UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA

EVERTON DE BRITO OLIVEIRA COSTA

Eficiente produção *in vitro* de células-tronco/progenitoras hematopoéticas a partir da diferenciação de células-tronco embrionárias humanas

RIBEIRÃO PRETO
2016

EVERTON DE BRITO OLIVEIRA COSTA

Eficiente produção *in vitro* de células-tronco/progenitoras hematopoéticas a partir da diferenciação de células-tronco embrionárias humanas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular do Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular.

Área de Concentração: Células-Tronco e Terapia Celular
Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto

2016

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

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Everton de Brito Oliveira
Eficiente produção *in vitro* de células-tronco/progenitoras hematopoéticas a partir da diferenciação de células-tronco embrionárias humanas / Everton de Brito Oliveira Costa; Orientador Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas. – Ribeirão Preto, 2016.
140p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Departamento de Clínica Médica. Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular. Área de concentração: Células-Tronco e Terapia Celular.

1. Diferenciação hematopoética; **2.** Endotélio hemogênico; **3.** Célula-tronco embrionária humana; **4.** Microambiente hematopoético.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Everton de Brito Oliveira Costa

"Eficiente produção *in vitro* de células-tronco/progenitoras hematopoéticas a partir da diferenciação de células-tronco embrionárias humanas".

Tese apresentada ao Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor.
Área de concentração: Células-Tronco e Terapia Celular

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

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

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

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

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador **Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas**, agradeço por ter aberto as portas da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pela oportunidade de me permitir fazer parte do seu grupo de pesquisa, pela confiança e preciosa ajuda para com meu crescimento pessoal e profissional.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular**, por todo apoio durante o desenvolvimento deste trabalho e pela contribuição para com a minha formação profissional. Em especial à secretária **Adriana Maria Teles Fuzaro**, por toda a ajuda com a parte burocrática que sempre realizou com competência e destreza.

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

À minha amiga **Lílian Figueiredo**, parceira de todas as horas, por toda a troca de conhecimento, discussão, amizade, companheirismo, a minha eterna gratidão!!!

À **Fernanda Lima Vilas Boas**, pela amizade e pela parceria no desenvolvimento dos experimentos com animais.

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

Às minhas queridas amigas do Laboratório de Terapia Celular **Patrícia Tozetti, Aline Garcia, Pâmela Tinti**, **Dra. Giuliana Dotoli, Sâmia Rigotto Caruso**, **Taísa Risque Fernandes, Aline Luiza, Karina** e **Priscilla Carnavale**, pela ajuda e pela convivência diária, as quais tornaram o ardor do trabalho diário muito mais prazeroso. Muito obrigado por tudo, meninas!

Às meninas do Laboratório de Citometria de Fluxo **Camila** e **Carmem**, que me suportaram arduamente com meus “milhares de tubos” (rs) para análises de imunofenotipagem e por terem me ensinado muitas coisas sobre citometria. À **Patrícia Bonini**, em especial, o meu muitíssimo obrigado por toda a ajuda no desenvolvimento deste projeto, por todos os ensinamentos e pela amizade!

Às minhas amigas **Luiza Junqueira, Luiza Araújo, Aline Bomfim**, **Marcela Freitas**, **Amanda Mizukami, Júlia Teixeira** e aos meus amigos **Lucas Coelho, Ângelo Caron,**

Robson Amaral e Rafael Biaggio pela companhia diária, apoio e ajuda durante a execução deste trabalho.

À **Dra. Virgínia Picanço** pela amizade, pelas discussões e por toda a ajuda durante o planejamento e execução dos experimentos.

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

À **Dra. Simone Kashima**, pela amizade e pela preciosa ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Transferência Gênica, em especial ao **Lucas Eduardo Botelho**, pela amizade e por toda a ajuda com os experimentos com animais.

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

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

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

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

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

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

Charles Chaplin

RESUMO

COSTA, E. B. O. **Eficiente produção *in vitro* de células-tronco/progenitoras hematopoéticas a partir da diferenciação de células-tronco embrionárias humanas.** Tese (Doutorado) – Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2016. 138f.

O transplante de células-tronco hematopoéticas (CTHs) é o tipo mais bem-sucedido de terapia celular realizado até os dias atuais. No entanto, apesar do sucesso e da relevância clínica das CTHs isoladas a partir de fontes adultas, o uso destas células tem algumas limitações em relação à sua disponibilidade, compatibilidade imunológica e risco de contaminação. Desse modo, busca-se o desenvolvimento de soluções para as dificuldades apontadas para suprir a demanda de transplantes. Uma abordagem emergente para superar este problema é baseada na cultura e diferenciação de células-tronco embrionárias humanas (CTEhs). Estas são células-tronco pluripotentes e indiferenciadas com elevada capacidade de auto-renovação e diferenciação em todas as células derivadas dos três folhetos germinativos. No entanto, os métodos de diferenciação utilizados para a produção de CTHs a partir de células pluripotentes ainda não são eficientes. Os protocolos descritos até o momento têm gerado números variados e populações de células heterogêneas, e produz apenas CTHs muito primitivas e imaturas com baixa capacidade funcional *in vivo*. Parte desta dificuldade pode decorrer da ineficiência do microambiente de cultura para a diferenciação. Neste trabalho, nós demonstramos um eficiente protocolo de diferenciação hematopoética baseado em cocultivo de CTEhs com fibroblastos embrionários murinos com alto rendimento na geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas (CTPHs) que expressam os antígenos CD45, CD43, CD31 e CD34, e apresentam potencial clonogênico *in vitro* equivalente ao de células mononucleares isoladas de sangue de cordão umbilical. Nós fomos capazes de produzir todas as células das linhagens eritróide e mielóide em diferentes estágios de maturação, como também células positivas para marcadores linfóides. Demonstramos ainda que as células hematopoéticas surgem no sistema de cultura a partir de um endotélio-hemogênico constituído por células $CD34^{+}CD31^{+}$. No entanto, apesar das características maduras das CTPHs obtidas por tal método, os ensaios de reconstituição hematopoiética mostraram que estas células ainda possuem limitada capacidade funcional de enxertamento em camundongos imunocomprometidos quando transplantadas por via retro-orbital.

Palavras-chave: 1. Diferenciação hematopoética; 2. Endotélio hemogênico; 3. Célula-tronco embrionária humana; 4. Microambiente hematopoético.

ABSTRACT

COSTA, E. B. O. **Eficient *in vitro* generation of human embryonic stem cells-derived hematopoietic stem/progenitor cells.** Thesis – Department of Clinical Medicine, Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto/SP, 2016. 138p.

Hematopoietic stem cells (HSC) transplant is the most successful type of cell therapy carried out to date. However, despite the success and the clinical relevance of HSC isolated from adult sources, these cells have some limitations regarding its availability, immunological compatibility and risk of contamination. Thus, we seek to develop solutions to overcome these difficulties to supply the demand for transplants. An emerging approach to overcome this problem is based on human embryonic stem cells (hESCs) culture and differentiation. These are pluripotent and undifferentiated stem cells with high capacity for self-renewal and differentiation in all cells derived from the three embryonic germ layers. However, differentiation methods used for HSC production from pluripotent cells are not efficient yet. Protocols described so far have generated varying numbers and heterogeneous cell populations, and produce only very primitive and immature HSC with low *in vivo* functional capacity. Part of this difficulty may result from the inefficiency of the microenvironment of culture for differentiation. Here, we demonstrate an efficient protocol based on co-culture of hESCs with mouse embryonic fibroblasts for hematopoietic differentiation with high performance to generate *in vitro* hematopoietic stem/progenitor cells (HSPCs) that express CD45, CD43, CD31 and CD34 antigens with high purity of positive cells. We were able to produce all cells of erythroid and myeloid lineages at different stages of maturation. Lymphoid potential of hematopoietic cells was also evidenced. We demonstrated the primitive origin of hematopoietic cells through capillary-*like* structures constituted by hemogenic $CD34^{+}CD31^{+}$ cells. However, despite mature features of HSPCs obtained by our protocol, hematopoietic reconstitution assays showed that these cells have yet limited functional capacity for grafting into immunocompromised mice when exogenously transplanted by retro-orbital route.

Keywords: 1. Hematopoietic differentiation; 2. Hemogenic endothelium; 3. Human embryonic stem cells; 4. Hematopoietic microenvironment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Página

Figura 1: Modelo esquemático do microambiente hematopoético na medula óssea..... **26**

Figura 2: Possíveis mecanismos envolvidos na mobilização e *homing* das CTHs no microambiente medular..... **27**

Figura 3: Desenho esquemático ilustrando as atividades experimentais desenvolvidas neste trabalho..... **45**

Figura 4: Cronologia da diferenciação hematopoética de CTEhs em sistema de cocultivo com MEFs..... **46**

Figura 5: Banco de CTEhs H1……..... **48**

Figura 6: Banco de CTEhs H9 *feeder*-independente..... **49**

Figura 7: Banco de CTEhs HuES-3..... **49**

Figura 8: Avaliação morfológicas das CTEhs cultivadas *in vitro*..... **50**

Figura 9: Diferenciação espontânea das linhagens de CTEhs……..... **51**

Figura 10: Morfologia das CTEhs H1 em cultura..... **52**

Figura 11: Perfil Imunofenotípico das CTEhs H1 para marcadores de pluripotência..... **52**

Figura 12: Perfil imunofenotípico das CTEhs H1 para marcadores hematopoéticos e endoteliais..... **53**

Figura 13: Caracterização imunofenotípica das CTEhs HuES-3……..... **53**

Figura 14: Caracterização imunofenotípica das CTEhs H9 *feeder*-independente..... **54**

Figura 15: Avaliação do potencial pluripotente das CTEhs *in vitro*……..... **54**

Figura 16: Avaliação do potencial de formação de teratomas das CTEhs H1..... **55**

Figura 17: Avaliação do potencial de formação de teratomas das CTEhs HuES-3..... **55**

Figura 18: Avaliação do potencial de formação de teratomas das CTEhs H9 feeder-independente..... **56**

Figura 19: Cobblestones orginados a partir da diferenciação de CTEhs H1 (D+20)..... **57**

Figura 20: Caracterização morfológica da diferenciação das CTEhs H1..... **58**

Figura 21: Avaliação da coexpressão de marcadores hematopoéticos em células CD45+ coletadas do sobrenadante do meio de diferenciação no dia 24..... **59**

Página

Figura 22: Avaliação da coexpressão dos marcadores CD117, CD133 e CXCR-4 em células CD45+ coletadas do sobrenadante da diferenciação (D+31)..... **60**

Figura 23: Avaliação de população celular que expressa marcadores pan-hematopoéticos diferenciadas a partir de CTEhs-H1 (D+31)..... **60**

Figura 24: Avaliação da coexpressão de marcadores hematopoéticos específicos em células CD45+ coletadas do sobrenadante do meio de diferenciação aos 31 dias..... **60**

Figura 25: Avaliação do imunofenótipo de populações de células que expressam marcadores linfoides..... **61**

Figura 26: Avaliação da expressão de CD4 e CD8..... **61**

Figura 27: Aspecto morfológico da diferenciação das colônias de CTEhs em células-tronco/progenitoras hematopoéticas..... **62**

Figura 28: Análise citológica das células hematopoéticas presentes no sobrenadante aos 24 dias de diferenciação..... **63**

Figura 29: Avaliação da cinética de aparecimento de marcadores hematopoéticos não-específicos durante a diferenciação..... **64**

Figura 30: Avaliação da cinética de aparecimento dos marcadores de células mielóides (monócitos e neutrófilos) durante a diferenciação..... **64**

Figura 31: Avaliação da cinética de aparecimento dos marcadores eritróides durante a diferenciação..... **65**

Figura 32: Potencial clonogênico *in vitro* das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas de CTEhs..... **66**

Figura 33: Cinética do potencial de formação de colônias hematopoéticas durante os diferentes períodos da diferenciação hematopoética..... **67**

Figura 34: Diversidade do potencial clonogênico das células hematopoéticas isoladas a partir das colônias diferenciadas e do sobrenadante nos diferentes dias de diferenciação..... **67**

Figura 35: Avaliação citológica das colônias hematopoéticas..... **68**

Figura 36: Avaliação morfológica das colônias de CTEhs-H1 expandidas por até 12 dias..... **72**

Figura 37: Morfologia das MEFs pós-inativação……..... **73**

Figura 38: Morfologia das colônias de CTEhs-H1 em diferentes períodos da diferenciação..... **74**

Figura 39: Diferenciação das CTEhs-H1 sobre matrigel……..... **74**

Figura 40: Diferenciação hematopoética da linhagem de CTEh H9 *feeder*-independente (D+24)..... **76**

Figura 41: Diferenciação hematopoética da linhagem de CTEh H1 (D+24)..... **76**

Figura 42: Análise imunofenotípica das colônias de CTEh-H9 *feeder*-independente após 30 dias de diferenciação..... **77**

