematopoética nas CTE pelo método de monocamada nos baseamos no trabalho de Kitajima e colaboradores (2016) (Figura 6). Assim, como no protocolo de formação de corpos embrioides, antes de iniciar o experimento propriamente dito, as células foram tratadas com mTeSR-1 suplementado com 10 μ M de Y27632, dissociadas com Acutase® (STEMCELL Technologies™, Vancouver, CA) e ressuspensas em 2 mL de mTeSR-1. Após a contagem em câmara de Neubauer, 800 células foram plaqueadas em mTeSR-1 suplementado com 10 μ M de Y27632 em placa de 96 poços revestida com Matrigel-GFR (*growth factor reduced*, Corning, NY, EUA) e mantidas em cultivo por 4 dias.

Em seguida o meio de cultura foi removido cuidadosamente, lavados com PBS 1X e, 100 μ L de StemDiff Apel 2® suplementado com 5 μ M de CHIR99021 (StemCell Technologies, Vancouver CA) foi adicionado, caracterizando o dia 0 do ensaio de diferenciação. Após 24 horas, o meio de cultura foi removido, os poços foram lavados duas vezes com PBS 1X e, 100 μ L de StemDiff Apel 2® suplementado com 25 ng/mL de BMP4 (Peprotech, Rocky Hill, EUA) foram adicionamos a cada poço. No dia seguinte,

o meio foi trocado e este foi suplementado com 25 ng/mL de BMP4 (Peprotech, Rocky Hill, EUA) e 40 ng/mL de VEGF (Peprotech, Rocky Hill, EUA). Após dois dias, o meio foi novamente substituído por 100 µL de StemDiff Ape1 2® suplementado com 25 ng/mL de BMP4 (Peprotech, Rocky Hill, EUA), 300 ng/mL de SCF (Peprotech, Rocky Hill, EUA), 10 ng/mL de IL-3 (Peprotech, Rocky Hill, EUA), 10 ng/mL (Peprotech, Rocky Hill, EUA) de IL-6 (Peprotech, Rocky Hill, EUA) e 50 ng/mL de G-CSF (Peprotech, Rocky Hill, EUA). No 8º dia, mais uma troca de meio foi realizada (com a mesma composição) e as células foram cultivadas até o 12º dia .

Figura 6. Modelo esquemático do ensaio de diferenciação baseado no método de plaqueamento em monocamada. As CTE foram plaqueadas e mantidas em cultivo por quatro dias. No dia 0, início da diferenciação, o CHIR99021 foi adicionado. Após 24 horas, o meio foi substituído, e suplementado com BMP4. No dia seguinte, a troca de meio foi realizada com suplementação de BMP4 e VEGF. No 4º dia, as células foram estimuladas com um coquetel de citocinas contendo BMP4, SCF, FLT3L, IL-3, IL-6 e G-CSF.

3.4 Ensaio de imunofluorescência

Para os ensaios de microscopia de imunofluorescência placas de 96 poços pretas com fundo transparente apropriadas para o imageamento foram utilizadas (Corning, NY, EUA, #3603), o meio de cultura foi removido cuidadosamente após centrifugar a placa por 5 minutos a 160 x *G*, os poços foram lavados duas vezes com solução PBS 1X, seguido da adição de 100 µL por poço de solução fixadora e permeabilizadora (2% de formol (Sigma-Aldrich, MO, EUA) em metanol (MeOH) gelado) , as placas foram mantidas no freezer a -20°C durante 20 minutos, os poços foram lavados duas vezes com solução PBS 1X e seguiram para a etapa de *quenching* com glicina por 15 minutos (0,1 M, Sigma-Aldrich, MO, EUA) (50 µL), com o objetivo de neutralizar grupos funcionais

livres que podem por sua vez formar ligações covalentes inespecíficas com os anticorpos a serem utilizados.

Posteriormente, os poços foram lavados duas vezes com solução PBS 1X, seguida pelo bloqueio com 1% de SFB em solução PBS (50 µL) por 30 minutos. Ao final dessas etapas, realizamos a marcação *overnight* do anticorpo primário contra o marcador de pluripotência anti-OCT4 (BD-Biosciences, San Diego, EUA), e os marcadores de transição epitélio-mesênquima: anti-E-Caderina (BD-Biosciences, San Diego, EUA), anti-N-Caderina (BD-Biosciences, San Diego, EUA), anti-Vimentina (BD-Biosciences, San Diego, EUA) e anti-SNAIL/SLUG (BD-Biosciences, San Diego, EUA) em uma concentração de 1:100.

Após a marcação dos anticorpos primários, os poços foram lavados três vezes com solução PBS 1X, e incubados por 45 minutos à temperatura ambiente com os respectivos anticorpos secundários, além do marcador nuclear Hoescht 33342 (concentração de 1:1000), o marcador citoplasmático CellMask Blue (concentração de 1:10000). Para os anticorpos conjugados anti-CD34 FITC (mouse, BD-Biosciences, San Diego, EUA #348053), anti-CD43 PE (mouse, BD-Biosciences, San Diego, EUA #560199) e anti-CD45 APC (mouse, BD-Biosciences, San Diego, EUA #555485), apenas uma incubação por 15 minutos após a etapa de bloqueio foi realizada.

Como as marcações com o anticorpo conjugado ao fluorocromo APC implica em fraca detecção em nosso sistema de HCS, o anticorpo CD45 foi marcado com anticorpo secundário para promover a amplificação do seu sinal. Ao fim das marcações, os poços foram lavados três vezes com solução PBS 1X e mantidos em 100 µL de PBS até a aquisição das imagens.

3.5 Análises por meio de abordagens de High-content screening

3.5.1 Imageamento automatizado por HCS

A aquisição automatizada das imagens foi realizada pelo sistema de HCS ImageXpress Micro XLS (Molecular Devices, San José, EUA), utilizando os cubos para detecção de fluorescência DAPI, FITC, Cy3 e Texas Red, na objetiva de 10X, sendo adquiridas 16 imagens justapostas (4X4) por poço, para cada um dos cubos de fluorescência, totalizando 64 imagens por poço, 3840 imagens por placa completa.

3.5.2 Análises das imagens com a ferramenta MetaXpress

Para a quantificação das porcentagens de fenótipos celulares apresentando dupla ou tripla marcação utilizamos o software MetaXpress do próprio sistema de HCS. Utilizamos o módulo *Multi-wavelength cell scoring* para a determinação da região nuclear marcada com o Hoechst 33342 e, em seguida, determinamos a região celular para fazer demais quantificações (porcentagens e intensidade das marcações de células CD34⁺, CD43⁺, CD45⁺, OCT4, SNAIL/SLUG⁺, E-Caderina⁺, N-Caderina⁺, Vimentina⁺).

3.5.3 Análise das imagens com a ferramenta CellProfiler

Para mensurar a intensidade dos marcadores analisados utilizamos o *software* de licença aberta CellProfiler 2.2.1 (<http://cellprofiler.org>). Essa ferramenta permite-nos extrair dados quantitativos a partir de imagens digitais obtidas por microscopia de fluorescência. Inicialmente, o endereço da pasta que contém as imagens foi inserido e filtros foram aplicados para selecionar as imagens de alta qualidade (formato .TIF). Em seguida, as informações que descrevem as imagens utilizando o módulo “*Metadata*” foram extraídas, obtendo às quantificações efetuadas pelo *software*. Por meio de um arquivo de texto (.csv) as informações dos experimentos, como nome da placa, poços, sítios, cubos de detecção e condições experimentais foram cruzadas. No módulo

“*NamesAndTypes*” os nomes de cada marcador visualizado em cada cubo de detecção foram identificados: “w1” para o cubo DAPI, “w2” para o FITC, “w3” para Cy3 e “w4” para Texas Red, permitindo o ajuste de qual marcador foi analisado em cada cubo de detecção.

O módulo de análise permitiu identificar os objetos primários definido como núcleos, por meio da marcação de Hoechst. Para isso uma série de parâmetros foram ajustados como: o tamanho dos núcleos das células (valores em pixels), a estratégia para a determinação do platô (*threshold*) do sinal de fluorescência para a distinção do objeto (*foreground*) do fundo (*background*), bem como estratégias para a distinção de objetos justapostos. A estratégia de *threshold* global baseada no método de Otsu três classes de intensidade foi utilizada, permitindo identificar a intensidade limite entre o *background* e o núcleo.

A identificação dos objetos secundários foi possível empregando o núcleo como referência associado ao método de distanciamento (expandindo as delimitações do objeto primário em 10 pixels). Para os ensaios realizados com a linhagem H9-GFP, a segmentação de objeto secundário (célula) foi baseado na expressão constitutivamente da proteína eGFP, que implica em pigmentação verde fluorescente por todo o seu citoplasma. Neste caso, é importante ressaltar que os anticorpos utilizados para as demais quantificações foram recombinados, pois o canal do FITC foi ocupado pela expressão de GFP. Enquanto que para a linhagem H1 a determinação do objeto secundário foi realizado com base na marcação do CellMask Blue.

A identificação da região citoplasmática das células foi feita pelo módulo de identificação de objetos terciários. Nele utilizamos as informações dos objetos primários

e secundários para subtrair a área do objeto maior (célula) pela área do objeto menor (núcleo) resultando no objeto terciário equivalente ao citoplasma.

Uma vez realizada as segmentações (Figura 7) com a determinação dos compartimentos celulares, o módulo de quantificação da intensidade da imagem foi utilizada para obtermos o valor da intensidade do sinal emitido de cada marcador investigado em nossas imagens.

Figura 7. Segmentação celular. Imagens representativas da segmentação celular com a delimitação no núcleo (linhas pretas) e citoplasma (linhas rosa) nas imagens adquiridas. Imagem referente à um ensaio realizado com CTE da linhagem H9-GFP.

3.6 Extração de RNA

Para as análises de expressão gênica, o ensaio de diferenciação hematopoética foi escalonado para a placa de 24 poços (respeitando-se a proporcionalidade do número celular e das concentrações das drogas), com o intuito de obter quantidade de material (RNA) suficiente para as avaliações. Para isso, o meio foi retirado dos poços e estes foram lavados com solução de PBS 1X, seguido da adição de 250 μ L de PBS 1X com DEPEC (Dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) e 750 μ L de TRIZOL (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) à cada poço da placa. As amostras (controle e diferenciadas do 4º e 8º dia) foram então coletadas e mantidas em freezer a -80°C para posterior extração do RNA.

Após o descongelamento das amostras, 10 µL de glicogênio e 200 µL de clorofórmio foram adicionados e homogeneizados em vortex. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 160 x *G* por 15 minutos a 4°C. O anel formado foi coletado e transferido para novos tubos, nos quais 500 µL de isopropanol gelado foi adicionado. Para a precipitação do RNA, o material foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 160 x *G* por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O pellet foi ressuspensão em etanol 70% e, centrifugado a 160 x *G* por 10 minutos a 4°C. Após o descarte do sobrenadante, o pellet foi ressuspensão em 15 µL de água livre RNase e as amostras de RNA foram armazenadas em freezer -80°C.

3.7 Quantificação das amostras de RNA

O RNA total de cada amostra foi quantificado em Nanovue (GE) no comprimento de onda de 260 nm, utilizando equivalência de 40 µg/mL para 1 unidade de absorbância. Avaliamos o seu grau de pureza através da razão 260/280 nm. As amostras com razões entre 1,6 e 1,8 foram utilizadas para a avaliação de expressão gênica.

3.8 PCR quantitativo (qPCR)

Uma fração de cada amostra de RNA (500 ng) foi utilizado na síntese do cDNA (10 µL), pela transcrição reversa utilizando o kit “High Capacity cDNA Archive Kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA foi posteriormente diluído 5 vezes para a utilização nas reações de PCR quantitativo.

Para a validação das análises baseada no imageamento de ensaios celulares, avaliamos os transcritos dos marcadores CD34, CD43, CD45, E-caderina, N-caderina, Snail1, Snail2, MIXL1, GATA4 e GATA6 (Tabela 1- anexo).

As reações de qPCR foram realizadas em duplicata utilizando primers em conjunto com o reagente Power SyBR Green MasterMix, no aparelho 7300 Real Time

PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA). Os resultados foram avaliados por meio do software Sequence Detection System V1.3 para obtenção dos valores de CT e o software Excel para o cálculo dos valores de ΔCT . Este foi calculado pela normalização de cada amostra, subtraindo do valor da média do CT do gene de interesse o valor da média do CT do controle endógeno, o GAPDH. Como referência para cálculo de valores de expressão relativa foi utilizado a fórmula ($2^{-\Delta\Delta CT}$) (Pfaffl, 2001).

As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA), utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney. Os resultados foram apresentados com média e SEM e os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E
DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Indução da transição epitélio-mesênquima

No presente trabalho tomamos como base o protocolo de diferenciação em monocamada descrito por Kitajima e colaboradores (2017). Este protocolo mimetiza a ativação da via Wnt/Beta-catenina no primeiro dia, pela inibição de GSK3B mediada por uma droga (CHIR). Em seguida, a ativação da via TGF-beta/Smad é obtida pela adição de BMP4 por três dias, coordenando assim, as primeiras etapas da diferenciação mesodérmica, por meio da indução da TEM. A adição conjunta de VEGF com BMP4, direciona as células para uma diferenciação endotelial. Na segunda etapa do protocolo de diferenciação, adiciona-se um coquetel de citocinas contendo BMP4, SCF, FLT3L, IL-3, IL-6 e G-CSF, já descritos na literatura como sendo fatores-chave para a geração de células hematopoéticas *in vitro* (Kim et al., 2017). Este protocolo apresenta uma série de vantagens como: uso de menor quantidade de citocinas, execução mais simplificada, mais reprodutível e passível de escalonagem.

A primeira etapa deste processo de diferenciação, que envolve o tratamento das CTE com GSKi por 24 h, já implica em alterações significativas da morfologia celular, registrada por meio de microscopia de contraste de fases (Figura 8). Observamos que as colônias de CTE se desagregaram, as células adquiriram morfologia mais alongadas e, apresentaram migração para a periferia.

Figura 8. Descaracterização das colônias de CTE. Fotomicrografias adquiridas por meio de microscopia eletrônica com objetiva de 20 X das culturas celulares após o tratamento com GSKi por 24h.

Estas alterações morfológicas sugerem que as células entraram no processo de transição epitélio-mesênquima (TEM), o qual células epiteliais alteram sua morfologia, ganham motilidade e migram para diferentes localidades e se diferenciam em diversos tipos celulares (Nieto, 2002; Yoshino *et al.*, 2018). É justamente através da TEM que durante a gastrulação as células do embrião em desenvolvimento se diferenciam, migram através da linha primitiva e formam a mesoderme nascente (Oda *et al.*, 1998; Hemavathy *et al.*, 2000; Thiery, 2002; Nieto, 2002).

4.2 Caracterização molecular da transição epitélio-mesênquima

Na superfície das CTE existem complexos especializados de proteínas que formam junções célula-célula, essenciais para a manutenção de suas características epiteliais (Lamouille & Derynck, 2014). Durante a TEM, há uma perda das junções celulares e da polaridade apical-basal ocasionando uma reorganização do citoesqueleto, alterando o programa de sinalização que define o formato celular bem como seu perfil de expressão gênica (Thiery & Sleeman, 2006; Thiery *et al.*, 2009). Após o início da TEM,

essas junções são desconstruídas por meio da reorganização ou degradação dessas proteínas (Lamouille & Derynck, 2014).

Em nosso trabalho, realizamos duas avaliações independentes, utilizando as linhagens H1 e H9-GFP de CTE. A primeira, envolveu o uso da linhagem H9, comparando células cultivadas por 4 dias em MTESR (condição controle para manutenção de pluripotência) ou no meio indutor (Chir por um dia e BMP4 + VEGF por 3 dias). Adicionalmente, a linhagem H1 foi submetida ao mesmo tratamento e avaliada longitudinalmente nos dias 1, 2, 4, 8 e 12.

Tendo em vista que a ativação da via Wnt/Beta-catenina no primeiro dia (pela inibição de GSK3B, por CHIR), assim como a ativação da via TGF-beta/Smad por três dias (pela adição de BMP4), tem o papel de coordenar as primeiras etapas da diferenciação mesodérmica, por meio da TEM, nos caracterizamos este processo ao longo dos primeiros dias, avaliando a intensidade da marcação de proteínas E-caderina, N-caderina, Vimentina e o SNAIL e SLUG que são fatores de transcrição que coordenam esse processo. Em paralelo analisamos também o OCT4, marcador de pluripotência celular.

As imagens obtidas pelo ensaios de HCS mostram intensa marcação para o OCT4 nas CTE em estado de pluripotência (Figura 9). A mediana da intensidade desse marcador apresentou-se significativamente menor ($p < 0,0001$) no processo de diferenciação celular (Gráfico 1). Analisando a intensidade dessa marcação ao longo do ensaio observamos que o OCT4 se mantém mesmo após a inibição seletiva da GSK3, apresentando redução a partir do 4º dia de diferenciação (Figura 10), o que também foi observado por Tan e colaboradores (2013).

Figura 9. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-OCT4 (vermelho) em condição de cultivo normal -mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias). Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada tratamento. É possível notar a alta expressão de OCT4 nas células controle pela grande quantidade de vermelho no núcleo. Enquanto, o tratamento causou redução nesta marcação.

Gráfico 1. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação do OCT4. (A): Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Quantificação da marcação do OCT4 em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em CTE

submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12). Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney(**** $p < 0,0001$).

Figura 10. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoeschst 33342 e anti-OCT4 (vermelho) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação. Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.

Adicionalmente à avaliação do principal marcador de pluripotência, prosseguimos analisando alguns marcadores da TEM, estes foram avaliados tanto qualitativa, quanto quantitativamente, a fim de verificar a participação destes ao longo da formação de PEH.

Em relação ao marcador SNAIL/SLUG foi possível observarmos o aumento de sua intensidade com o processo de diferenciação hematopoética quando comparado à condição controle (Figura 11 e Gráfico 2). A avaliação temporal destes ao longo do tempo evidenciou um aumento substancial no 12º dia da diferenciação (Figura 12). Esses dados são coerentes aos encontrados por meio da análise da expressão gênica, no qual observamos expressão significativamente maior de SNAIL e SLUG para a condição tratada em relação a controle, tanto para o 4º, quanto para o 8º dia (Gráfico 3).

A superfamília de fatores de transcrição Snail é dividida entre outras duas subfamílias: Snail e Scratch, sendo a subfamília Snail constituída de três membros (SNAI1, SNAI2 e SNAI3) (Barrallo-Gimeno & Nieto, 2005). As proteínas SNAI2 contêm um domínio chamado Slug (que também é utilizado para a designação dessa proteína em específico) cuja função ainda permanece desconhecida (Dominguez *et al.*, 2003).

Os fatores Snail são conhecidos como repressores transcricionais que atuam durante o processo de TEM (Hemavathy *et al.*, 2000). Sua ativação pode ser desencadeada por uma série de moléculas de sinalização, dentre elas a família BMP, que inclui o BMP4 que se faz presente durante a maior parte do ensaio de diferenciação (Barrallo-Gimeno & Nieto, 2005).

Figura 11. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-SNAIL/SLUG (vermelho) em condição de cultivo normal -mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias). Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada

tratamento. É possível notar o aumento na expressão do SNAIL/SLUG pela intensidade de vermelho na imagem com o tratamento.

Figura 12. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoeschst 33342 e anti-Snail/Slug (verde) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação. Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.

Gráfico 2. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação do Snail/Slug. (A): Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Quantificações da marcação do Snail/Slug em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em

CTE submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12). Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney(* $p < 0,05$).