Figura 43: Diferenciação das CTEhs H9 *feeder*-independente e HuES-3..... **81**

Figura 44: Avaliação de população celular que expressa marcadores pan-hematopoéticos diferenciada a partir de CTEhs H9 *feeder*-independente (D+31)..... **81**

Figura 45: Avaliação de população celular que expressa marcadores pan-hematopoéticos diferenciada a partir de CTEhs HuES-3 (D+31)..... **81**

Figura 46: Avaliação do potencial geral de formação de colônias hematopoéticas das células diferenciadas (D+24) a partir de CTEhs HuES-3 e H9 *feeder*-independente em comparação ao potencial das células isoladas de sangue de cordão umbilical e da linhagem de CTEh H1 (D+24)..... **82**

Figura 47: Diversidade do potencial clonogênico das células hematopoéticas isoladas a partir das colônias diferenciadas e do sobrenadante aos 24 dias de diferenciação da CTEh HuES-3..... **83**

Figura 48: Diversidade do potencial clonogênico das células hematopoéticas isoladas a partir das colônias diferenciadas e do sobrenadante aos 24 dias de diferenciação da CTEh H9 *feeder*-independente..... **83**

Figura 49: Avaliação da diferenciação de CTEhs-H1 sobre MEF-RP N3 (D+24)..... **84**

Figura 50: Avaliação da diferenciação de CTEhs-H1 sobre MEF-RP N5 (D+24)..... **84**

Figura 51: Avaliação da diferenciação de CTEhs-H1 sobre MEF ATCC (D+24)..... **85**

Figura 52: Avaliação da diferenciação de CTEhs-H1 sobre MEF-RP N6 (D+24)..... **85**

Figura 53: Isolamento de populações CD45+43+38-34- e CD45+43+38+34- após 27 dias de diferenciação..... **86**

Figura 54: Avaliação do potencial de comissionamento e formação de colônias das subpopulações CD45+43+38-34- (Q6) e CD45+43+38+34- (Q7)..... **86**

Figura 55: Avaliação morfológica das colônias em diferenciação por microscopia eletrônica de varredura..... **88**

Figura 56: Expressão do marcador CD45 *in situ* no nicho de diferenciação em imagem 2D..... **88**

Figura 57: Marcação para CD45 em plano de 3 cortes..... **89**

Figura 58: Marcação para CD45 em plano de 12 cortes..... **89**

Figura 59: Imagem 3D de células hematopoéticas CD45+..... **90**

Figura 60: Avaliação da expressão dos antígenos CD34 e CD31 no 15º de diferenciação das colônias de CTEhs..... **91**

Figura 61: Avaliação da expressão dos antígenos CD34 e CD31 no 20º de diferenciação das colônias de CTEhs..... **91**

Figura 62: Imagem 3D com sobreposição de 12 cortes para avaliação da expressão dos antígenos CD34 e CD31 no 20º de diferenciação das colônias de CTEhs..... **92**

Figura 63: Expressão de colágeno IV no nicho de diferenciação..... **93**

Figura 64: Expressão de Nestina no nicho de diferenciação..... **93**

Figura 65: Quimerismo pós-transplante..... **94**

Figura 66: Avaliação da sobrevida e aplasia celular de camundongos imunodeficientes NSG após irradiação..... **96**

Figura 67: Avaliação do enxertamento de células hematopoéticas humanas em camundongo eutanasiado no 9º dia pós-transplante com estroma de diferenciação hematopoética D+24..... **97**

Figura 68: Análise do enxertamento com células humanas na medula óssea de camundongos 6 semanas pós-transplante..... **99**

Figura 69: Análise da presença de células humanas no sangue periférico de camundongos 6 semanas pós-transplante..... **99**

Figura 70: Análise do enxertamento com células humanas no baço de camundongos 6 semanas pós-transplante..... **100**

Figura 71: Análise do enxertamento com células humanas no fígado de camundongos 6 semanas pós-transplante..... **100**

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Resultados da padronização da diferenciação com CTEh H1 e eficiência na obtenção de células hematopoéticas..... **69**

Tabela 2 – Diferenciação de CTEhs H1 com 5 e 6 dias de expansão e eficiência ma obtenção de células hematopoéticas..... **71**

Tabela 3 – Padronização e eficiência da diferenciação hematopoética em placas de $100mm^3$..... **72**

Tabela 4 – Diferenciação de CTEhs H9 *feeder*-independente com $1x10^6$ células plaqueadas..... **78**

Tabela 5 - Diferenciação de CTEhs H9 *feeder*-independente com $5x10^5$ células plaqueadas..... **79**

Tabela 6 – Diferenciação de CTEhs HuES-3 com $1x10^6$ células plaqueadas..... **79**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM	Aorta-gônada-mesonefros
BFU-E	do inglês "*burst forming-unit erythroid*"
BL-CFCS	do ingles "*blast colony-forming cells*"
BMP4	do ingles "*bone morphogenetic protein-4*"
cDNA	do inglês, "*complementary desoxiribonucleic acid"*
CFU-F	do ingles, "*colony forming unit-fibroblast"*
CFU-S	do inglês, "*colony forming unit-spleen*"
CFU-GEMM	do inglês, "*colony forming unit – granulocytes, erythrocytes, macrophages and megakaryocytes*"
CFU-GM	do ingles, "*colony forming unit – granulocytes and macrophages"*
CFU-M	do ingles, "*colony forming unit –macrophages"*
CTH	célula-tronco hematopoética
CTPH	Célula-tronco/progenitora hematopoética
CTEs	Células-tronco embrionárias
CTEhs	Células-tronco embrionárias humanas
CTEms	Células-tronco embrionárias murinas
DAPI	do inglês, "*dihidrocloreto de 4,6 diamino-2-fenilindol"*
DMEM	do inglês, "*Dulbecco's Modified Eagle's Médium"*
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	ácido etilenodiaminoteracético
EPO	Eritropoietina
FGF	do inglês, "*fibroblast growth fator"*
FGF-B	do ingles, "*fibroblast growth factor, basic"*
FITC	do inglês, "*fluorescein isothiocyanate"*
FL	do inglês, *"fetal liver"*
FLT3L	do inglês, "*fms-related tyrosine kinase 3ligand"*
GAPDH	do inglês, "*glyceraldeyde 3-phosphate dehydrogenase"*
G-CSF	do inglês, "*granulocyte colony-stimulating factor"*
GM-CSF	do inglês, "*granulocyte macrophage colony-stimulating factor"*
IGF-I	do inglês, "*insulin-like growth factor-I"*
IL	Interleucina
KDR	do inglês, "*kinase insert domain containing receptor*"
M-CSF	do inglês, "*macrophage colony-stimulating factor"*
MO	medula óssea
NK	do inglês, "*natural killer"*
NOD/SCID	do inglês, "*nonobese diabetic severe combined immunodeficient* "
OCT-4	do inglês, "*octamer-binding protein 4"*

PBS	do inglês, "*phosphate buffered saline"*
PE	do inglês, "*phycoeritrin"*
PerCP	do inglês, "*peridinin chlorophyll"*
PI	do inglês, "*propidium iodide"*
SCF	do inglês, "*stem cell factor"*
SCID	do ingles, "*severe combined immunodeficiency"*
SCU	sangue de cordão umbilical
SDF	do inglês, "*stromal derived factor"*
SOX2	do inglês, "*SRY [sex determining region Y]-box 2*"
SP	sangue periférico
SFB	soro fetal bovino
SSEA	do inglês, "*stage-specific embrionic antigens*"
VEGF	do inglês, "*vascular endothelial growth factor"*

SUMÁRIO

Página

1 INTRODUÇÃO..... 22

1.1 Células-tronco hematopoéticas..... 22

1.2 Cultura de células-tronco hematopoéticas..... 23

1.3 Nicho hematopoético..... 24

1.4 Células-tronco embrionárias humanas..... 28

1.5 Diferenciação hematopoética a partir de células-tronco embrionárias humanas..... 29

2 HIPÓTESE..... 32

3 OBJETIVOS..... 34

3.1 Objetivo geral..... 34

3.2 Objetivos específicos..... 34

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 36

4.1 Aspectos éticos..... 36

4.1.1 Sangue de cordão umbilical..... 36

4.1.2 Células-tronco embrionárias humanas..... 36

4.1.3 Experimentação animal..... 36

4.2 Linhagens celulares e cultura primária..... 37

4.2.1 Células-tronco embrionárias humanas..... 37

4.2.2 Fibroblastos de embriões murinos (MEFs)..... 38

4.2.3 Células-tronco hematopoéticas de sangue de cordão umbilical..... 38

4.3 Cultura e diferenciação de células-tronco embrionárias humanas em células-tronco/progenitoras hematopoéticas..... 39

4.4 Caracterização imunofenotípica e funcional das células-tronco..... 40

4.4.1 Citometria de fluxo..... 40

4.4.2 Análise morfológica por colocaração com giemsa..... 41

4.4.3 Microscopia confocal e imunofluorescência..... 41

4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura..... 42

4.4.5 Ensaio clonogênico..... 42

4.4.6 Ensaio de formação de teratomas..... 42

4.5 Transplante de células-tronco hematopoéticas em camundongos imunodeficientes NSG..... 43
4.6 Teste para detecção de micoplasma..... 44
4.7 Análise estatística..... 44
4.8 Desenho experimental..... 45
5 RESULTADOS..... 48
5.1 Cultivo e expansão de CTEhs livres de antibiótico e micoplasma..... 48
5.2 Caracterização morfológica das linhagens de CTEhs H1, HuES-3 e H9 *feeder*-independente..... 50
5.3 Avaliação imunofenotípica e de pluripotência das CTEhs..... 52
5.4 Diferenciação hematopoética das CTEhs H1..... 56
5.5 Cinética da diferenciação *in vitro* das células hematopoéticas..... 62
5.6 Potencial clonogênico *in vitro* das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas de CTEhs..... 65
5.7 Considerações sobre a padronização do protocolo de diferenciação com a linhagem de CTEh H1 e avaliação da eficiência na produção de células hematopoéticas..... 69
5.8 Avaliação do potencial de diferenciação das linhagens de CTEhs HuES-3 e H9 *feeder*-independente..... 75
5.9 Diferenciação das CTEhs H1 sobre diferentes MEFs..... 84
5.10 Avaliação do potencial de comissionamento de subpopulação mielomonocítica..... 85
5.11 Caracterização *in situ* das células hematopoéticas e do microambiente da diferenciação..... 87
5.12 Avaliação funcional *in vivo* das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas da diferenciação de CTEhs..... 93
6 DISCUSSÃO..... 102
7 CONCLUSÕES..... 117
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 119
ANEXOS

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Células-Tronco Hematopoéticas

Células-tronco hematopoéticas (CTHs) são células-tronco somáticas com capacidade de auto-renovação e diferenciação em todos os tipos celulares maduros do sangue. No adulto, essas células encontram-se alojadas na medula óssea (M.O.) (Johnson e Moore, 1975).

As CTHs foram caracterizadas funcionalmente pela primeira vez no início da década de 60 por Till e McCulloch (1961). Desde então, elas têm sido extensivamente estudadas principalmente para aplicações clínicas no tratamento de diversas doenças hematológicas. O transplante de CTHs é o mais bem-sucedido tipo de terapia celular realizado até os dias atuais. As fontes mais utilizadas para obtenção de CTHs são: M.O., sangue periférico mobilizado e sangue de cordão umbilical. (Thomas *et al.*, 1957; Goodman e Hodgson, 1962; McCredie *et al.*, 1971; Richman *et al.*, 1976; Goldman *et al.*, 1979; Socinksi *et al.*, 1988; Gluckman *et al.*, 1989, Thomas, 1999; Munoz *et al.*, 2014).

As células isoladas da medula óssea e do sangue periférico mobilizado possuem maior potencial de reconstituição hematopoética quando transplantadas *in vivo* (Thomas *et al.*, 1957; Gatti *et al.*, 1968, Thomas, 1999). Porém, são as que oferecem maior desconforto e potencial risco ao doador. No caso da coleta de M.O., o doador deve ser submetido a anestesia e a um procedimento cirúrgico invasivo. No caso do sangue periférico mobilizado, é necessário o uso de medicamento para estimular a proliferação das CTHs e mobilização para o sangue periférico para que elas sejam coletadas por aférese (Socinksi *et al.*, 1988).

O sangue do cordão umbilical (Gluckman *et al.*, 1989; Munoz *et al.*, 2014) é uma fonte de CTHs ainda muito primitivas (Panepucci *et al.*, 2007). Ele contém uma quantidade pequena de CTHs, o que torna seu uso limitado apenas para transplantes em crianças ou adultos de baixo peso (Siena *et al.*, 1991; Heimfeld, 2003; Kaufman, 2009).