Gráfico 3. Níveis de expressão gênica do SNAIL e SLUG. Representação gráfica dos níveis de expressão relativa do SNAIL (A) e SLUG (B) por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

A avaliação de E-caderina, sabidamente envolvida na TEM, revelou que no 4º dia da diferenciação hematopoética ocorre redução significativa da intensidade média deste marcador em comparação ao grupo controle (Figura 13 e Gráfico 4. A). A E-caderina é uma proteína transmembrânica que possui um domínio citoplasmático no qual se complexa com a β -catenina (Orsulic *et al.*, 1999). Uma vez desfeito esse complexo há um aumento nos níveis de β -catenina circulante que pode se acumular no núcleo e ativar genes responsivos à via Wnt (Cavallo *et al.*, 1997).

Contudo alguns estudos apontam que esse mecanismo ocorre de uma forma contextual, quando as células estão comprometidas na ativação da via Wnt (Hendriksen *et al.*, 2008 e McCrea *et al.*, 2015). Um dos exemplos mais bem caracterizados dessa

associação é durante a TEM em que a via Wnt é ativada pela β -catenina em resposta à regulação negativa da E-caderina durante a formação da linha primitiva (Cirunda & Rossant, 2001).

Apesar dos estudos apontarem a E-caderina como um regulador do tráfego intracelular de moléculas relacionadas à indução da TEM (Bryant *et al.*, 2005), curiosamente observamos em nossos achados uma possível translocação dessa proteína para o núcleo evidenciada pelas nossas imagens e pela intensidade de sua marcação que se mostra mais elevada nesse compartimento nas células diferenciadas comparada ao citoplasma (Gráfico 4.B). Contudo é necessário a realização de estudos mais profundos para verificar se a E-caderina de fato pode se translocar ao núcleo e regular a transcrição gênica durante a TEM.

Além disso, ao avaliar a intensidade ao longo do ensaio, verificamos que a redução observada até o dia 4 é recuperada no 8º dia e praticamente se mantém até o 12º dia (Figura 14 e Gráfico 4). Adicionalmente, ao comparar os níveis de expressão gênica ao grupo controle confirmamos a regulação negativa de E-caderina (Gráfico 4. D). Acreditamos que esse efeito esteja sendo mediado pela ação da família de fatores de transcrição Snail/Slug, visto que Snail tem como alvo transcricional a E-caderina, que compartilha em suas regiões promotoras sequências E-box (Peinado *et al.*, 2007).

Figura 13. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-E-caderina (vermelho) em condição de cultivo normal - mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias). Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada tratamento. É possível notar a alta expressão de E-caderina nas células controle pela grande quantidade de vermelho na imagem. Enquanto, o tratamento causou redução nesta marcação.

Figura 14. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoeschst 33342 e anti-E-caderina (verde) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação. Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada

tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.

Gráfico 4. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação da E-caderina e dos seus níveis de expressão gênica. (A) Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Comparação entre a média da intensidade da E-caderina no citoplasma e no núcleo das células da linhagem H9-GFP diferenciadas. (C): Quantificações da marcação da E-caderina em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em CTE submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12). (D): Representação gráfica dos níveis de expressão relativa da E-caderina por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

As imagens de imunofluorescência mostram que durante a diferenciação as CTE passam a expressar maior intensidade de N-caderina (Figura 15), e que esta intensidade foi crescente ao longo do tempo, principalmente após a adição do VEGF no meio de cultura (Figura 16). Entretanto, quando avaliamos a nível transcricional, verificamos que a condição de diferenciação apresenta maior expressão de N-caderina do que o controle, contudo observamos que o 8º dia apresenta menor nível quando comparado ao 4º dia (Gráfico 5).

Figura 15. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-N-Caderina (vermelho) em condição de cultivo normal - mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias). Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada tratamento. É possível notar o aumento na expressão de N-caderina pela intensidade de vermelho na imagem com o tratamento.

Figura 16. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoeschst 33342 e anti-N-caderina (vermelho) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação. Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.

Gráfico 5. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação da N-caderina e dos seus níveis de expressão gênica. (A) Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Quantificações da marcação da N-caderina em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em CTE submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12). (C): Representação gráfica dos níveis de expressão relativa da E-caderina por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

A expressão da N-caderina está envolvida na gastrulação, período embrionário onde há formação da mesoderme (Peinado *et al.*, 2007). Sua produção está diretamente correlacionada com a perda do fenótipo epitelial (Thiery, 2002). Especificamente, a diminuição da E-caderina é equilibrada pelo aumento da expressão da N-caderina, que altera as propriedades aderentes das células (Wheelock *et al.*, 2008; Yilmaz & Christofori, 2009).

Em relação a Vimentina, apesar de também ser um alvo do Snail (Nieto, 2002) e ter o aumento de sua expressão associada à TEM e a uma maior capacidade migratória (Battaglia *et al.*, 2018), não verificamos alterações na intensidade de marcação no 4º dia de diferenciação da linhagem H9 (Figura 17 e Gráfico 6. A). No entanto, a intensidade da marcação de Vimentina apresenta uma tendência de elevação ao longo do ensaio com a linhagem H1 (Gráfico 6. B).

Figura 17. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-VIMENTINA (vermelho) em condição de cultivo normal -mTser (controle) e após o processo de diferenciação celular (4 dias). Essas células foram mantidas em cultura, em monocamada, por 4 dias em mTser (controle) ou com meio indutor de diferenciação. Ao final deste período, as células foram fixadas, marcadas

e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico de cada tratamento. Apesar de conseguirmos detectar esse marcador não há uma diferença na sua intensidade entre as células controle e o tratamento.

Figura 18. Fotomicrografias da linhagem H1 marcadas com Hoeschst 33342 e anti-Vimentina (vermelho) cultivadas em meio indutor ao longo do ensaio de diferenciação. Nos ensaios celulares com as CTE da linhagem H1 avaliamos a marcação apenas de células cultivadas em meio indutor em diferentes tempos (dias 1, 2, 4, 8 e 12). Em cada tempo as células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos.

Gráfico 6. Quantificações da mediana da intensidade total para a marcação da Vimentina. (A): Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um

grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no dia 4. (B): Quantificações da marcação da Vimentina em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H1 apenas em CTE submetidas à diferenciação em diferentes tempos (Dias 1, 2, 3, 8 e 12).

4.3 Formação de progenitores endoteliais hemogênicos

Durante o desenvolvimento as células hematopoéticas e endoteliais surgem em paralelo a partir dos mesmos precursores conhecidos como progenitores endoteliais hemogênicos (PEH) (Kitajima *et al.*, 2016). Sendo assim, tivemos a atenção de analisar os eventos morfogenéticos envolvidos na diferenciação das CTE em células da linhagem mesodermal e formação dos PEH na primeira etapa do nosso ensaio de diferenciação.

Até o quarto dia do nosso ensaio de diferenciação, além do tratamento transiente com GSKi, que promove a diferenciação endotelial e hematopoética em CTE *in vitro* (Woll *et al.*, 2008), as células também foram estimuladas com BMP4 e VEGF, fatores relacionados à indução mesodermal em CTE e formação de PEH *in vitro* (Kitajima *et al.*, 2016 e Pick *et al.*, 2007).

As imagens de diferenciação do quarto dia evidenciaram expressão de CD34 nas células formando uma rede, principalmente nas regiões de maior justaposição celular (Figura 19). Este resultado foi confirmado pela avaliação da expressão gênica de CD34, via qPCR, que mostrou-se completamente ausente nas CTE controle quando comparado ao estado diferenciado (Gráfico 7. A).

Figura 19. Formação de PEH no quarto dia do ensaio de diferenciação. Fotomicrografias do ensaio de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP no 4º e 8º dia, adquirida com objetiva de 10 X em sistema de HCS. Formação de estruturas proteicas em rede positivas para o marcador CD34 após o tratamento das CTE com BMP4 e VEGF. Em azul temos a marcação do núcleo com Hoechst 33342 (A), em verde a fluorescência da CTE da linhagem H9-GFP (B), em vermelho a marcação do CD34 (C) e a sobreposição dessas imagens (D).

A via Wnt/ β -catenina possui um papel fundamental no desenvolvimento (Clevers & Nusse, 2012), sua ativação está intimamente associada à perda de pluripotência e, consequente, diferenciação das CTE (Domínguez *et al.*, 2003) que, pode ser mediada pela inibição seletiva da enzima GSK3 (Duinhouwer *et al.*, 2015). Ao inibir seletivamente a GSK3 ocorre acúmulo nuclear de β -catenina que, por sua vez, age como um sinal de transdução regulando a expressão de alvos genéticos (Tan *et al.*, 2013 e Kitajima *et al.*, 2016). Esse sinal, combinado com outros fatores, pode mediar o desenvolvimento de

células hematopoéticas *in vitro* (David *et al.*, 2005). Nesse contexto, temos o BMP4 associado à indução de células à linhagem mesodérmica (Drukker *et al.*, 2012) e, o VEGF capaz de aumentar os níveis dos transcritos de marcadores endoteliais como, por exemplo, o CD34 (Tan *et al.*, 2013).

Avaliamos também os níveis de expressão gênica do marcador MIXL1 (gráfico 7. B). Os resultados evidenciaram que o processo de diferenciação implica no aumento significativo (2,5 vezes) de MIXL1 em relação à condição controle no quarto dia, e que este nível de expressão é menor no oitavo dia, deixando de ser estatisticamente significativo.

Gráfico 7. Expressão gênica dos PEH. Representação gráfica dos níveis de expressão relativa do CD34 (A) e MIXL1 (B) por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

O indutor de mesoderme em xenopus-like 1 (MIXL1, do inglês, *mesoderm inducer in xenopus like1*) é um fator de transcrição de grande relevância para o início da especificação embrionária da mesoderme (Raymond *et al.*, 2014). A expressão de MIXL1

em células-tronco embrionárias conduz essas células ao destino mesodérmico com a formação de células progenitoras de potencial hematopoético (Willey *et al.*, 2006). Estudos genéticos apontam o MIXL1 como um regulador da hematopoese que surge através da diferenciação de células embrionárias (Glaser *et al.*, 2006).

Esse fator de transcrição é induzido pela família de proteínas TGF- β , em cujo BMP4 é um dos membros (Mead *et al.* 1998; Zhang *et al.*, 2008; Raymond *et al.*, 2014). Em mamíferos, essa família de proteínas compreende de 24 ligantes que têm como correspondentes receptores transmembrânicos de classe I e II. Basicamente, após a ligação do receptor tipo II há uma fosforilação do receptor tipo I que por sua vez fosforila um conjunto de proteínas SMADs (Feng & Derynck, 2005; Raymond *et al.*, 2014). Uma vez fosforilados, estes fatores de transcrição regulam a expressão de genes alvo, dentre eles o MIXL1 (Feng & Derynck, 2005). Contudo por conta da redundância entre os ligantes, acredita-se que a ativação do MIXL1 possa ocorrer por diferentes mecanismos (Xi *et al.*, 2011; Yamazaki *et al.*, 2011).

4.4 Diferenciação hematopoética dos progenitores endoteliais hemogênicos

Na segunda etapa do nosso ensaio de diferenciação seguimos com a estimulação das CTE, dessa vez com um coquetel de citocinas contendo fatores-chave, como BMP4, SCF, FLT3L, IL-3, IL-6 e G-CSF já descritos na literatura para a geração de células hematopoéticas *in vitro* (Kim *et al.*, 2017). Para a linhagem H9, foram avaliados os marcadores CD34 e CD43 nos dias 8 e 12 de indução e o marcador CD43 e CD45 no dia 12, comparados às respectivos controles. Para a linhagem H1 avaliamos os marcadores CD34, CD43 e CD45 longitudinalmente nos dias 1, 2, 4, 8 e 12.

Em nossos ensaios com as CTE da linhagem H9-GFP observamos que nosso tratamento contribuiu para o aparecimento de células de morfologia hematopoéticas não

aderentes. Através das imagens de imunofluorescência vimos que essas células apresentavam o marcador CD43 (Figura 20).

Figura 20. Fotomicrografias da linhagem H9-eGFP marcada com Hoechst 33342 (azul), eGFP (verde) e anti-CD43 (vermelho) cultivadas em meio indutor nos dias 8 e 12 do ensaio de diferenciação. Comparação apenas de células submetidas à diferenciação nos dias 8 e 12. Nos respectivos tempos essas células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico.

Utilizamos o software MetaXpress para quantificar a porcentagens de células CD43⁺ que aumentam no 12º dia de diferenciação (Gráfico 8. A). Por uma outra abordagem, utilizando o software CellProfiler demonstramos também que a intensidade do marcador CD43 nas células diferenciadas aumenta significativamente do dia 8 ao dia 12 (Gráfico 8. B-C). O CD43 é encontrado em todos os tipos de progenitores clonogênicos do sangue (Vodyanik *et al.*, 2006). Através do CD43 é possível discriminar dentre as células endoteliais CD34⁺ quais têm o potencial de se diferenciar em vasculatura (CD43⁻) ou células sanguíneas (CD43⁺) (Choi *et al.*, 2011; Slukvin, 2013).

Observamos a marcação do CD45 (Gráfico 8. D) apenas no 12º do ensaio de diferenciação assim como o aparecimento de células progenitoras hematopoéticas $CD43^+CD45^+$ (Gráfico 8. E). A aquisição do CD45 é um marco no comprometimento de células progenitoras com a linhagem hematopoética (Vodyanik *et al.*, 2006). Sendo assim o aparecimento desse marcador nas células geradas em nosso ensaio nos dá um indicativo de sucesso na indução de CTE em células hematopoéticas. Na figura 21 demonstramos células progenitoras hematopoéticas geradas no nosso ensaio de diferenciação.

Gráfico 8. Análises quantitativas das células geradas do ensaio de diferenciação no 8º e 12º dia. Gráficos representativos referentes à análises quantitativas das células geradas nos ensaios de diferenciação realizados com CTE da linhagem H9-GFP. (A): Comparação entre um grupo controle (CTE cultivadas em mTeSR) e um grupo diferenciado (CTE submetidas à diferenciação) das porcentagens de células positivas para o marcador CD43. (B): Mediana da intensidade de marcação do CD43 em células diferenciadas no 8º e 12º dia do ensaio de diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney(*p<0,05). (C): Porcentagem de células CD34+CD43+ no 8º e 12º dia de diferenciação. (D): Porcentagem de células CD45+ no 12º dia de diferenciação. (E): Porcentagem de células CD43+CD45+ no 12º dia de diferenciação.

Figura 21. Fotomicrografias da linhagem H1 marcada com Hoechst 33342 (azul), anti-CD43 (vermelho) e anti-CD45 (verde) cultivadas em meio indutor no 12º dia do ensaio de diferenciação. Essas células foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico.

Para o ensaio de diferenciação utilizando a CTE da linhagem H1, avaliamos a porcentagem de células com diferentes fenótipos geradas. Demonstramos por meio de análises quantitativas baseadas em abordagens de HCS que nosso ensaio de diferenciação foi eficiente na geração de células endoteliais ($CD34^+CD43^-CD45^-$) (Gráfico 9. A). Muitos trabalhos vêm demonstrando o potencial hematopoético dessas células *in vitro* (Woll *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2010; Pang *et al.*, 2013; Kitajima *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2017;).

Observamos que no 4º dia do ensaio há uma pequena fração de células $CD34^+CD43^+$ (~1%) e que a frequência das mesmas aumenta no dia 8 (~3,4%) e volta a

cair no dia 12 (~1,5%) (Gráfico 9. B). Diferentemente as células hematopoéticas CD43⁺ surgem também no dia 4 (~1%) e aumentam progressivamente nos dias 8 (~7%) e 12 (~10%) (Gráfico 9. C). Vanhee e colaboradores (2015) demonstraram através de ensaios funcionais que essas células CD34⁺CD43⁺ consistem em população de células progenitoras hematopoéticas multipotentes heterogênea, com o potencial de gerar células da linhagem mielóide, eritróide, megacariocítica e granulocítica. Contudo outros autores reportam que dentre esse grupo de células, existem alguns subtipos com o potencial linfomielóide *in vitro* (Salvagiotto *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2009; Choi *et al.*, 2011).

Assim como nos ensaios com as CTE da linhagem H9-GFP, notamos que no 12º dia há o aparecimento de células progenitoras CD43⁺CD45⁺ (Gráfico 9. D) bem como células hematopoéticas maduras CD45⁺ (Gráfico 9. E). Ao adquirir a expressão do CD45, essas células reduzem seu potencial à geração de macrófagos, eritrócitos e megacariócitos o que sugere que a aquisição do CD45 restringe o potencial de diferenciação das células progenitoras hematopoéticas (Vanhee *et al.*, 2015).

Sendo assim, em linha com a literatura sugerimos que no nosso ensaio de diferenciação formamos um prospectivo endotélio hemogênico (CD34⁺) no qual emergem células progenitoras hematopoéticas CD34⁺CD43⁺ por volta do 4º dia de diferenciação. Estas por sua vez dão origem à células hematopoéticas CD43⁺ que progressivamente adquirem a marcação do CD45 ao passo que se tornam células hematopoéticas maduras.

Percebemos que nos ensaios realizados com as CTE da linhagem H1, o rendimento na geração de células progenitoras *in vitro* foi um pouco maior comparado à linhagem H9-GFP. Em seu trabalho Choi e colaboradores (2009) também demonstrou variações na eficiência de diferentes linhagens de CTE em se diferenciar em células

progenitoras hematopoéticas na qual a linhagem H1 se destaca para esta finalidade. Mesmo compartilhando das propriedades de pluripotência, cada linhagem de CTE carrega consigo fatores intrínsecos ainda desconhecidos que podem interferir no seu potencial de diferenciação *in vitro* (Chen *et al.*, 2008).

Gráfico 9. Porcentagem de células geradas no ensaio de diferenciação. Gráficos representativos referentes às quantificações realizadas pelo softwares MetaXpress das porcentagens de células geradas nos ensaios de diferenciação realizados nas CTE da linhagem H1 no 4º, 8º e 12º dia. (A): CD34⁺CD43⁻CD45⁻. (B): CD34⁺CD43⁺CD45⁻. (C): CD34⁻CD43⁺CD45⁻. (D): CD34⁻CD43⁺CD45⁺. (E): CD34⁻CD43⁻CD45⁺. (F): Projeção das frequências de todos os fenótipos celulares observados ao longo do ensaio.

As primeiras células sanguíneas surgem na região mesodermal do saco vitelino durante a hematopoese primitiva (Yamane *et al.*, 2018). No entanto as células endodermis deste anexo embrionário possuem um papel crucial nesse processo por dar suporte às células progenitoras mesodermis no seu comprometimento com a linhagem hematopoética (Palis *et al.*, 1995; Bielinska *et al.*, 1999; Dyer *et al.*, 2001).

Apesar de utilizarmos um sistema de diferenciação em monocamada, observamos a formação de estruturas tridimensionais de células agregadas (que chamamos aqui de “saco vitelino-like”) de onde, aparentemente emergem células hematopoéticas (Figura 22).

Figura 22. Fotomicrografias da linhagem H1 marcada com Hoechst 33342 (azul), anti-CD34 (verde) e anti-CD43 (vermelho) após 12 dias submetidas à diferenciação. Essas células foram induzidas à diferenciação, e no 12º dia elas foram fixadas, marcadas e imageadas com objetiva de 10 X, para então serem analisadas por meio do CellProfiler para a aquisição dos dados quantitativos que deram origem ao perfil fenotípico. É possível observar a formação de estruturas tridimensionais (saco vitelino-like) por onde emergem células hematopoéticas.

As primeiras células sanguíneas surgem na região mesodermal do saco vitelino durante a hematopoese primitiva (Yamane *et al.*, 2018). No entanto as células endodermais deste anexo embrionário possuem um papel crucial nesse processo por dar suporte às células progenitoras mesodermas no seu comprometimento com a linhagem hematopoética (Palis *et al.*, 1995; Bielinska *et al.*, 1999; Dyer *et al.*, 2001).

Tem sido reportado na literatura que o surgimento dessas células endodermais está associado à expressão de uma família de fatores de transcrição altamente conservada, o GATA (Hosoya-Ohmura *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2007; Bai *et al.*, 2013). Sabe-se que três (GATA1/2/3), dos seis membros que constituem esse grupo de proteínas, são expressos em células da linhagem hematopoética enquanto, o GATA4/5/6 estão associados à células endodermis e mesodermis (Hosoya-Ohmura *et al.*, 2006; Xuan & Sussel, 2016).