Apesar do sucesso e da importância na prática clínica dos transplantes de CTHs isoladas de indivíduos adultos, essas células apresentam algumas limitações com relação a sua obtenção e compatibilidade para transplante (Shizuru *et al.*, 1996; Bowers *et al.*, 2000; Negrin *et al.*, 2000; Kaufman e Thomson 2002).

A obtenção das CTHs depende da doação voluntária dos indivíduos, que devem ser submetidos a procedimentos cirúrgicos ou a condicionamento medicamentoso (Thomas, 1999; Negrin *et al.*, 2000; Kaufman e Thomson 2002).

Além disso, é necessário que as células do doador possuam sistema HLA compatível com o receptor para que o transplante seja realizado e não ocorra rejeição. Isso é um grande entrave para a realização do transplante devido à dificuldade de se encontrar doadores compatíveis para pacientes que necessitam de transplante (Negrin *et al.*, 2000; Kaufman e Thomson, 2002).

Soma-se a estes fatores a crescente necessidade de doadores para suprir a demanda de pacientes que necessitam de transplantes. Entretanto, o número de doadores de medula óssea cadastrados em todo o mundo está muito aquém das necessidades mundiais de CTHs (van Rood e Oudshoorn, 2008).

Desse modo, busca-se o desenvolvimento de soluções para as dificuldades apontadas para suprir a demanda de transplantes. Duas alternativas são: o cultivo e expansão *in vitro* de CTHs isoladas de fontes humanas, e a produção de CTHs a partir de células-tronco pluripotentes em CTHs (Siena *et al.*, 1991; Heimfeld, 2003; Kaufman, 2009).

1.2 Cultura de Células-Tronco Hematopoéticas

A expansão ex vivo de CTHs ainda é um problema a ser superado. Até o presente momento não existem protocolos efetivos que permitam a proliferação e manutenção *in vitro* de CTHs com potencial de reconstituição hematopoética. Quando cultivadas, as CTHs diferenciam-se rapidamente o que resulta na exaustão do pool de célula-tronco (Shizuru *et al.*, 1996; Bowers *et al.*, 2000). O desenvolvimento de metodologias que permitam a expansão dessas células é de grande relevância para o desenvolvimento de terapias e para o estudo da capacidade de auto-renovação e comissionamento das CTHs (Negrin *et al.*, 2000; Kaufman e Thomson 2002).

A dificuldade na construção de sistemas *in vitro* para cultivo de CTHs deve-se essencialmente à complexidade do microambiente medular onde residem as CTHs. O nicho hematopoético exerce importante influência sobre as CTHs por dois mecanismos principais: preservando o pool de CTHs e promovendo a formação contínua de células maduras (Negrin *et al.*, 2000; Kaufman, 2009).

A importância do nicho hematopoético na biologia das CTHs tornou-se evidente com os estudos de Dexter *et al.* (1974, 1977). Esses estudos serviram de base para investigações posteriores *in vitro* sobre a influência do estroma no controle da manutenção e da proliferação das CTHs. Dexter observou que quando a M.O. total era cultivada *in vitro*, as células que constituem o estroma *in vivo* formavam uma camada de células alimentadoras responsáveis pela manutenção e expansão das CTHs (Dexter e Lajtha, 1974; Dexter *et al.*, 1977).

Os sistemas de cocultivo de células estromais com células hematopoéticas tornaram-se metodologias muito empregadas nos protocolos de expansão e diferenciação das CTHs, bem como no estudo da interação dos elementos estromais com as CTHs. Todavia, essas metodologias não mimetizam a real arquitetura tridimensional da medula óssea e, portanto, não refletem a real configuração do microambiente hematopoético (Wang *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006; Ledran *et al.*, 2008).

Para tentar mimetizar a real arquitetura da M.O., foram desenvolvimentos sistemas de cultivo de CTHs em ambientes tridimensionais (3D) que utilizam scaffolds ou elementos de matriz extracelular como colágeno e fibronectina. As culturas 3D favorecem a reconstrução de um microambiente mais complexo que permite uma maior interação entre as células. Alguns estudos revelaram que os ambientes 3D *in vitro* favorecem a proliferação e preservação do pool de CTHs de maneira mais eficaz que os cultivos em ambientes bidimensionais (Sharma *et al.*, 2012; Amabile *et al.*, 2013). Entretanto, nenhum estudo demonstrou a viabilidade desses protocolos para a obtenção de CTHs com grande capacidade de reconstituição hematopoética *in vivo*.

O desenvolvimento de modelos *in vitro* que mimetizem a formação do microambiente que existe *in vivo* torna-se importante para a compreensão da biologia das CTHs, bem como para a obtenção de CTHs funcionais que possam ser utilizadas na prática clínica. As células-tronco pluripotentes, em especial as células-tronco embrionárias humanas, são promessas para o desenvolvimento desses modelos. Sob condições específicas, essas células são capazes de recriar um ambiente tridimensional *in vitro* que permite o desenvolvimento das CTHs (Kaufman, 2009).

1.3 Nicho Hematopoético

O conceito de nicho foi originalmente proposto por Schofield (1978) para descrever o microambiente anatômico no qual residem as células-tronco. Schofield postulou que a

hematopoese não poderia ocorrer fora do nicho hematopoético em mamíferos, e que as células estromais que constituem o nicho hematopoético controlam a auto-renovação e diferenciação das CTHs (Schofield, 1978).

O nicho hematopoético é parte fundamental no entendimento da biologia das células-tronco (Wilson e Trumpp, 2006; Adams *et al.*, 2007; Papayannopoulou e Scadden, 2008). Alguns trabalhos sobre o microambiente hematopoético evidenciaram a participação do nicho na gênese de diversas doenças hematológicas (Carlesso e Cardoso, 2010; Guerrouahen *et al.*, 2011; Noll *et al.*, 2012) e demonstraram que a sua manipulação tem impacto direto na função das CTHs (Adams e Scadden, 2006; Adams *et al.*, 2007; Papayannopoulou e Scadden, 2008; Raaijmakers e Scadden, 2008; Guerrouahen *et al.*, 2011).

Estudos em murinos demonstraram a existência de dois sítios anatômicos na M.O. denominados: nicho endosteal, cujos principais constituintes são os osteoblastos (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003), e nicho vascular, com predominância de vasos sinusóides (Kiel *et al.*, 2005; Sipkins *et al.*, 2005; Lo Celso *et al.*, 2009) (Figura 1).

Na M.O. as CTHs encontram-se em íntimo contato com osteoblastos, e estes seriam responsáveis pela manutenção das células-tronco em estado quiescente (Taichman *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Visnjic *et al.*, 2004). Estudos revelaram que o número de CTHs na M.O. está diretamente relacionado à quantidade de osteoblastos do nicho endosteal (Calvi *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

Em contrapartida, a depleção de células endoteliais Ve-caderina+ do nicho vascular também apresenta grande impacto na biologia das células-tronco e resulta em uma diminuição drástica na quantidade de CTHs (Cardier e Barbera-Guillem, 1997). Esse achado reforça a hipótese da existência de um nicho alternativo para as CTHs, além do nicho endosteal. A parede dos vasos sinusóides, em especial as células reticulares (células CAR, CXCL-12 abundant reticular cells) e células Nestina+ encontradas no revestimento dos vasos (Sacchetti *et al.*, 2007) também constituem outro nicho para as CTHs, o nicho vascular (Kiel *et al.*, 2005).

Os trabalhos demonstram que o microambiente hematopoético é extremamente dinâmico, constitui parte fundamental na biologia das CTHs e permite o tráfego das CTHs entre diferentes áreas anatômicas dentro da M.O. (Yin e Li, 2006). Deve-se considerar ainda que o nicho endosteal é um sítio anatômico altamente vascularizado, o que reforça a proposição de mais uma teoria, a de que ambos os nichos, na verdade, representam o mesmo nicho (De Bruyn *et al.*, 1970; Coskun e Hirschi, 2010; Sacchetti *et al.*, 2007).

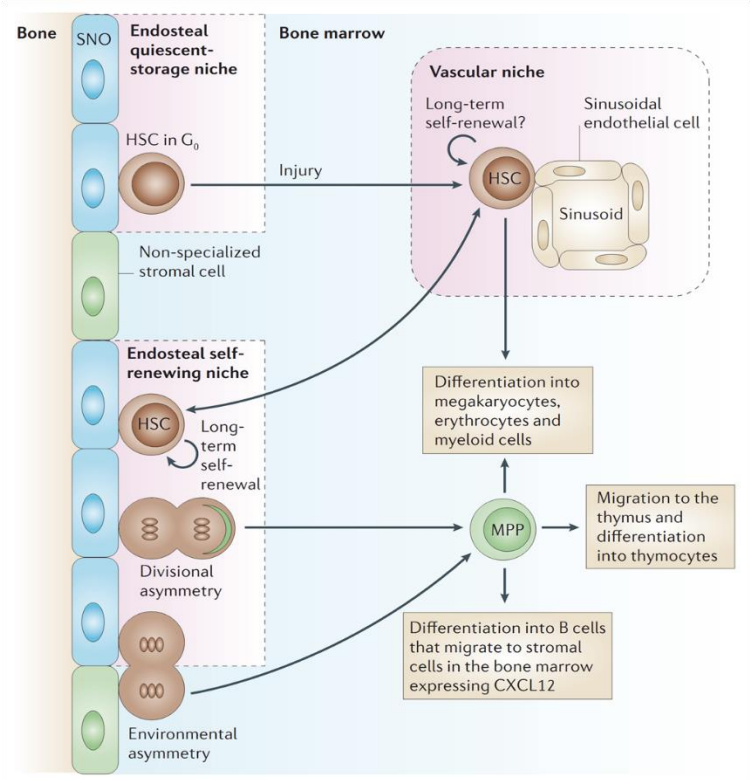


Figura 1 – Modelo esquemático do microambiente hematopoético na medula óssea. CTHs podem ser encontradas tanto no nicho endosteal quanto no nicho vascular. No nicho endosteal, as CTHs long-term seriam mantidas em estado quiescente, ao passo que as CTHs encontradas no nicho vascular seriam CTHs ativadas que se diferenciariam em precursores hematopoéticos multipotentes, os quais originariam todas as linhagens celulares hematopoéticas. HSC, célula-tronco hematopoética (Wilson e Trumpp, 2006. Autorização do uso da Figura no Anexo IX).

Além da constituição celular, o microambiente hematopoético é um local enriquecido em fatores solúveis e por diferentes células estromais, essenciais para a manutenção das CTHs no nicho (Arai *et al.*, 2004; Lapidot *et al.*, 2005). Esses fatores governam os fenômenos de mobilização, transmigração e *homing* das CTHs (Lapidot *et al.*, 2005) (Figura 2).

Diversas vias de sinalização e moléculas de adesão, tais como SCF/c-kit, angiopoietina-1/Tie-2, V-cam/integrinas e osteopontina/β1-integrina (Driessen *et al.*, 2003; Arai *et al.*, 2004; Stier *et al.*, 2005) foram descritas como parte fundamental da interação CTH-nicho. Um dos principais mecanismos responsáveis pela manutenção das CTHs no nicho e sua mobilização envolve a interação entre a quimiocina SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor-1, também chamado de CXCL12) e o seu receptor CXCR4.

A interação SDF-1/CXCR4 ativa vias de sinalização nas CTHs, a exemplo das proteínas Rac, que regulam a sua sobrevivência, proliferação, mobilização e *homing* (Kortesidis *et al.*, 2005; Lapidot *et al.*, 2005). O SDF-1 é expresso por células estromais, como as células endoteliais e os osteoblastos, ao passo que o CXCR4 é expresso pelas CTHs (Peled *et al.*, 1999; Kortesidis *et al.*, 2005). A expressão de SDF-1 por células estromais tem sido descrito como um fator importante para a transmigração das CTHs durante o *homing*. A elevada expressão de SDF-1 pelos osteoblastos presentes na M.O. forma um gradiente

quimiotático e é um dos principais elementos na atração das CTHs ao nicho hematopoético (Peled *et al.*, 1999; Kortesidis *et al.*, 2005).

Outro fator encontrado na M.O. que exerce influência sobre as CTHs é o TGF-β. Yamazaki e cols. (2012) demonstraram que o TGF-β em sua forma ativa está intimamente relacionado a fibras nervosas adrenérgicas na M.O. murina e induz a quiescência das CTHs. Essa molécula é secretada por uma ampla variedade de células estromais. Células de Schwann GFAP(Glial Fibrillary Acid Protein)+integrina-β8+ que envolvem os nervos simpáticos adrenérgicos estão envolvidas na ativação do TGF-β, uma reação mediada por metaloproteinases. A eliminação dos nervos simpáticos e das células de Schwann na M.O. murina causa depleção das CTHs (Yamazaki *et al.*, 2012).