Mesmo não tendo uma associação direta com a maturação de células hematopoéticas, em nosso trabalho pudemos observar uma expressão considerável dos genes GATA4 e GATA6 nas células geradas no nosso ensaio que parece aumentar ao longo do experimento quando comparamos o 4º e 8º dia de diferenciação (Gráfico 10).

Gráfico 10. Níveis de expressão gênica do GATA4 e GATA6. Representação gráfica dos níveis de expressão relativa do GATA4 (A) e GATA6 (B) por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

Durante a diferenciação *in vitro* de CTE o GATA4 e GATA6 estão associados à marcadores de estruturas extra embrionárias como a endoderme visceral (Lee *et al.*, 2013). Em seu trabalho Pierre e colaboradores (2009) observam uma atenuação na expansão de células hematopoéticas derivadas de CTE *in vitro* quando esses genes são silenciados.

Assim acreditamos que a expressão desses genes pode ser um reflexo da mimetização *in vitro* de eventos morfogenéticos que ocorrem durante o desenvolvimento, sobretudo a hematopoese primitiva e contribuem de forma secundária para a maturação de células hematopoéticas. Dessa forma, no presente trabalho estabelecemos um método de geração de células hematopoéticas *in vitro* viável para a realização de análises quantitativas por meio de abordagens em HCS.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Em suma, no presente trabalho estabelecemos um ensaio de diferenciação utilizando células-tronco embrionárias humanas (CTEh) como modelo para o estudo do desenvolvimento do sistema hematopoético por meio de microscopia quantitativa. O referido protocolo possui seus componentes químicos bem definidos o que torna possível investigar com mais precisão os fatores extrínsecos envolvidos na indução do processo de diferenciação. Dessa forma registramos a dinâmica de mecanismos moleculares que estão diretamente envolvidos nas diferentes etapas do desenvolvimento hematopoético.

Com isso podemos sugerir que nosso método de análise consiste em uma abordagem operativa e de grande valia para o estudo do desenvolvimento do sistema hematopoético com um robusto poder de análise. Este trabalho representa um passo inicial para a realização de *screenings* funcionais em larga escala em cujas informações geradas poderão contribuir significativamente para a compreensão de fatores envolvidos no comprometimento de CTEh com a linhagem hematopoética e consequentemente impactar positivamente para o avanço na geração de células *in vitro* com possíveis aplicações clínicas, um dos grandes objetivos da medicina regenerativa.

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, T., Matsuoka, Y., Nagao, Y., Sonoda, Y., & Hanazono, Y. (2017). CD34-negative hematopoietic stem cells show distinct expression profiles of homing molecules that limit engraftment in mice and sheep. *International Journal of Hematology*,
- Abraham, V. C., Taylor, D. L., & Haskins, J. R. (2004). High content screening applied to large-scale cell biology. *Trends in Biotechnology*, 22(1), 15–22.
- Al-Drees, M. A., Yeo, J. H., Boumelhem, B. B., Antas, V. I., Brigdenm K. W. L., Colone, C. K., & Fraser, S. T. (2015) Making Blood: The Haematopoietic Niche throughout Ontogeny. *Stem Cells International*.
- Ali, M. A. E., Fuse, K., Tadokoro, Y., Hoshii, T., Ueno, M., Kobayashi, M., ... Hirao, A. (2017). Functional dissection of hematopoietic stem cell populations with a stemness-monitoring system based on NS-GFP transgene expression. *Scientific Reports*, 7(1), 1–12.
- Ang, M. L. T., & Pethe, K. (2016). Contribution of high-content imaging technologies to the development of anti-infective drugs. *Cytometry Part A*, 89(8), 755–760.
- Attar, A. (2014). Changes in the Cell Surface Markers During Normal Hematopoiesis: A Guide to Cell Isolation. *Global Journal of Hematology and Blood Transfusion*, (1), 20–28.
- Baron, M. H., Isern, J., Fraser, S. T. (2012). The embryonic origins of erythropoiesis in mammals. *Blood*, 119(21), 4828–37.
- Barrallo-Gimeno, A. (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development*, 132(14), 3151–3161.
- Battaglia, R. A., Delic, S., Herrmann, H., & Snider, N. T. (2018). Vimentin on the move : new developments in cell migration [version 1 ; referees : 2 approved] Referee Status : *F1000Research*, 7(0), 1–10.
- Beers, J., Gulbrason, D. R., George, N., Siniscalchi, L. I., Jones, J., ... Chen, G. (2012). Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nature Protocols*, 7(11), 2029–2040.
- Bhatia, M., Wang, J. C. Y., Kapp, U., Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 5320–5325.
- Bielinska, M., Narita, N., & Wilson, D. B. (1999). Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. *International Journal of Developmental Biology*, 43(3), 183–205.

- Bigas, A., & Waskow, C. (2016). Blood stem cells: from beginning to end. *Development*, 143(19), 3429–3433.
- Bommi, P. V., Ravindran, S., Raychaudhuri, P., & Bagchi, S. (2018). DDB2 regulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) in Oral / Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, 9(78), 34708–34718.
- Boulais, P. E., & Frenette, P. S. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, 125(17), 2621–2629.
- Boutros, M., Heigwer, F., & Laufer, C. (2015). Microscopy-Based High-Content Screening. *Cell*, 163(6), 1314–1325.
- Bray, M.-A., Carpenter, A., & Imaging Platform, Broad Institute of MIT and Harvard. (2004). Advanced Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening and Analysis. *Assay Guidance Manual*, 1–33.
- Bryant, D. M., Wylie, F. G., & Stow, J. L. (2005). Regulation of Endocytosis , Nuclear Translocation , and Signaling of Fibroblast Growth Factor Receptor 1 by E-Cadherin, 16(January), 14–23.
- Buggenthin, F., Marr, C., Schwarzfischer, M., Hoppe, P. S., Hilsenbeck, O., Schroeder, T., & Theis, F. J. (2013). An automatic method for robust and fast cell detection in bright field images from high-throughput microscopy. *BMC Bioinformatics*, 14(1).
- Cavallo, R., Rubensteint, D., & Peifer, M. (n.d.). Armadillo and dTCF: a marriage made in the nucleus Robert Cavallo*, David Rubensteint and Mark Peifer, 459–466.
- Cerdan, C., McIntyre, B. A. S., Mechael, R., Levadoux-Martin, M., Yang, J., Lee, J. B., & Bhatia, M. (2012). Activin A Promotes Hematopoietic Fated Mesoderm Development Through Upregulation of Brachyury in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 21(15), 2866–2877.
- Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., & Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*, 102(3), 906–915.
- Chen, K. G., Mallin, B. S., McKay, R. D. G., Robey, P. G. (2014). Human Pluripotent Stem Cell Culture: Considerations for Maintenance, Expansion, and Therapeutics. *Cell Stem Cell*, 14(1), 13-26.
- Chin, C. J., Cooper, A. R., Lill, G. R., Evseenko, D., Zhu, Y., He, C. Bin, ... Crooks, G. M. (2016). Genetic Tagging During Human Mesoderm Differentiation Reveals Tripotent Lateral Plate Mesodermal Progenitors. *Stem Cells*, 34(5), 1239–1250.
- Choi, K. D., Vodyanik, M. a., & Slukvin, I. I. (2009). Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43 +CD45+ progenitors. *Journal of Clinical Investigation*, 119(9), 2818–2829.

- Choi, K.-D., Vodyanik, M., & Slukvin, I. I. (2011). Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 6(3), 296–313.
- Chrysanthou, S., Senner, C. E., Woods, L., Fineberg, E., Okkenhaug, H., Burge, S., ... Hemberger, M. (2018). A Critical Role of TET1/2 Proteins in Cell-Cycle Progression of Trophoblast Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 10(4), 1355–1368.
- Ciruna, B., & Rossant, J. (2001). Mesoderm Cell Fate Specification and Morphogenetic Movement at the Primitive Streak, 1, 37–49.
- Clément, F., Grockowiak, E., Zylbersztejn, F., Fossard, G., Gobert, S., Maguer-satta, V., ... Inserm, U. (2017). Stem cell manipulation , gene therapy and the risk of cancer stem cell emergence. *Stem cell investigation*, 1–15.
- Clevers, H., & Nusse, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling and disease. *Cell*, 149(6), 1192–1205.
- Conrad, C., & Gerlich, D. W. (2010). Automated microscopy for high-content RNAi screening. *Journal of Cell Biology*, 188(4), 453–461.
- Daniel, M. G., Pereira, C. F., Lemischka, I. R., & Moore, K. A. (2016). Making a Hematopoietic Stem Cell. *Trends in Cell Biology*, 26(3), 202–214.
- Desai, N., Rambhia, P., & Gishto, A. (2015). Human embryonic stem cell cultivation: Historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 1–15.
- DiGiusto, D., Chen, S., Combs, J., Webb, S., Namikawa, R., Tsukamoto, A., ... Galy, A. H. (1994). Human fetal bone marrow early progenitors for T, B, and myeloid cells are found exclusively in the population expressing high levels of CD34. *Blood*, 84(2), 421–432.
- Ditadi, A., Sturgeon, C. M., & Keller, G. (2016). A view of human haematopoietic development from the Petri dish. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(1), 56–67.
- Domínguez, D. (2003). Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Molecular and Cellular Biology*, 23(14), 5078–5089.
- Domínguez, D., Setís, B. M., Soler, A. V., Guaita, S., Grueso, J., Porta, M., ... de Herreros, A. G. (2003). Phosphorylation regulates the subcellular location and activity of the snail transcriptional repressor. *Molecular and Cellular Biology*, 23(14), 5078–5089.
- Dravid, G., Ye, Z., Hammond, H., Chen, G., Pyle, A., Donovan, P., ... Cheng, L. (2005). Defining the Role of Wnt/ β -Catenin Signaling in the Survival, Proliferation, and Self-Renewal of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*.

- Drukker, M., Tang, C., Ardehali, R., Rinkevich, Y., Seita, J., Lee, A. S., ... Soen, Y. (2012). Isolation of primitive endoderm, mesoderm, vascular endothelial and trophoblast progenitors from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 30(6), 531–542.
- Duinhouwer, L. E., Tüysüz, N., Rombouts, E. W. J. C., Ter Borg, M. N. D., Mastrobattista, E., Spanholtz, J., ... Braakman, E. (2015). Wnt3a protein reduces growth factor-driven expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells in serum-free cultures. *PLoS ONE*, 10(3), 1–13.
- Dyer, M. A., Farrington, S. M., Mohn, D., Munday, J. R., & Baron, M. H. (2001). Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo. *Development*, 128, 1717–1730.
- Eilken, H. M., Nishikawa, S. I., & Schroeder, T. (2009). Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature*, 457(7231), 896–900.
- Eilken, H. M., Nishikawa, S. I., & Schroeder, T. (2009). Continuous single-cell imaging of blood generation from haemogenic endothelium. *Nature*, 457(7231), 896–900.
- Ema, H., Morita, Y., & Suda, T. (2014). Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells Hideo. *Experimental Hematology*, (42), 74-82.
- Feng, X.-H., & Derynck, R. (2005). Specificity and Versatility in Tgf-B Signaling Through Smads. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 659–693.
- Ferkowicz, M. J., & Yoder, M. C. (2005). Blood island formation: Longstanding observations and modern interpretations. *Experimental Hematology*, 33(9 SPEC. ISS.), 1041–1047.
- Feyen, D. A. M., Gaetani, R., Doevendans, P. A., & Sluijter, J. P. G. (2016). Stem cell-based therapy: Improving myocardial cell delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 106, 104–115.
- Fontana, F., Raimondi, M., Marzagalli, M., Sommariva, M., Limonta, P., & Gagliano, N. (2019). CD44 Isoforms Are Differently Expressed in 2D and 3D Cell Cultures of Prostate Cancer Cells.
- Gallacher, L., Murdoch, B., Wu, D. M., Karanu, F. N., Keeney, M., & Bhatia, M. (2000). Isolation and characterization of human CD34(-)Lin(-) and CD34(+)Lin(-) hematopoietic stem cells using cell surface markers AC133 and CD7. *Blood*, 95(9), 2813–2820.
- Glaser, S., Metcalf, D., Wu, L., Hart, A. H., DiRago, L., Mifsud, S., ... Robb, L. (2006). Enforced expression of the homeobox gene Mixl1 impairs hematopoietic differentiation and results in acute myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16460–16465.
- Goodell, M. A., Nguyen, H., & Shroyer, N. (2015). Somatic stem cell heterogeneity: Diversity in the blood, skin and intestinal stem cell compartments. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(5), 299–309.

- Hemavathy, K., Ashraf, S. I., & Ip, Y. T. (2000). Snail/Slug family of repressors: Slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*, 257(1), 1–12.
- Hemavathy, K., Ashraf, S. I., & Ip, Y. T. (2000). Snail/Slug family of repressors: Slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene*, 257(1), 1–12.
- Hendriksen, J., Jansen, M., Brown, C. M., Velde, H. Van Der, Ham, M. Van, Galjart, N., ... Fornerod, M. (2008). Plasma membrane recruitment of dephosphorylated β -catenin upon activation of the Wnt pathway.
- Hosoya-Ohmura, S., Mochizuki, N., Suzuki, M., Ohneda, O., Ohneda, K., & Yamamoto, M. (2006). GATA-4 incompletely substitutes for GATA-1 in promoting both primitive and definitive erythropoiesis in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32820–32830.
- Huber, T. L., Kouskoff, V., Fehling, H. J., Palis, J., & Keller, G. (2004). Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. *Nature*, 432(7017), 625–630.
- Johnson, J. R., Nishioka, M., Chakir, J., Risse, P., Almaghlouth, I., Bazarbashi, A. N., ... Hamid, Q. (2013). IL-22 contributes to TGF- β 1-mediated epithelial-mesenchymal transition in asthmatic bronchial epithelial cells, 1–12.
- Jude, C. D., Gaudet, J., Speck, N., & Ernst, P. (2010). Leukemia and Hematopoietic Stem Cells: Balancing Proliferation and Quiescence. NIH Public Access. *Cell*, 7(5), 586–591.
- Karicheva, O., Rodriguez-vargas, J. M., Wadier, N., Vauchelles, R., Magroun, N., & Tissier, A. (2016). PARP3 controls TGF β and ROS driven epithelial-to-mesenchymal transition and stemness by stimulating a TG2-Snail-E-cadherin axis, 7(39).
- Kaufman, D. S. (2009). Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. *Blood*, 114(17), 3513–3523.
- Keating, S. M., Taylor, D. L., Plant, A. L., Litwack, E. D., Kuhn, P., Greenspan, E. J., ... Kuida, K. (2018). Opportunities and Challenges in Implementation of Multiparameter Single Cell Analysis Platforms for Clinical Translation. *Clinical and Translational Science*, 11(3), 267–276.
- Kennedy, M., & Keller, G. (2007). Development of hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in ES. *Blood*, 12(10), 3521–3528.
- Kim, J. H., Choi, S. C., Park, C. Y., Park, J. H., Choi, J. H., Joo, H. J., ... Lim, D. S. (2016). Transplantation of immortalized CD34+ and CD34-adipose-derived stem cells improve cardiac function and mitigate systemic pro-inflammatory responses. *PLoS ONE*, 11(2), 1–21.
- Kim, S.-J., Jung, J.-W., Ha, H.-Y., Koo, S. K., Kim, E.-G., & Kim, J.-H. (2017). Generation of hematopoietic stem cells from human embryonic stem cells using a

defined, stepwise, serum-free, and serum replacement-free monolayer culture method. *Blood Research*, 52(1), 37.

Kitajima, K., Nakajima, M., Kanokoda, M., Kyba, M., Dandapt, A., Tolar, J., ... Hara, T. (2016) GSK3B inhibition activates the CDXHOX pathway and promotes hemogenic endothelial progenitor differentiation from human pluripotent stem cells. *Experimental Hematology*, 44(1), 68-74.

Krause D. S., Fackler. M. J., Civin, C. I., & May, W. S. (1996). CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 87(1):1–13.

Lacrin, C., Sroczynska, P., Stephenson, C., Allen, T., Kouskoff, V., & Lacaud, G. (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature Letters*, (457), 892-896.

Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196.

Ledran, M. H., Krassowska, A., Armstrong, L., Dimmick, I., Renström, J., Lang, R., ... Lako, M. (2008). Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell Stem Cell*, 3(1), 85–98.

Lee, J. H., Hong, K. S., Mantel, C., Broxmeyer, H. E., Lee, M. R., & Kim, K.-S. (2013). Spontaneously Differentiated *GATA6* -Positive Human Embryonic Stem Cells Represent an Important Cellular Step in Human Embryonic Development; They Are Not Just an Artifact of In Vitro Culture. *Stem Cells and Development*, 22(20), 2706–2713.

Lentjes, M. H. F. M., Niessen, H. E. C., Akiyama, Y., de Bruïne, A. P., Melotte, V., & van Engeland, M. (2016). The emerging role of GATA transcription factors in development and disease. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 18, e3.

Li, X. (2019). Upregulation of syncytin-1 promotes invasion and metastasis by activating epithelial-mesenchymal transition-related pathway in endometrial carcinoma, 31–40.

Lim, W. F., Inoue-Yokoo, T., Tan, K. S., Lai, M. I., & Sugiyama, D. (2013). Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 4(3).

Liu, S., Xu, Y., Zhou, Z., Feng, B., & Huang, H. (2015). Progress and challenges in generating functional hematopoietic stem/progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Cytotherapy*, 17(4), 344–358.

Löser, P., Schirm, J., Guhr, A., Wobus, A. M., & Kurtz, A. (2010). Human embryonic stem cell lines and their use in international research. *Stem Cells*, 28(2), 240–246.

Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Moreira, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C. R., & Belmonte, J. C. I. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 8(2), 223-253.

- Matsuoka, S., Tsuji, K., Hisakawa, H., Xu, M. J., Ebihara, Y., Ishii, T., ... Nakahata, T. (2001). Generation of definitive hematopoietic stem cells from murine early yolk sac and paraaortic splanchnopleures by aorta-gonad-mesonephros region-derived stromal cells. *Blood*, 98(1), 6–12.
- Mattiazzi Usaj, M., Styles, E. B., Verster, A. J., Friesen, H., Boone, C., & Andrews, B. J. (2016). High-Content Screening for Quantitative Cell Biology. *Trends in Cell Biology*, 26(8), 598–611.
- Mccrea, P. D., Maher, M. T., & Gottardi, C. J. (2015). Nuclear Signaling from Cadherin Adhesion Complexes. HHS Public Access, 1–60.
- Mead, P. E., Zhou, Y., Lustig, K. D., Huber, T. L., Kirschner, M. W., & Zon, L. (1998). Cloning of Mix-related homeodomain proteins using fast retrieval of gel shift activities, (FROGS), a technique for the isolation of DNA-binding proteins. *Developmental Biology*, (95), 11252-11256.
- Medvinsky, A., Rybtsov, S., & Taoudi, S. (2011). Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development*, 138(6), 1017–1031.
- Meng, G., Liu, S., Li, X., Krawetz, R., & Rancourt, D. E. (2010). Derivation of human embryonic stem cell lines after blastocyst microsurgery. *Biochemistry and Cell Biology Biochimie et Biologie Cellulaire*, 88(3), 479–490.
- Mikkola, H. A., & Orkin, S. H. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*, (133), 3733-3744.
- Monti, M., Perotti, C., del Fante, C., Cervio, M., & Redi, C. A. (2012). Stem cells: Sources and therapies. *Biological Research*, 45(3), 207–214.
- Naito, A. T., Shiojima, I., Akazawa, H., Hidaka, K., Morisaki, T., Kikuchi, A., & Komuro, I. (2006). Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/B-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *PNAS*, 103(52), 19812-19817.
- Ng, E. S., Azzola, L., Bruveris, F. F., Calvanese, V., Phipson, B., Vlahos, K., ... Elefanty, A. G. (2016). Differentiation of human embryonic stem cells to HOXA + hemogenic vasculature that resembles the aorta-gonad-mesonephros. *Nature Publishing Group*, (December 2015).
- Ng, E. S., Davis, R. P., Azzola, L., Stanley, E. G., & Elefanty, A. G. (2005). Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood*, 106(5), 1601–1603.
- Ng, E. S., Davis, R. P., Hatzistavrou, T., Stanley, E. G., & Elefanty, A. G. (2008). Directed differentiation of human embryonic stem cells as spin embryoid bodies and a description of the hematopoietic blast colony forming assay. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, (SUPPL. 4), 1–23.