Outro mecanismo molecular fundamental para a manutenção das CTHs no nicho é a interação Tie-2/Ang-1. Em murinos, Tie-2 é expresso na superfície das CTHs quiescentes, enquanto Ang-1 é expresso principalmente por osteoblastos. Essa interação induz a expressão de outros elementos envolvidos na interação CTH-estroma, como a N-caderina e a β1-integrina, moléculas importantes para a quiescência das CTHs (Davis *et al.*, 1996; Arai *et al.*, 2004).

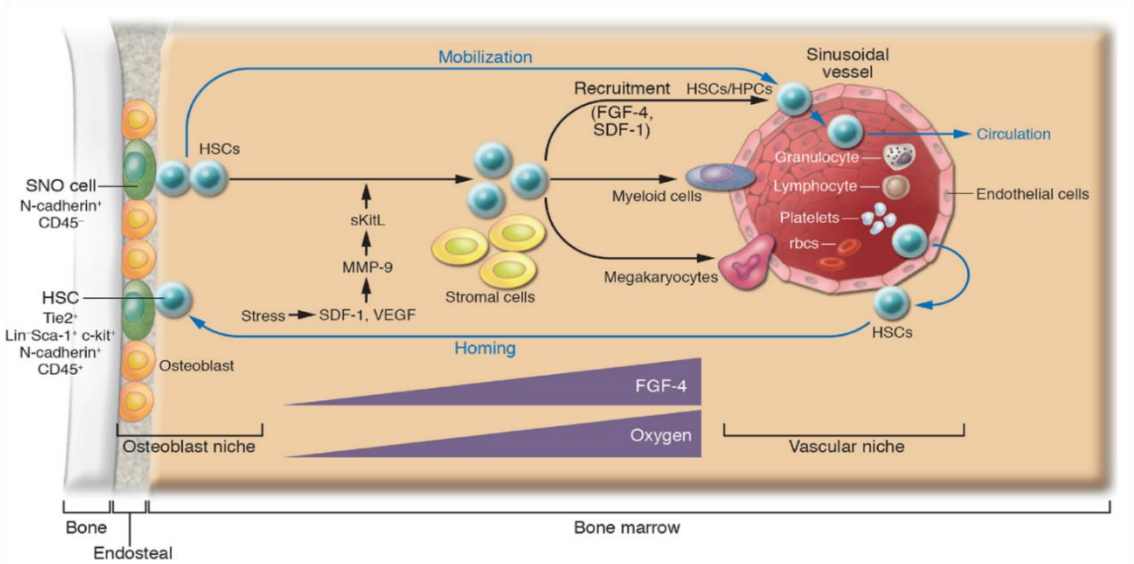


Figura 2 – Possíveis mecanismos envolvidos na mobilização e *homing* das CTHs no microambiente medular. A diminuição na produção de SDF-1 na medula óssea promove a mobilização das CTHs, ao passo que o aumento desta molécula no nicho medular realiza a quimioatração dessas células para a medula óssea (*homing*). Além da interação entre o SDF-1 e o seu receptor, o CXCR-4, diversas outras moléculas como a N-caderina, o Tie-2 e CD45, por exemplo, são fundamentais para que as CTHs sejam mobilizadas e realizem o *homing* e a ancoragem ao estroma medular. SNO cells, osteoblastos fusiformes N-caderina+. HSC, célula-tronco hematopoética. HSCs/HPCs, células-tronc/progenitoras hematopoéticas. SDF-1, fator 1 derivado de célula estromal. VEGF, fator de crescimento do endotélio vascular. MMP-9, metaloproteinase 9. sKitL, ligante solúvel do fator de crescimento de célula-tronco. FGF-4, fator 4 de crescimento de fibroblastos. RBCs, hemácias (Yin e Li, 2006. Autorização do uso da figura no Anexo X).

A complexidade do microambiente hematopoético é de fundamental importância para o entendimento da biologia das CTHs. Como consequência, o cultivo de CTHs somáticas tem se mostrado uma prática difícil, pois a capacidade funcional *in vivo* dessas células fica comprometida após expansão ex vivo em virtude da diferenciação terminal espontânea. O microambiente artificial no sistema de cultura pode explicar parte das dificuldades observada nestes sistemas.

As células-tronco embrionárias humanas (CTEhs), no entanto, possuem potencial proliferativo ilimitado e de diferenciação em todas as linhagens celulares somáticas, incluindo as linhagens hematopoéticas. Devido à sua elevada capacidade funcional, as CTEhs representam um importante modelo para o estudo do desenvolvimento hematopoético e, no futuro, essas células poderão ser uma ferramenta importante para a obtenção de células hematopoéticas para uso clínico (Siena *et al.*, 1991; Heimfeld, 2003; Kaufman, 2009).

1.4 Células-Tronco Embrionárias Humanas

As CTEhs constituem uma população de células derivadas da massa celular interna de embriões humanos ainda durante o estágio de blastocisto. São células indiferenciadas que possuem uma alta capacidade de auto-renovação e diferenciação em células dos três folhetos embrionários (endoderma, mesoderma e ectoderma) (Thomson *et al.*, 1998). Essas células representam uma ferramenta para o desenvolvimento de modelos para o estudo da biologia do desenvolvimento normal e alterado (Thomson *et al.*, 1998; Kaufman *et al.*, 2001).

Quando cultivadas, as CTEhs caracterizam-se pela expressão de um conjunto de antígenos de superfície e fatores de transcrição relacionados ao seu potencial pluripotente, como: SSEA(*stage-specific embryonic antigen*)-3 , SSEA(*stage-specific embryonic antigen*)-4, Oct(*octamer-binding transcription factor*)3/4, Nanog, Sox2. Não apresentam a expressão do marcador SSEA(*stage-specific embryonic antigen*)-1 e de outros marcadores específicos de linhagens, como CD34, CD45, CD31, entre outros (Thomson *et al.*, 1998).

Além disso, essas células são capazes de formar corpos embrióides *in vitro* e teratomas *in vivo* (Thomson *et al.*, 1998; Amit *et al.*, 2000; Reubinoff *et al.*, 2000; Schuldiner *et al.*, 2000). Os corpos embrióides são estruturas esféricas tridimensionais que abrigam o desenvolvimento de diversos tipos celulares e que se formam quando essas células são cultivadas em placas de baixa aderência. Os teratomas são tumores formados *in vivo* quando essas células são transplantadas em animais. Esses tumores são constituídos por células e

tecidos oriundos do endoderma, mesoderma e ectoderma devido à diferenciação espontânea das células pluripotentes (Amit *et al.*, 2000; Reubinoff *et al.*, 2000; Schuldiner *et al.*, 2000).

Essas características particulares das CTEhs fazem delas uma ferramenta interessante para a elaboração de modelos para a diferenciação de CTHs com potencial uso terapêutico. O uso de CTHs diferenciadas a partir de CTEhs sobrepujaria os problemas inerentes à captação de doadores e cultivo e expansão dessas células *in vitro*, uma vez que as CTEhs representam fonte ilimitada de células (Kaufman, 2009).

1.5 Diferenciação Hematopoética a partir de Células-Tronco Embrionárias Humanas

Diversos grupos de pesquisa em todo o mundo (Wang *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006) já produziram CTHs e tipos específicos de células hematopoéticas *in vitro* a partir de CTEhs. Porém, o potencial de enxertamento das CTHs obtidas é muito inferior ao das CTHs isoladas do organismo adulto. Ainda não há relatos na literatura da produção de CTHs com capacidade de enxertamento na medula óssea por longos períodos e de maneira completa, com a subseqüente produção de todas as linhagens hematopoéticas.

Dentre as principais metodologias utilizadas na diferenciação hematopoética, dois métodos são os mais comumente empregados: diferenciação via formação de corpos embrióides (EBs, do inglês *Embryoid Bodies*) e co-cultura com células estromais. Além da existência ou não de células alimentadoras, existem algumas diferenças no requerimento de citocinas e fatores de crescimento quando as CTEhs são co-cultivadas com células estromais ou quando são diferenciadas através da formação de EBs (Kaufman *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Vodyanik *et al.*, 2005).

EBs são estruturas esféricas tridimensionais formadas quando células pluripotentes são cultivadas em placas de baixa aderência e que abrigam o desenvolvimento de diversos tipos celulares, inclusive células hematopoéticas. Acredita-se que as interações célula-célula dentro dos EBs favoreçam a diferenciação celular. Entretanto, trata-se de um processo altamente complexo, pouco controlável e, em alguns casos, desvantajoso no controle da indução da diferenciação por causa da dificuldade dos fatores externos alcançarem as células que se encontram no interior dessas estruturas (Doetschman *et al.*, 1985; Wiles e Keller, 1991).

As CTHs obtidas da diferenciação de CTEhs *in vitro* são identificadas pela expressão do antígeno CD34 na grande maioria dos estudos (Wang *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006; Ledran *et al.*, 2008). A molécula CD34 foi descrita inicialmente como um dos

principais marcadores de CTHs adultas (Strauss *et al.*, 1986; Civin *et al.*, 1987). No entanto, estudos posteriores demonstraram que este marcador não é exclusivo de CTHs e que, na verdade, pode não representar uma população de CTHs com grande potencial funcional (Osawa *et al.*, 1996; Goodell *et al.*, 1996; Goodell *et al.*, 1997).

Os resultados dos experimentos com CTHs CD34+ obtidas de CTEhs demonstram que essa população é constituída por células muito primitivas que apresentam baixa capacidade de enxertamento *in vivo* (Wang *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006; Ledran *et al.*, 2008).

O potencial de enxertamento das CTHs obtidas de CTEhs em modelos murinos de reconstituição hematopoética é inferior a 1% na quase totalidade dos estudos publicados. Essas células também não são capazes de realizar enxertamento quando realizado um transplante secundário, refletindo o seu baixo potencial de auto-renovação (Wang *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006; Ledran *et al.*, 2008).

Estes estudos demonstram que os protocolos de diferenciação empregados para a produção de CTHs a partir de CTEhs ainda não são eficientes. Eles são capazes de reproduzir algo semelhante à hematopoese primitiva que acontece *in vivo*, mas não são capazes de produzir células maduras relativas à hematopoese definitiva que ocorre posteriormente à hematopoese primitiva (Kennedy *et al.*, 2012; Amabile *et al.*, 2013).

As pesquisas atuais estão focadas no desenvolvimento de métodos que visem à obtenção de CTHs funcionais *in vivo*, bem como o estudo dos mecanismos que governam e determinam o seu potencial de enxertamento e domiciliamento. Entretanto, ainda não existe um consenso sobre o perfil imunofenotípico das CTHs definitivas obtidas de CTEhs (Wang *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2005; Kennedy *et al.*, 2012; Amabile *et al.*, 2013).

Kennedy e colaboradores (2012) demonstraram que populações de CTHs maduras obtidas de células-tronco pluripotentes relativas à hematopoese definitiva e com grande potencial de enxertia *in vivo* apresentam fenótipo CD45+CD43+CD34low/-. Seus estudos demonstraram a importância de marcadores como o CD45 e o CD43 para a atividade funcional das CTHs. A obtenção dessa população celular foi possível somente após a formação de teratomas *in vivo* (Amabile *et al.*, 2013). Entretanto, apesar da demonstração do grande potencial funcional *in vivo* dessas células, a necessidade de formação de teratomas para a sua obtenção ainda precisa ser melhor avaliada.

A incapacidade destes protocolos de diferenciação e expansão de CTHs funcionais a partir de CTEhs *in vitro* pode estar relacionada às características do microambiente artificial produzidos nos sistemas de cultivo. Na construção e manipulação deste microambiente certamente situa a chave do problema.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

Considerando os seguintes pontos:

1) O microambiente, ou nicho, é um elemento fundamental na regulação das propriedades funcionais das CTHs.
2) A expansão de CTHs em número suficiente para a realização de transplantes seria um grande avanço na Hematologia.
3) CTEhs são capazes de se diferenciarem *in vitro* em CTHs mas os protocolos atuais não permitem a obtenção de células funcionais ou suficientes para transplante. Parte desta dificuldade pode decorrer da ineficiência do microambiente de cultura.

Formulamos a hipótese de que um sistema de cultivo que reproduza características do nicho original pode ser mais eficiente para a geração de CTHs funcionais. Especificamente, formulamos e testamos a hipótese de que um microambiente de cultura formado por fibroblastos embrionários murinos e células mesodermais derivadas da diferenciação de CTEhs poderiam favorecer a produção e expansão de CTHs.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Avaliar a capacidade funcional *in vitro* e *in vivo* das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas da diferenciação das células-tronco embrionárias humanas após cocultivo com fibroblastos de embriões murinos (MEFs) e determinar os elementos que constituem o nicho hematopoético *in vitro* durante a diferenciação.

3.2 Específicos:

1) Realizar a caracterização fenotípica das células-tronco embrionárias humanas;
2) Realizar a caracterização fenotípica das células-tronco/progenitoras hematopoéticas diferenciadas a partir de células-tronco embrionárias humanas;
3) Avaliar as características funcionais *in vitro* das células-tronco/progenitoras hematopoéticas diferenciadas a partir de células-tronco embrionárias humanas;
4) Avaliar a capacidade funcional *in vivo* das células-tronco/progenitoras hematopoéticas diferenciadas a partir de células-tronco embrionárias humanas utilizando modelo murino de reconstituição hematopoética;
5) Avaliar a presença de células estromais no nicho hematopoético *in vitro*;
6) Realizar a caracterização *in situ* da distribuição e localização das populações de células-tronco/progenitoras hematopoéticas;

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

4.1.1 Sangue de cordão umbilical

As amostras de sangue de cordão umbilical foram obtidas com consentimento dos responsáveis de acordo com projeto aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da USP de Ribeirão Preto (N° 44859315.1.0000.5440) (ANEXO 1) e pela Comissão de Pesquisa da Mater (Centro de Referência para a Saúde da Mulher) (ANEXO 2), considerando-se todos os aspectos éticos da pesquisa e uso do Termo de Consentimento Livre Esclarecido. As bolsas de sangue de cordão umbilical obtidas foram mantidas a 4ºC até o momento do processamento (até 6 horas após a coleta) de todo o volume de sangue coletado. Foram candidatas potenciais à doação de sangue de cordão umbilical as parturientes e seus filhos (independente de raça, classe social ou religião) atendidos no centro obstétrico (durante o ano de), com idade gestacional acima de 35 semanas, peso fetal maior que 2.800g, bolsa rota há menos de 12 horas.

4.1.2 Células-tronco embrionárias humanas

As linhagens de CTEhs foram adquiridas da empresa WiCell® (USA) e cultivadas no Laboratório de Terapia Celular) para o estabelecimento de bancos de CTEhs para a realização dos estudos de diferenciação. O presente projeto obteve aprovação do Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP) (processo n° 44859315.1.0000.5440) (ANEXO I) e da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (processo n° 297/2015.003-01) (ANEXO IV)

4.1.3 Experimentação animal

Neste trabalho foram utilizados 06 camundongos C57BL/6 (sendo 5 fêmeas e 1 macho) para a geração de MEFs, e 30 camundongos fêmeas NOD.Cg-Prkdcscid

Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) de 8 a 10 semanas de idade para os ensaios de reconstituição hematopoética e de formação de teratomas. Em todos os experimentos os camundongos foram avaliados diariamente quanto ao seu estado de saúde (hidratação, alimentação e mobilidade). Os animais que demonstraram desconforto, incômodo, apatia, ou outros problemas relativos a sua hidratação, alimentação e mobilidade devido aos procedimentos experimentais foram eutanasiados para evitar sofrimento. O projeto e os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê Ético de Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo n° 148/2015) (ANEXO III), e estão em acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

4.2 Linhagens celulares e culturas primárias

4.2.1 Células-tronco embrionárias humanas

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

As colônias de CTEhs foram repicadas a cada 7 dias ou quando fazia-se necessário, ou seja, quando as colônias estavam grandes com ou sem sinais de diferenciação. O repique foi realizado manualmente com o auxílio de uma ponteira de 1.000µL, um fluxo laminar horizontal modelo FLH KE02-TROX classe 100/iso5 (TROX® Technik, PR, Brazil) e um microscópio invertido Olympus IX51 (Olympus, Toquio, Japan). A presença de sinais de diferenciação em determinadas colônias durante o cultivo das CTEhs não inviabilizou o uso dessas células. Neste caso, as regiões que ainda apresentavam aspecto indiferenciado eram

repicadas manualmente tentando-se evitar atingir as regiões diferenciadas das colônias. Após a fragmentação das colônias indiferenciadas, os fragmentos foram coletados em tubos tipo *Falcon*, centrifugados a 250 x **g** durante 5 min., ressuspensos em meio de cultivo novo e transferidos para novas placas de 6 poços na proporção de 1:3, ou seja, os fragmentos gerados pelo repique das colônias de cada poço eram transferidos para três novos poços sobre matrigel ou sobre MEF. Não foi empregado tratamento enzimático para o repique das colônias.

4.2.2 Fibroblastos de embriões murinos (MEFs)

As MEFs foram empregadas no cultivo e expansão de células-tronco embrionárias humanas *in vitro* e na realização dos ensaios de diferenciação hematopoética a partir de células embrionárias. As MEFs foram isoladas de fetos de fêmeas C57BL/6 prenhes entre os dias 13.5 e 14.5 de gestação. As fêmeas prenhes foram eutanasiadas com sobredose anestésica lidocaína 1% (7mg/kg) e tiopental (150mg/Kg) via intraperitoneal. Os fetos foram isolados com instrumentos cirúrgicos estéreis, decaptados e tiveram o fígado extraído e descartado. O restante dos tecidos somáticos foi lavado em PBS 1X com 1% de antibiótico/antimicótico (Sigma-Aldrich, MO, USA) e digeridos com Tripsina-EDTA 0,2% (Sigma-Aldrich, MO, USA). Após centrifugação por 5 minutos a 250 x **g**, as células foram avaliadas quanto a sua concentração e plaqueadas na densidade de 1-3x10^6 por garrafa de 75cm^2 (passagem 0, P0) em meio DMEM *High Glucose* (Gibco, NY, USA) 10% SFB (HyClone, UT, USA) suplementado com 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1% de L-glutamina (Gibco, NY, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA), com troca do meio de cultivo a cada 3-4 dias. As MEFs foram utilizadas para cultivo de CTEhs e ensaios de diferenciação na 3ª passagem (P3).

4.2.3 Células-tronco hematopoéticas de sangue de cordão umbilical

As células-tronco hematopoéticas de sangue de cordão umbilical foram isoladas por meio de centrifugação por gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque® (Gibco, NY, USA). Para isso, 10mL de sangue de cordão umbilical foi transferido para tubos de centrífugas de 50 mL e acrescido de 20mL de PBS 1X e 13mL de Ficoll. O material foi submetido a centrifugação a 500 x **g** por 30 minutos para promoção do gradiente de densidade, separação das populações celulares e obtenção do *buffy coat.* O *buffy coat* contendo todas as células mononucleares presentes no sangue de cordão umbilical foi coletado e transferido para um

novo tubo de centrífuga, lavado duas vezes com PBS 1X por meio de centrifugação a 250 x **g** por 10 minutos. Ao final, as células obtidas foram criopreservadas na concentração de $1x10^7$ em meio de congelamento constituído por 90% de soro fetal bovino (HyClone, UT, USA) + 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, MO, USA), e foram caracterizadas quanto à sua capacidade funcional *in vitro* e *in vivo*, propriedades imunofenotípicas e morfológicas.

4.3 Cultura e diferenciação das células-tronco embrionárias humanas em células-tronco/progenitoras hematopoéticas

CTEhs mantidas em cultura em estado indiferenciado foram repicadas em grandes fragmentos e transferidas para placas de 6 poços (pré-tratadas com gelatina 0,1% [Sigma-Aldrich, MO, USA]) sobre uma camada de MEFs inativadas com mitomicina-C (Sigma-Aldrich, MO, USA) em 1mL de meio DMEM/F-12 (Gibco, NY, USA) suplementado com 15% de *Knockout Serum Replacement* (Gibco, NY, USA), 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1% de Lglutamina (Gibco, NY, USA), 0,1 mM β-mercaptoetanol (Gibco, NY, USA), 5 ng/mL de basic-FGF (Peprotech, NJ, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA) por 4 horas para que as colônias aderissem melhor ao *feeder*. Após, foi adicionado mais 1mL do mesmo meio de cultivo por mais 20 horas para adaptação das colônias às novas condições. Em seguida, iniciou-se o processo de diferenciação das células (D+0) com meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *High Glucose* (Gibco, NY, USA) 10% Soro Fetal Bovino (SFB) (HyClone, UT, USA) (suplementado com 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1% de L-glutamina (Gibco, NY, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA)) suplementado com BMP4 (25ng/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA), SCF (100ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), TPO (25ng/mL) (Peprotech, NJ, USA) e VEGF (25ng/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA) durante os três primeiros dias. Decorridos os três primeiros dias (D+3), as colônias de CTEhs aderidas às MEFs foram cultivadas em meio DMEM *High Glucose* (Gibco, NY, USA) 10% SFB (HyClone, UT, USA) (suplementado com 1% de aminoácidos não-essenciais (Gibco, NY, USA), 1% de Lglutamina (Gibco, NY, USA) e 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco, NY, USA)) suplementado com SCF (100ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), G-CSF (20ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), IL-3 (20ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), IL-6 (20ng/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA), EPO (5UI/mL) (Sigma-Aldrich, MO, USA), IGF-I (20ng/mL) (Peprotech, NJ, USA) e FLT3L (20ng/mL) (Peprotech, NJ, USA), trocando 2/3 desse segundo

meio de cultivo a cada três dias, sendo que após os três dias de cultivo no segundo meio de diferenciação, a concentração de EPO foi reduzida para 3UI/mL. O ensaio foi realizado na mesma placa do início ao fim, e não foi preciso realizar a passagem das colônias para novas placas, uma vez que as MEFs aderem firmemente às placas e nela permanecem aderidas por 20-30 dias.

4.4 Caracterização imunofenotípica e funcional das células-tronco

4.4.1 Citometria de fluxo

A imunofenotipagem das hCTEs foi realizada por citometria de fluxo com a utilização de anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos presente na membrana citoplasmática ou nuclear da célula. Para a identificação dessas células foi montado um painel imunofenotípico contendo os marcadores de pluripotência e hematopoéticos linhagem-específicos. Foi realizada a imunofenotipagem das CTEhs indiferenciadas e das células hematopoéticas obtidas em diferentes períodos da diferenciação. A aquisição dos eventos foi feita com os citômetros FACSCalibur™ e BD FACSAria™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados com os *softwares* CELLQuest™ e BD FACSDiva™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), adotando-se a metodologia de exclusão de *doublets* baseada na avaliação de área por tamanho (FSC-A x FSC-H).

Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais (BD Bioscienes, MD, USA): CD45, CD16, CD38, CD20, CD43, CD31, CD45, CD71, CD235a, CD33e Sox2 conjugados com FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*); CD34, CD43, CD71, CD15, CD19, CD56, CD8, CD11b, CD14, CD235a, CD3, CXCR4, KDR e AC133 conjugados com PE (do inglês, *phycoeritrin*); CD34, CD117, CXCR4, CD4 e CD3 conjugados com PerCP (do inglês, *peridinin chlorophyll*), CD45, CD90, CD13, CD8 e CD4 conjugados com APC (do inglês, *allophycocyanin*). Como controles, para avaliar marcações inespecíficas, foram utilizados isotipos controles de imunoglobulinas G conjugados com FITC, PE, PerCP e APC.

Para a realização dessa técnica, alíquotas de 100µL de suspensão celular contendo 10^5 células foram colocadas em tubos de poliestireno 12 x 75mm previamente identificados com os diferentes marcadores. Logo após, foram adicionados 5µL dos anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos e as amostras foram incubadas em ambiente escuro, a temperatura ambiente (TA), por 15 min. Após, foi adicionado 1mL de PBS 1X em cada tubo e

as amostras foram centrifugadas a 500 x ***g*** por três minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, o *pellet* de cada tubo foi ressuspenso em 150µL de PBS 1X e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

4.4.2 Análise morfológica por coloração com Giemsa

Para coloração com Giemsa, as células foram centrifugadas a 500 x **g**, o sobrenadante foi desprezado, as células contadas e confeccionadas lâminas por *Cytospin* (200 x **g** por 10 minutos) com concentração de 10^5 células/poço. Em seguida, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 5 minutos, a TA, lavadas com água milli-Q e deixadas secar a TA. Depois de secas, as lâminas foram cobertas com solução de Giemsa (Sigma-Aldrich, MO, USA) diluída 1:30 em tampão fosfato (pH 7,4) durante 5 minutos, a TA e, em seguida, lavadas com água milli-Q, deixadas secar a TA e analisadas ao microscópio óptico de luz (Olympus Optical, Toquio, Japan) com objetiva de imersão (100X).