- Nieto, M. A. (2002). The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(3), 155–166.
- Nostro, M. C., Cheng, X., Keller, G. M., & Gadue, P. (2008). Wnt, Activin, and BMP Signaling Regulate Distinct Stages in the Developmental Pathway from Embryonic Stem Cells to Blood. *Cell Stem Cell*, 2(1), 60–71.
- Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poepl, A., Jurisica, I., & Dick, J. E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science*, 333(6039), 218–221.
- O'Brien, P. J., & Edvardsson, A. (2017). Validation of a multiparametric, high-content-screening assay for predictive/investigative cytotoxicity: Evidence from technology transfer studies and literature review. *Chemical Research in Toxicology*, 30(3), 804–829.
- Oda, H., Tsukita, S., & Takeichi, M. (1998). Dynamic Behavior of the Cadherin-Based Cell–Cell.pdf, 450, 435–450.
- Orkin, S. H., & Zon, L. I. (2008). Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*, 132(4), 631–644.
- Orsulic, S., Huber, O., Aberle, H., Arnold, S., & Kemler, R. (1999). E-cadherin binding prevents β -catenin nuclear localization and β -catenin / LEF-1-mediated transactivation, 1245, 1237–1245.
- Outten, J. T., Cheng, X., Gadue, P., French, D. L., & Diamond, S. L. (2011). A high-throughput multiplexed screening assay for optimizing serum-free differentiation protocols of human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*, 6(2), 129–142.
- Palis, J. (2014). Primitive and definitive erythropoiesis in mammals. *Frontiers in Physiology*, 5 JAN(January), 1–10.
- Palis, J., Mcgrath, K. E., & Kingsley, P. D. (1995). Initiation of Hematopoiesis and Vasculogenesis in Murine Yolk Sac Explants. *Blood*, 86(1), 156–163.
- Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., & Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development (Cambridge, England)*, 126(22), 5073–5084.
- Pang, S., Wu, Q., Tian, S., Su, P., Bai, Y., Gao, J., ... Zhou, J. (2013). Establishment of a highly efficient hematopoietic differentiation model from human embryonic stem cells for functional screening. *Science China Life Sciences*, 56(12), 1147–1149.
- Park, C., Afrikanova, I., Chung, Y. C., Zhang, W. J., Arentson, E., Fong, G. H., Rosendahl, A., & Choi, K. (2004). A hierarchical order of factors in the generation of FLK1- and SCL-expressing hematopoietic and endothelial progenitors from embryonic stem cells. *Development*, 131(11), 2749–2762.

- Pearson, S., Sroczynska, P., Lacaud, G., & Kouskoff, V. (2008). The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development*, 135(8), 1525–1535.
- Peinado, H., Olmeda, D., & Cano, A. (2007). Snail, ZEB and bHLH factors in tumour progression: An alliance against the epithelial phenotype? *Nature Reviews Cancer*, 7(6), 415–428.
- Perre M., Yoshimoto, M., Huang, L., & Yoder, M. C. (2009). VEGF and IHH Rescue Definitive Hematopoiesis in Gata-4 and Gata-6 Deficient Murine Embryoid Bodies. *Experimental Hematology*, 37(9), 1038-1053.
- Pick, M., Azzola, L., Mossman, A., Stanley, E. G., & Elefanty, A. G. (2007). Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in Serum-Free Medium Reveals Distinct Roles for Bone Morphogenetic Protein 4, Vascular Endothelial Growth Factor, Stem Cell Factor, and Fibroblast Growth Factor 2 in Hematopoiesis. *Stem Cells*, 25(9), 2206–2214.
- Qui, C., Olivier, E. N., Velho, M., & Bouhassira, E. E. (2007). Globin switches in yolk sac-like primitive and fetal-like definitive red blood cells produced from human embryonic stem cells. *Blood*, (111), 2400-2408.
- Rafii, S., Kloss, C. C., Butler, J. M., Ginsberg, M., Gars, E., Lis, R., ... James, D. (2013). Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood*, 121(5), 770–780.
- Raymond, A., Liu, B., Liang, H., Wei, C., Guindani, M., Lu, Y., ... Nagarajan, L. (2014). A role for BMP-induced homeobox gene MIXL1 in acute myelogenous leukemia and identification of type I BMP receptor as a potential target for therapy. *Oncotarget*, 5(24), 12675–12693.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C., Trounson, A., & Bongso, A. (2000). Reubinoff-2000 Embryonic stem cell lines from human blastocysts...pdf, 399–404.
- Risueño, R. M., Sachlos, E., Lee, J. H., Lee, J. B., Hong, S. H., Szabo, E., & Bhatia, M. (2012). Inability of human induced pluripotent stem cell-hematopoietic derivatives to downregulate microRNAs in vivo reveals a block in xenograft hematopoietic regeneration. *Stem Cells*, 30(2), 131–139.
- Rossant, J., & Tam, P. P. L. (2009). Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development*, 136(5), 701–713.
- Rossi, D. J., Seita, J., Czechowicz, A., Bhattacharya, D., Bryder, D., & Weissman, I. L. (2007). Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle*, 6(19), 2371–2376.
- Rout-pitt, N., Farrow, N., Parsons, D., & Donnelley, M. (2018). Epithelial mesenchymal transition (EMT): a universal process in lung diseases with implications for cystic fibrosis pathophysiology, 1–10.

- Salvagiotto, G., Zhao, Y., Vodyanik, M., Ruotti, V., Stewart, R., Thomson, J., ... Slukvin, I. (2009). NIH Public Access. *October*, 36(10), 1377–1389.
- Satterthwaite, A. B., Burn, T. C., Le Beau, M. M., & Ten, D. G. (1992). Structure of the Gene Encoding CD34, a Human Hematopoietic Stem Cell Antigen. *Genomics*, (12), 788–794.
- Sauvageau, G., Iscove, N. N., & Humphries, R. K. (2004). In vitro and in vivo expansion of hematopoietic stem cells. *Oncogene*, 23(43), 7223–7232.
- Schroeder, T. (2010). Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity: Subtypes, Not Unpredictable Behavior. *Cell Stem Cell*, 6(3), 203–207.
- Seita, J., & Weissman, I.L. (2010) Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 2(6), 640–653.
- Shah, S., Huang, X., & Cheng, L. (2014). Concise review: stem cell-based approaches to red blood cell production for transfusion. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(3), 346–55.
- Sidney, L. E., Branch, M. J., Dunphy, S. E., Dua, H. S., & Hopkinson, A. (2014). Concise review: Evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells*, 32(6), 1380–1389.
- Slukvin, I. I. (2013). Deciphering the hierarchy of angiohematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells. *Cell Cycle*, 12(5), 720–727.
- Smith, B. W., Rozelle, S. S., Leung, A., Ubellacker, J., Parks, A., Nah, S. K., ... Murphy, G. J. (2013). The aryl hydrocarbon receptor directs hematopoietic progenitor cell expansion and differentiation. *Blood*, 122(3), 376–385.
- Stella, C. C., Cazzola, M., De Fabritiis, P., De Vincentiis, A., Gianni, A. M., ... Tura, S. (1995). *Hematologica* (80), 367–387.
- Strom, S., Inzunza, J., Grinnemo, K. K., Holmberg, K., Matilainen, E., ... Hovatta, O. (2007). Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. *Human Reproduction*, 22(12), 3051–3058.
- Sugiyama, D., Ogawa, M., Nakao, K., Osumi, N., Nishikawa, S., Nishikawa, S. ichi, ... Tsuji, K. (2007). B cell potential can be obtained from pre-circulatory yolk sac, but with low frequency. *Developmental Biology*, 301(1), 53–61.
- Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., & Suemori, H. (2008). Defining early lineage specification of human embryonic stem cells by the orchestrated balance of canonical Wnt/ -catenin, Activin/Nodal and BMP signaling. *Development*, 135(17), 2969–2979.
- Tan, J. Y., Sriram, G., Rufaihah, A. J., Neoh, K. G., & Cao, T. (2013). Efficient Derivation of Lateral Plate and Paraxial Mesoderm Subtypes from Human Embryonic

Stem Cells Through GSKi-Mediated Differentiation. *Stem Cells and Development*, 22(13), 1893–1906.

Tanaka, N., Takeuchi, T., Neri, Q. V., Sills, E. S., & Palermo, G. D. (2006). Laser-assisted blastocyst dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: Applications and preliminary results in a murine model. *Journal of Translational Medicine*, 4, 1–16.

Tasev, D., Konijnenberg, L. S. F., Amado-Azevedo, J., van Wijhe, M. H., Koolwijk, P., & van Hinsbergh, V. W. M. (2016). CD34 expression modulates tube-forming capacity and barrier properties of peripheral blood-derived endothelial colony-forming cells (ECFCs). *Angiogenesis*, 19(3), 325–338.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454.

Thiery, J. P. (2002). Epithelial–mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature Reviews Cancer*, 2(6), 442–454.

Thiery, J. P., & Sleeman, J. P. (2006). Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7(2), 131–142.

Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J., & Nieto, M. A. (2009). Epithelial–Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell*, 139(5), 871–890.

Thompsom, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Sweergiel, J. J., ... Jones, J. M. (1998). *Science*, (282), 1145–1147.

Tian, X., Hexum, M. K., Penchev, V. R., Taylor, R. J., Shultz, L. D., & Kaufman, D. S. (2009). Bioluminescent imaging demonstrates that transplanted human embryonic stem cell-derived CD34+cells preferentially develop into endothelial cells. *Stem Cells*, 27(11), 2675–2685.

Tober, J., Koniski, A., McGrath, K. E., Vemishetti, R., Emerson, R., De Mesy-Bentley, K. K. L., ... Palis, J. (2007). The megakaryocyte lineage originates from hemangioblast precursors and is an integral component both of primitive and of definitive hematopoiesis. *Blood*, 109(4), 1433–1441.

Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, ... Reubinoff BE. (2008). Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction*, 23(1), 46–53.

Turetsky T, Aizenman E, Gil Y, Weinberg N, Shufaro Y, Revel A, ... Reubinoff BE. (2008). Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Human Reproduction*, 23(1), 46–53.

Ueno, S., Weidinger, G., Osugi, T., Kohn, A. D., Golob, J. L., Pabon, L., ... Murry, C. E. (2007). Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish

and embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(23), 9685–9690.

Vanhee, S., De Mulder, K., Van Caeneghem, Y., Verstichel, G., Van Roy, N., Menten, B., ... Vandekerckhove, B. (2015). In vitro human embryonic stem cell hematopoiesis mimics MYB-independent yolk sac hematopoiesis. *Haematologica*, 100(2), 157–166.

Venkei, Z. G., & Yamashita, Y. M. (2018). Emerging mechanisms of asymmetric stem cell division. *Journal of Cell Biology*, 217(11), 3785–3795.

Vodyanik, M. A., Bork, J. A., Thomson, J. A., Slukvin, I. I., & De, W. (2005). Human embryonic stem cell–derived CD34⁺ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood*, 105(2), 617–626.

Vodyanik, M. a., Thomson, J. a., & Slukvin, I. I. (2006). Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. *Blood*, 108(6), 2095–2105.

Wahlster, L., & Daley, G. Q. (2016). Progress towards generation of human haematopoietic stem cells. *Nature Cell Biology*, 18(11), 111–117.

Wang, C., Tang, X., Sun, X., Miao, Z., Lv, Y., Yang, Y., ... Deng, H. (2012). TGFβ inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human ES cell–derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy. *Cell Research*, 22(1), 194–207.

Wang, Y., & Nakayama, N. (2009). WNT and BMP signaling are both required for hematopoietic cell development from human ES cells. *Stem Cell Research*, 3(2–3), 113–125.

Weissman, I. L., & Shizuru, J. A. (2008). The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood*, 112(9), 3543–3553.

Wheelock, M. J., Shintani, Y., Maeda, M., Fukumoto, Y., & Johnson, K. R. (2008). Cadherin switching. *Journal of Cell Science*, 121(6), 727–735.

Willey, S., Ayuso-Sacido, A., Zhang, H., Fraser, S. T., Sahr, K. E., Adlam, M. J., ... Baron, M. H. (2006). Acceleration of mesoderm development and expansion of hematopoietic progenitors in differentiating ES cells by the mouse Mix-like homeodomain transcription factor. *Blood*, 107(8), 3122–3130.

Woll, P. S., Morris, J. K., Painschab, M. S., Marcus, R. K., Kohn, A. D., Biechele, T. L., ... Kaufman, D. S. (2008). Wnt signaling promotes hemoendothelial cell development from human embryonic stem cells. *Blood*, 111(1), 122–131.

Xi, Q., Wang, Z., Zaromytidou, A. I., Zhang, X. H. F., Tsang, L. F. C., ... Massagué, J. (2011). A poised chromatin platform for TGF-β access to master. *Cell*, 147(7), 1511–1524.

- Xia, X., & Wong, S. T. (2012). Concise review: A high-content screening approach to stem cell research and drug discovery. *Stem Cells*, 30(9), 1800–1807.
- Xu, M. J., Matsuoka, S., Yang, F. C., Ebihara, Y., Manabe, A., Tanaka, R., ... Tsuji, K. (2001). Evidence for the presence of murine primitive megakaryocytopoiesis in the early yolk sac. *Blood*, 97(7), 2016–2022.
- Yamane, T. (2018). Mouse Yolk Sac Hematopoiesis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 6(July), 1–8.
- Yamazaki, S., Ema, H., Karlsson, G., Yamaguchi, T., Miyoshi, H., Shioda, S., ... Nakauchi, H. (2011). Nonmyelinating schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. *Cell*, 147(5), 1146–1158.
- Yang, Z. C., Yi, M. J. I., Ran, N. I., Wang, C., & Fu, P. (2013). Transforming growth factor - β 1 induces bronchial epithelial cells to mesenchymal transition by activating the Snail pathway and promotes airway remodeling in asthma, 1663–1668.
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2009). EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. *Cancer and Metastasis Reviews*, 28(1–2), 15–33.
- Yoshino, T., & Saito, D. (2018). Seminars in Cell & Developmental Biology Epithelial-to-mesenchymal transition – based morphogenesis of dorsal mesentery and gonad. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, (August), 0–1.
- Zambidis, E. T., Peault, B., Park, T. S., Bunz, F., & Civin, C. I. (2005). Hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells progresses through sequential hematoendothelial, primitive, and definitive stages resembling human yolk sac development. *Blood*, 106(3), 860–870.
- Zanella, F., Lorens, J. B., & Link, W. (2010). High content screening: Seeing is believing. *Trends in Biotechnology*, 28(5), 237–245.
- Zhang, P., Li, J., Tan, Z., Wang, C., Liu, T., Chen, L., ... Deng, H. (2008). Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood*, 111(4), 1933–1941.
- Zhang, P., Li, J., Tan, Z., Wang, C., Liu, T., Chen, L., ... Deng, H. (2008). Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood*, 111(4), 1933–1941.
- Zovein, A. C., Hofmann, J. J., Lynch, M., French, W. J., Turlo, K. A., Yang, Y., ... Iruela-Arispe, M. L. (2008). Fate Tracing Reveals the Endothelial Origin of Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 3(6), 625–636.

ANEXOS

7. ANEXOS

7.1 Lista de Primers

GENES	PAR DE PRIMERS	TM (C°)
MIXL1	5'-GTACCCCGACATCCACTTG-3' 5'-GATTTCCTCACTCTGACGCC-3'	61,7 62,3
SNAI1	5'-GGA AGC CTA ACT ACA GCG AG-3' 5'-CAG AGT CCC AGA TGA GCA TTG-3'	61,7 62,3
SNAI2	5'-AGC ATT TCA ACG CCT CCA-3' 5'-GGA TCT CTG GTT GTG GTA TGA C-3'	62,0 62,0
E-caderina	5'-AGGAATTCTTGCTTTGCTAATTCTG-3' 5'-CGAAGAAACAGCAAGAGCAGC-3'	62,0 62,0
N-caderina	5'-CAACGGGGACTGCACAGATG-3' 5'-TGTTTGGCCTGGCGTTCTTT-3'	60,0 60,0
GATA4	5'-CTTGCAATGCGGAAAGAGG-3' 5'-TGCTGGAGTTGCTGGAAG-3'	61,4 61,8
GATA6	5'-AACACAACCTACAGCCTCAG-3' 5'-TCTTGACCCGAATACTTGAGC-3'	61,8 61,8
CD34	5'-GTGTCTACTGCTGGTCTTGG-3' 5'-AGGGTCTTTTGGGAATAGCTC-3'	61,9 61,8
CD43	5'-CACTTCCATCCCATTCTCAG-3' 5'-CATTTCCAGGCAAACAGGC-3'	62,1 61,8
CD45	5'-CGCACAGGAACCTATATCGG-3' 5'-ATGGATCAAGATGTACTGGGC-3'	61,8 61,8

Tabela 1. Lista dos pares de *primers* utilizados para as reações de qPCR.

7.2 Paine de expressão dos genes avaliados

Gráfico 11. Níveis de expressão gênica de todos os genes analisados em nossos experimentos. GATA4 e GATA6. Representação gráfica dos níveis de expressão relativa do GATA4 (A) e GATA6 (B) por qPCR em ensaios de diferenciação realizado nas CTE da linhagem H9-GFP nos dias 4 e 8. Comparação entre um grupo controle (CTR) com CTE cultivadas em mTeSR-1, e um grupo diferenciado (DIF) com CTE submetidas à diferenciação. Aplicação do teste não paramétrico Mann-Whitney (*p<0,05).

7.3 Diferenciação baseada na formação de corpos embrióides

Para o estabelecimento do ensaio de diferenciação hematopoética, utilizando CTE humanas, baseado em análises de imagens através do sistema de HCS, inicialmente, avaliamos o método de formação de corpos embrióides, que apesar de ser bem estabelecido e amplamente utilizado na literatura (Pick *et al.*, 2007; Ng *et al.*, 2005; Ng *et al.*, 2008; Ng *et al.*, 2016) mostrou-se inadequado para nossas avaliações devido a dificuldade de reprodução e análise.

As dificuldades desta metodologia não se restringiram apenas a quantidade de reagentes (citocinas) requeridas para o processo de diferenciação, mas também a necessidade de cultivo e análise em placas de cultivo diferentes. Isto ocorre porque a diferenciação é realizada em placas de 96 poços de fundo em U, porém esta é incompatível com o sistema de aquisição de imagens, sendo necessária a transferência dos corpos embrióides para placas de 96 poços com fundo chato e próprias para imagem (placa preta com fundo transparente).

Nesta, apenas um corpo embrióide era transferido para cada poço da placa, esses nem sempre sobreviviam e promoviam a formação das células hematopoéticas, ademais, cada corpo embrióide se posicionava em pontos aleatórios da placa de cultivo, o que inviabilizou a automação do processo de imagens (devido a aleatoriedade em sua localização) e, conseqüentemente, a análise. Em relação a análise destes, o processo também apresentou uma série de obstáculos, partindo de sua segmentação, isto porque o corpo embrióide consiste em massa celular tridimensional (Figura 23).

Figura 23. Corpsos embrióides de células-tronco embrionárias humanas. As células individualizadas plaqueadas no dia 0 (A) se agregam e formam estruturas tridimensionais ao longo de oito dias (B-I). Imagens referentes ao mesmo poço de uma placa de 96 poços, adquiridas por microscopia de contraste de fases com objetiva de 20X.