4.4.3 Microscopia confocal e imunofluorescência

As células foram fixadas com paraformaldeído 4% (Sigma-Aldrich, MO, USA) por 5 minutos, e em seguida, lavadas duas vezes em PBS 1X durante 10 minutos. As células foram, então, incubadas em solução de glicina 0,1 M (Pharmacia Biotech, AB, USA) durante 30 minutos, lavadas duas vezes em PBS 1X, e permeabilizadas com Triton-X-100 (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 0,3% em PBS 1X, por 10 minutos. Logo em seguida, as células foram lavadas por três vezes com PBS 1X por 5 minutos, e foi realizado o bloqueio dos sítios inespecíficos das células com solução de albumina bovina 1% (Sigma Aldrich, MO, USA) diluída em PBS 1X durante 1 h a TA. Após, as células foram incubadas com 250 µL da solução contendo o anticorpo (diluído em solução de albumina bovina na concentração de 1µg/100µL) desejado por 1 h em câmara úmida e a TA, e, em seguida, lavadas 5 vezes com PBS 1X. Para marcações com anticorpos não-conjugados foi realizada uma segunda incubação com 250 µL do anticorpo secundário previamente diluído. Logo após, as amostras foram lavadas 10 vezes com PBS 1X e os núcleos das células corados com 250 µL da solução de DAPI (dihidrocloreto de 4,6 diamino-2-fenilindol [Abbott Molecular Inc., IL, USA]) na concentração de 100ng/mL por 10 minutos, a TA, em câmara úmida e escura. As lâminas foram, então, lavadas novamente por 10 vezes com PBS 1X e imersas uma vez em água destilada. Após, as lâminas foram montadas com Fluoromount G (Electron Microscopy

Sciences, PA, USA) e as células marcadas foram visualizadas com o auxílio do microscópio confocal Carl Zeiss Modelo LSM 710 (Carl Zeiss, Jena, Germany) e as imagens processadas com o *software* Zen 2008 *version* 2.5 (Carl Zeiss). Para cada amostra analisada, um controle negativo foi utilizado com os mesmos parâmetros de captura.

4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

O material foi fixado por 48 horas em Karnowisky, lavado 3 vezes em tampão fosfato 0,1M (pH 7,4) por 10 minutos, perfazendo um total de 30 minutos de imersão. Após, o material foi pós-fixado em solução aquosa de tetróxido de ósmio 4% (Polyscience, Inc. USA) por 2 horas e lavado 3 vezes em tampão fosfato a 0,1M (pH 7,4) novamente por 10 minutos. Procedeu-se então à desidratação do material em baterias de 15 minutos em concentrações crescentes de álcool (50%, 70%, 80%, 90% e 95%) passando em seguida em álcool absoluto por 4 vezes de 15 minutos. O ponto crítico foi obtido retirando-se todo o álcool do material através do aparelho (CPD 020 – BLAZERS UNION) deixando-o totalmente seco para metalização com ouro. Ao final, as peças foram fixadas em “stubs” de alumínio com cola de carbono, deixadas em estufa por 12 horas para secagem e submetidas a banho de ouro com metalizador (EMITECH – K 550). As análises e eletromicrografias foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura (LEO – 435 VP).

4.4.5 Ensaio clonogênico

Para avaliar o seu potencial clonogênico *in vitro*, as células hematopoéticas produzidas foram cultivadas em meio semi-sólido MethoCult® 4034 Optimum (StemCell Technologies, WA), conforme recomendações do fabricante, durante 14 dias. Após, as colônias foram contadas manualmente e classificadas de acordo com a sua morfologia e constituição dos elementos hematopoéticos.

4.4.6 Ensaio de formação de teratomas

Para o ensaio de avaliação do potencial teratogênico das células, as colônias de células-tronco embrionárias humanas indiferenciadas (controle positivo) foram dissociadas mecanicamente em fragmentos menores, e aproximadamente 100-150 fragmentos (aproximadamente 1-2x10^5 células) serão misturados e homogeneizados com 300µL de

matrigel e injetados via subcutânea em camundongos machos ou fêmeas NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) (adaptado de Fraga *et al.*, 2011). Os animais do grupo controle negativo receberam apenas matrigel subcutaneamente. Todos os animais de todos os grupos foram previamente anestesiados com isofluorano 2% para a realização do procedimento de injeção subcutânea. Ao término das 8 semanas, os camundongos foram eutanasiados com sobredose anestésica (tiopental (150mg/Kg) e lidocaína 1% (7mg/kg), via intraperitoneal. O material injetado foi dissecado, fixado em formalina 4% por 24 horas, equilibrados em sucrose 30% por 48 horas e congelados em OCT. Foram confeccionadas lâminas pré-tratadas com poli-lisina contendo cortes entre 5 e 20µm e coradas com hematoxilina e eosina. Os grupos foram constituídos por N=5.

4.5 Transplante de células-tronco hematopoéticas em camundongos imunodeficientes NSG

Camundongos fêmeas NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NSG) de 8 a 10 semanas de idade, foram subletalmente irradiadas com 125, 150, 175 e 200 cGy (RS-2000 – Rad Source) sob condições de barreira sanitária rigorosa. Logo após a irradiação, os animais receberam a cada 12 horas a aplicação de enrofloxacina subcutânea na dose de 5 mg/kg (2,27mg/ml) durante 5 dias. Os animais foram anestesiados 24 horas após a irradiação em uma câmara de indução com isofluorano 2% e transplantados por via intravenosa (via retro-orbital) com o auxílio de uma agulha de insulina inserida no canto medial do olho, com 200µL de suspensão celular contendo $7{,}5\times10^5$ células mononucleares de cordão umbilical humano (grupo controle positivo) ou células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas a partir da digestão das colônias aos 24 dias de diferenciação (grupo experimental). Foi realizado um hemograma controle nos animais antes e após a irradiação para avaliar o grau de aplasia. A avaliação da enxertia foi realizada por citometria de fluxo por meio da análise do mosaicismo com células humanas $CD45^+$ na medula óssea de ossos longos, sangue periférico, baço e fígado dos camundongos transplantados após 6 semanas. Para isso, os animais foram eutanasiados com sobredose do anestésico lidocaína 1% (7mg/kg) e tiopental (150mg/Kg) via intraperitoneal.

4.6 Teste para detecção de micoplasma

Os testes foram realizados pelo Laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto. Foi utilizado o kit comercial MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza) baseado em quimioluminescência. Os testes foram realizados de acordo com as recomendações do fabricante.

4.7 Análise Estatística

As análises estatísticas e gráficos foram realizados com o auxílio do *software GraphPad Prism*, V4.03 (GraphPAD Software Inc., USA) para o sistema operacional Windows®. Foi adotado o nível de significância de 5% para as análises, ou seja, foram considerados estatisticamente significativos *p*-valores menores ou iguais a 0,05.

4.8 Desenho experimental

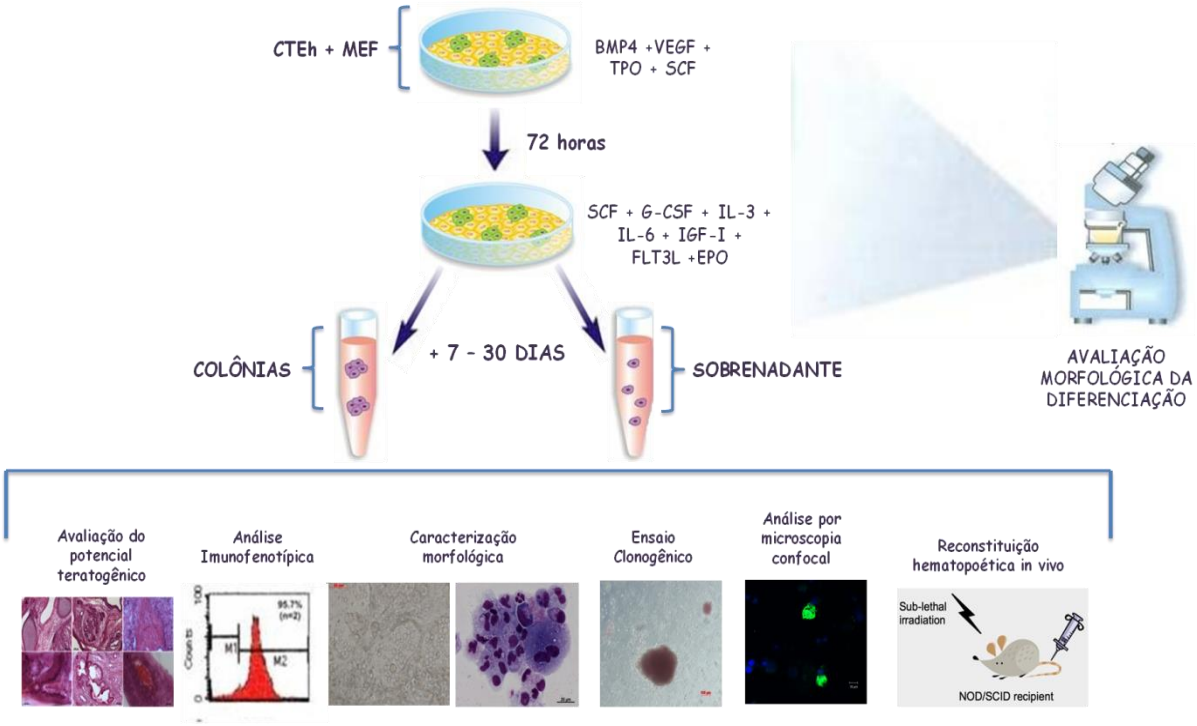


Figura 3 - Desenho esquemático ilustrando as atividades experimentais desenvolvidas neste trabalho. As CTEhs foram diferenciadas em sistema de co-cultivo com MEFs em meio de diferenciação suplementado com BMP4, VEGF, TPO e SCF nas 72 horas iniciais para a indução mesodérmica e, após esse período, o conjunto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

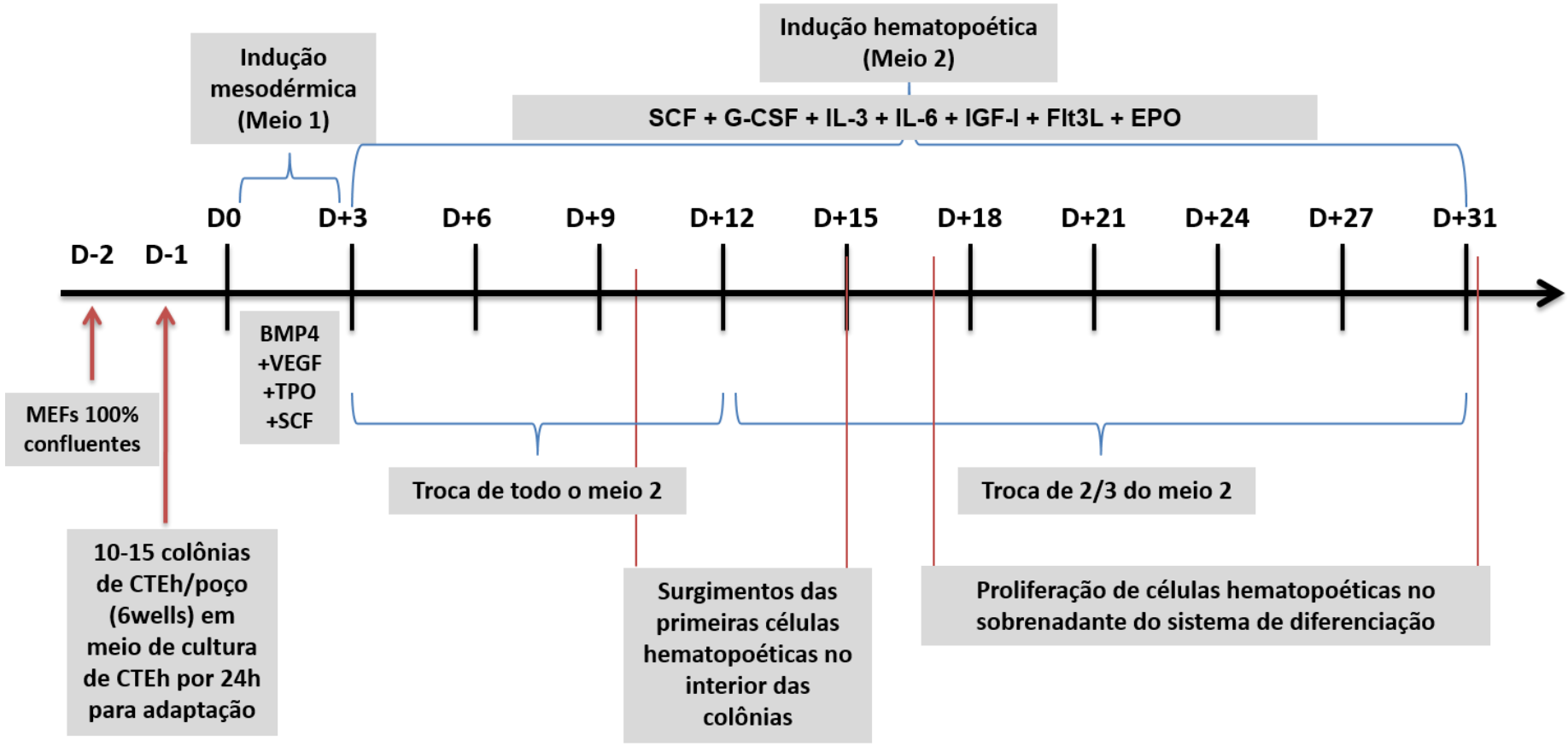


Figura 4 – Cronologia da diferenciação hematopoética de CTEhs em sistema de cocultivo com MEFs.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Cultivo e expansão das linhagens de CTEhs livres de antibiótico e micoplasma.

Para a realização dos experimentos geramos bancos de CTEhs criopreservadas que foram cultivadas sem antibiótico e submetidas a testes sistemáticos para detecção de micoplasma para garantir que todos os experimentos desenvolvidos com estas linhagens não tivessem influência desse microrganismo e da presença de antibiótico nos resultados.

Foram montados bancos das CTEhs das linhagens H1, H9 *feeder*-independente e HuES-3 (Figuras 5, 6 e 7).

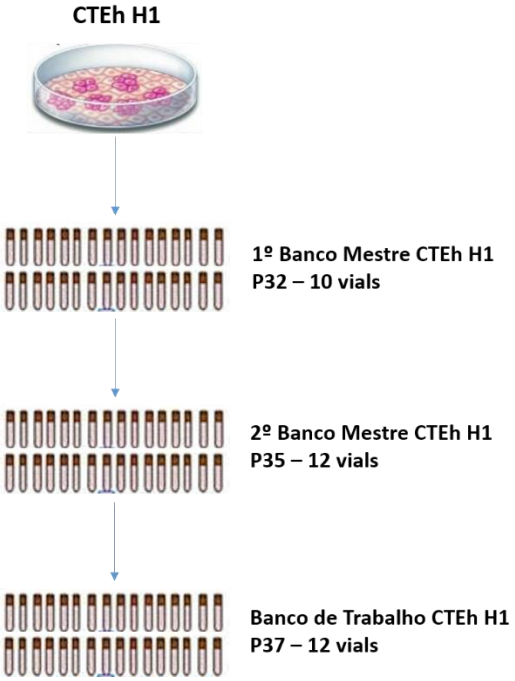


Figura 5 – Banco de CTEhs H1. A linhagem de CTEh H1 foi a primeira a ser adquirida pelo nosso laboratório e é a mais amplamente empregada nos nossos est8uudos com células embrionárias. Foi descongelado um vial do banco não-testado em passagem 29 e montados dois bancos mestres, um em P32 e outro em P35, e um banco de trabalho em passagem 37.

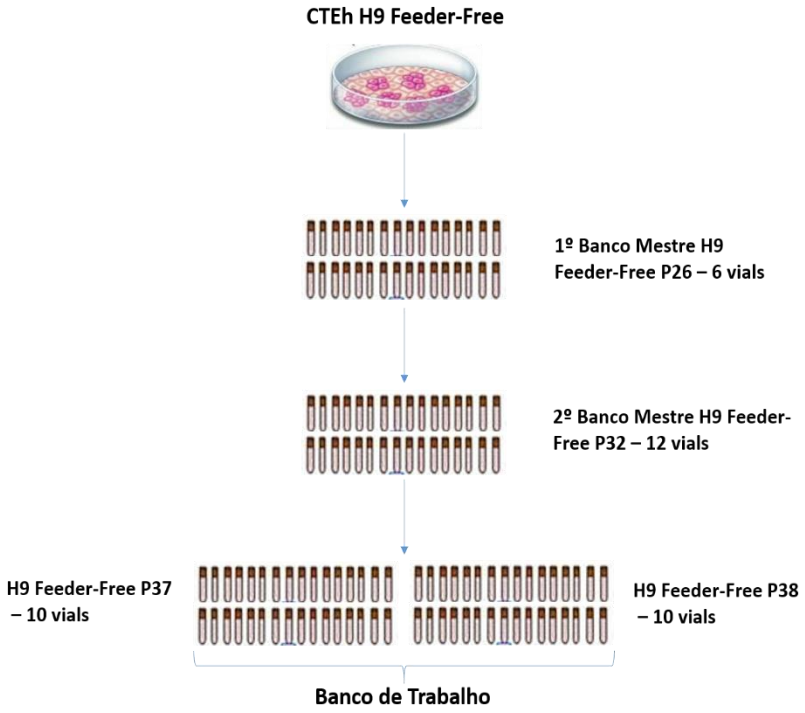


Figura 6 – Banco de CTEhs H9 *feeder*-independente. Foi descongelado um vial do banco não-testado em passagem 22 e montados dois bancos mestres, um em P26 e outro em P32, e um banco de trabalho constituído por células em passagens 37 e 38.

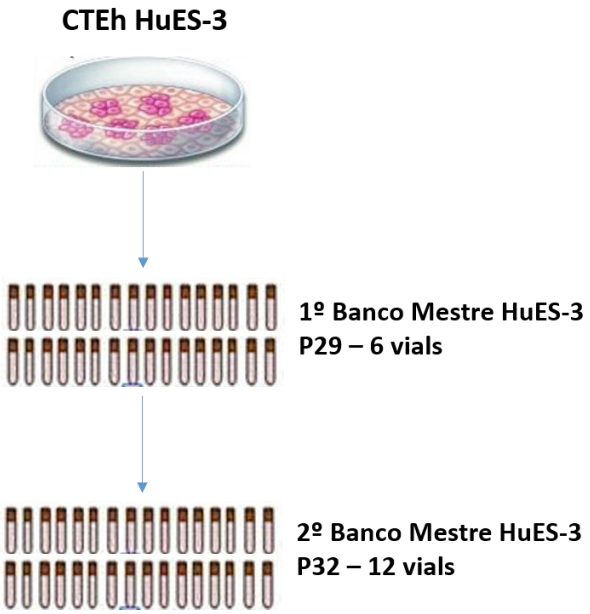


Figura 7 – Banco de CTEhs HuES-3. A linhagem de CTEh HuES-3 foi a última das linhagens a ser cultivada e expandida nas condições descritas. Foi descongelado um vial do banco não-testado em passagem 26 e montado um banco mestre em P29 e outro em P32.

Nenhuma linhagem de CTEh cultivada nessas condições apresentou contaminação por micoplasma quando avaliadas pelo MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza) (Anexos V e VI).

5.2 Caracterização morfológica das linhagens de CTEhs H1, HuES-3 e H9 *feeder*-independente

As 3 linhagens de CTEhs foram expandidas e avaliadas quanto às suas características morfológicas durante o cultivo (Figura 8).

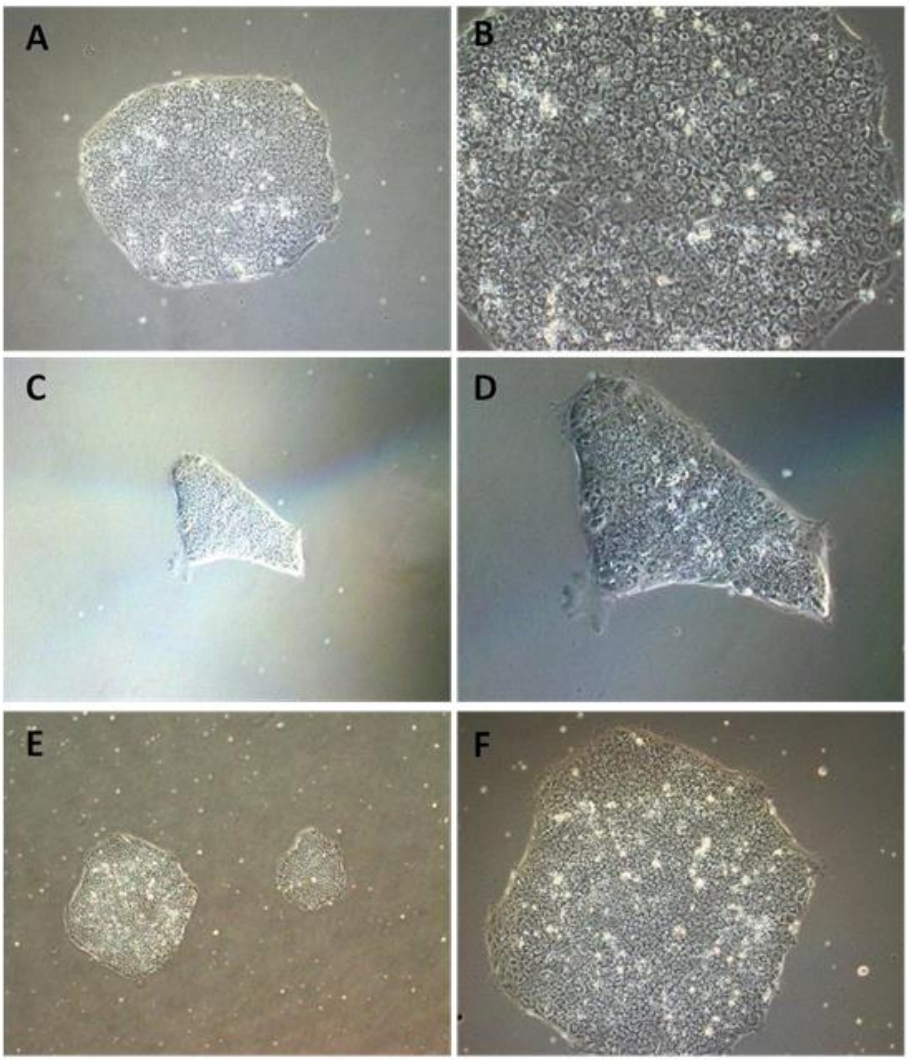


Figura 8 – Avaliação morfológicas das CTEhs cultivadas *in vitro*. Todas as linhagens de células pluripotentes HuES-3 (**A** e **B**), H1 (**C** e **D**), e H9 *feeder*-independente (**E** e **F**) apresentaram características típicas de células pluripotentes indiferenciadas: células pequenas, citoplasma escasso, nucléolo evidente e crescimento com formação de colônias. **A**, **C** e **E**, 40x. **B**, **D** e **F**, 200x.

Durante o cultivo, ficou evidente que as linhagens apresentam comportamentos diferentes no que se refere ao seu crescimento e potencial de diferenciação espontânea. As linhagens de CTEhs HuES-3 e H1 apresentam morfologia mais semelhantes entre si. As colônias são constituídas por células maiores e núcleos grandes, e crescem mais rapidamente se comparadas com as células da linhagem H9 *feeder*-independente que apresentam crescimento mais lento e cujas colônias são constituídas por células menores que as de HuES-3 e H1.

Além disso, mesmo quando cultivadas sobre matrigel em meio mTeSR® as linhagens de CTEhs apresentam diferenças com relação ao seu potencial de diferenciação espontânea *in vitro*. CTEhs H1 diferenciam-se mais em células fibroblastóides (Figura 9A), enquanto CTEhs H9 *feeder*-independentes formam estruturas semelhantes a rosetas neurais (Figura 9B). As CTEhs HuES-3 apresentam potencial de diferenciação espontânea tanto em células fibroblastóides (Figura 9C) quanto em células com morfologia semelhante a células neurais (Figura 9D).

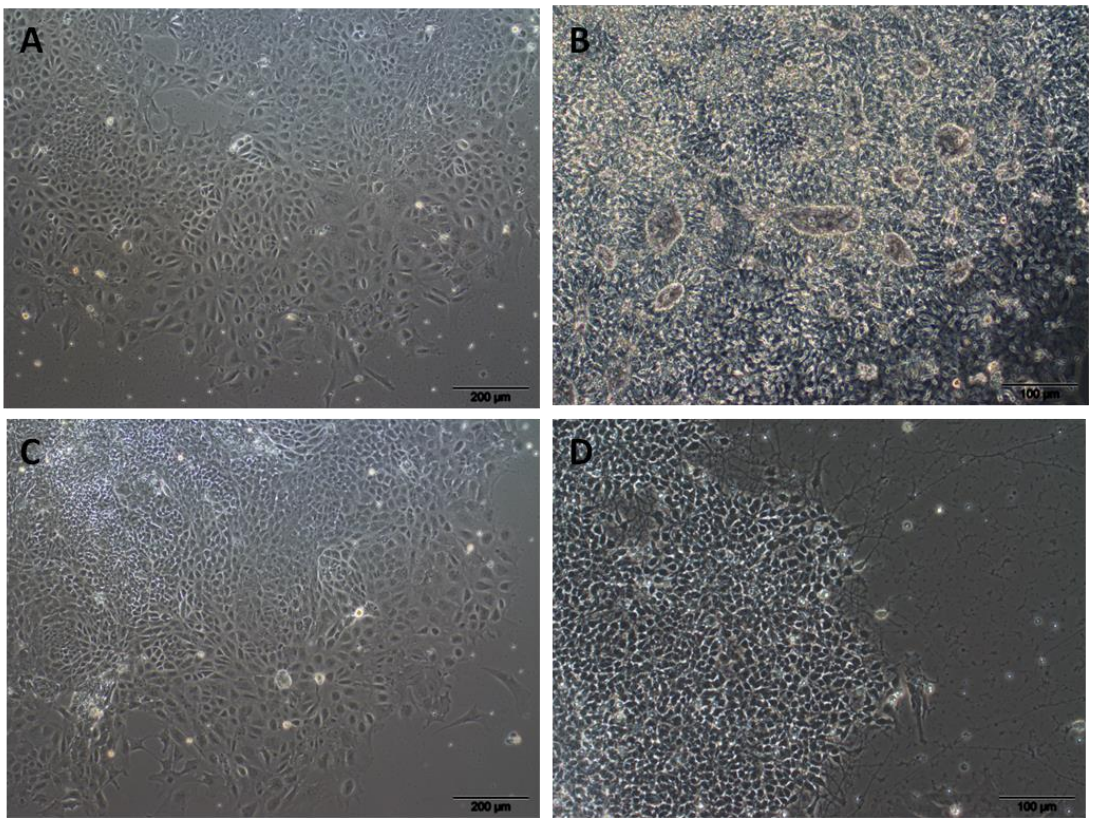


Figura 9 – Diferenciação espontânea das linhagens de CTEhs. CTEhs cultivadas *in vitro* sobre matrigel em meio mTeSR apresentam diferentes propriedades de crescimento e diferenciação espontânea. **A**, Colônias fibroblastóides diferenciadas de CTEh H1. **B**, Estruturas semelhantes a rosetas neurais diferenciadas de CTEh H9 *feeder*-independente. **C** e **D**, Fibroblastos e células neurais-*like*, respectivamente, geradas a partir da diferenciação espontânea de CTEh HuES-3. **A** e **C**, 100x. **B** e **D**, 200x.

5.3 Avaliação imunofenotípica e de pluripotência das CTEhs

CTEhs H1 foram mantidas em cultivo por mais de 40 passagens e mantiveram morfologia indiferenciada (Figura 10). Durante a sua expansão, essas células foram avaliadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo nas passagens 26, 38 e 42 (Figura 11). As análises revelaram elevado percentual de células positivas para os marcadores de pluripotência Sox2, Nanog e SSEA-4 (Figura 11), e negativas para marcadores de células hematopoéticas (CD34, CD45, CD117, CD43 e 11b) e endoteliais (CD31) (Figura 12).

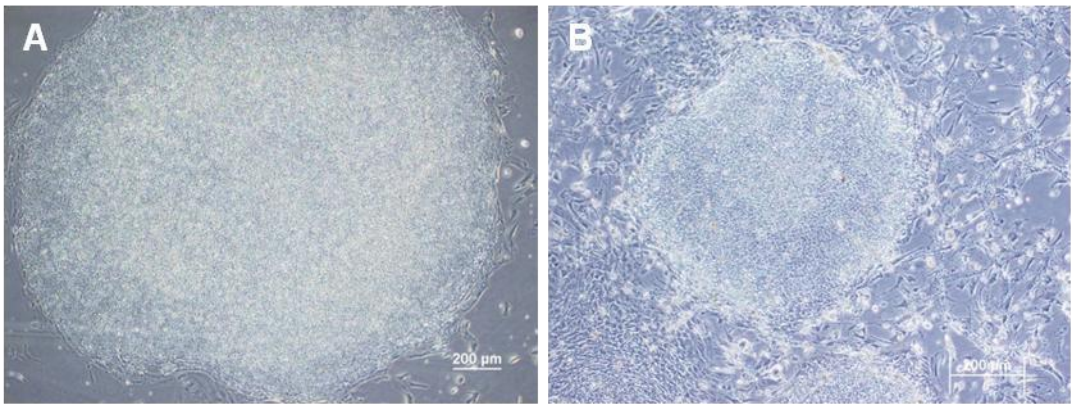


Figura 10 – Morfologia das CTEhs H1 em cultura. Análise por microscopia de contraste de fase mostra a presença de colônias de CTEhs com a morfologia indiferenciada característica em cultivo sobre matrigel **(A)** e sobre MEFs **(B)**. **A** e **B**, 40x.

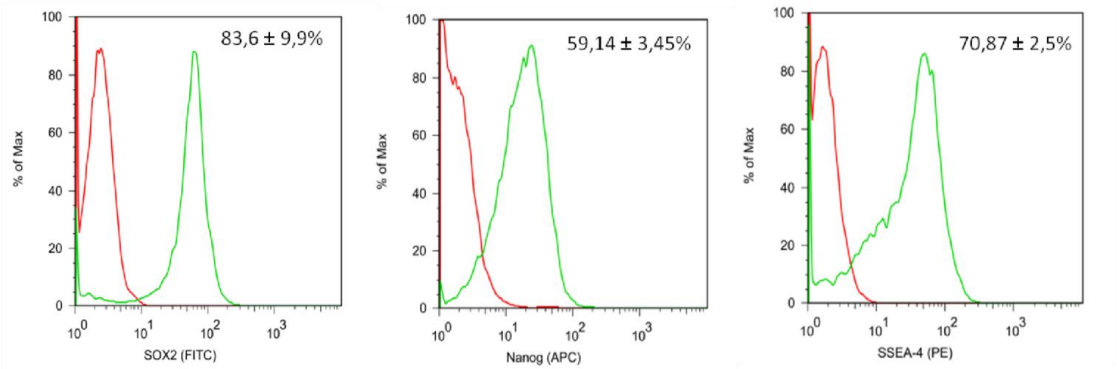


Figura 11 – Perfil Imunofenotípico das CTEhs H1 para marcadores de pluripotência. Média da positividade das CTEhs nas passagens P26, P38 e P42 para os marcadores de pluripotência. Observa-se elevados níveis para os marcadores SOX2, Nanog e SSEA-4. N=3.

De maneira semelhante, CTEhs HuES-3 (Figura 13) e H9 *feeder*-independente (Figura 14) também apresentaram elevado percentual de células positivas para marcadores de pluripotência SSEA-4, Nanog, Sox2 e Oct 3/4.

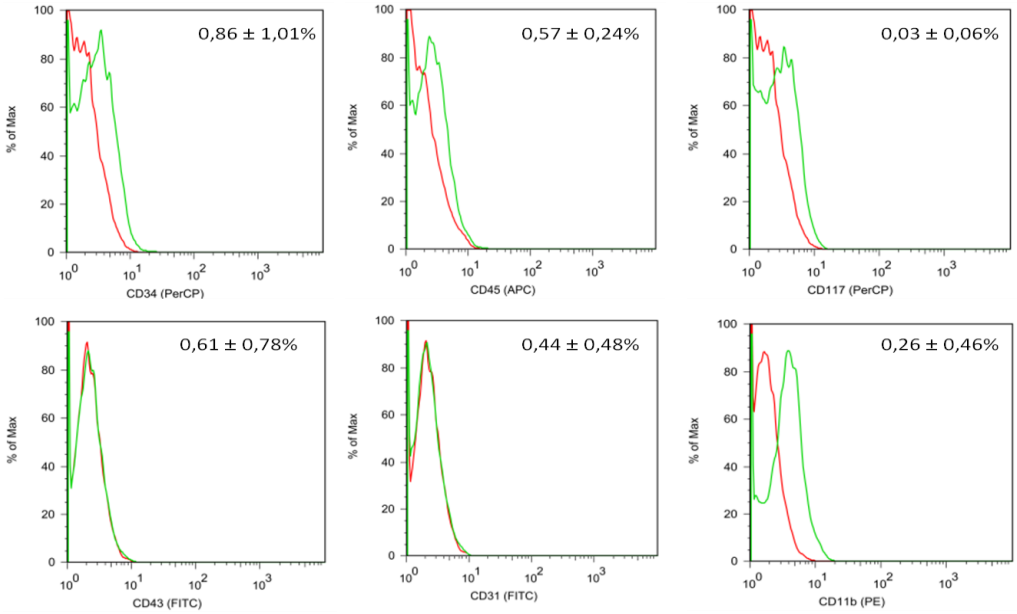


Figura 12 – Perfil imunofenotípico das CTEhs H1 para marcadores hematopoéticos e endoteliais. As CTEhs indiferenciadas não expressam os marcadores hematopoéticos (CD34, CD45, CD117, CD43 e CD11b) e endotelial (CD31). N=3.

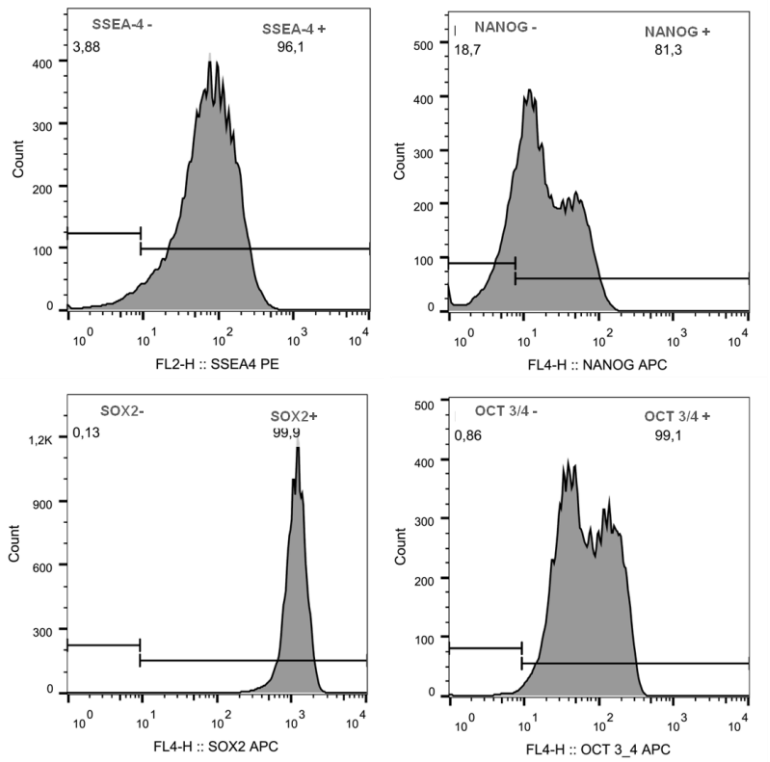


Figura 13 – Caracterização imunofenotípica das CTEhs HuES-3. As análises por citometria de fluxo revelaram que a quase totalidade das células são positivas para os marcadores de pluripotência SSEA-4, Nanog, Sox2 e Oct3/4. N=1.

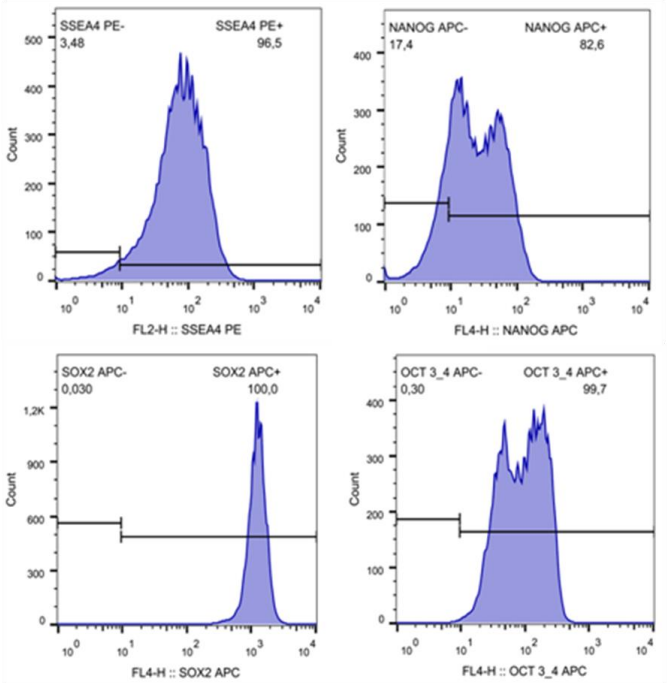


Figura 14 – Caracterização imunofenotípica das CTEhs H9 *feeder*-independente. As análises por citometria de fluxo revelaram que a quase totalidade das células são positivas para os marcadores de pluripotência SSEA-4, Nanog, Sox2 e Oct3/4. N=1.

Ensaios adicionais para avaliação da pluripotência dessas células demonstraram que todas as linhagens embrionárias foram capazes de formar corpos embrióides *in vitro* (Figura 15). Os corpos embrióides são estruturas esféricas formadas por células pluripotentes cultivadas em placas de baixa aderência que permitem o desenvolvimento de diversos tipos celulares e tecidos em seu interior.

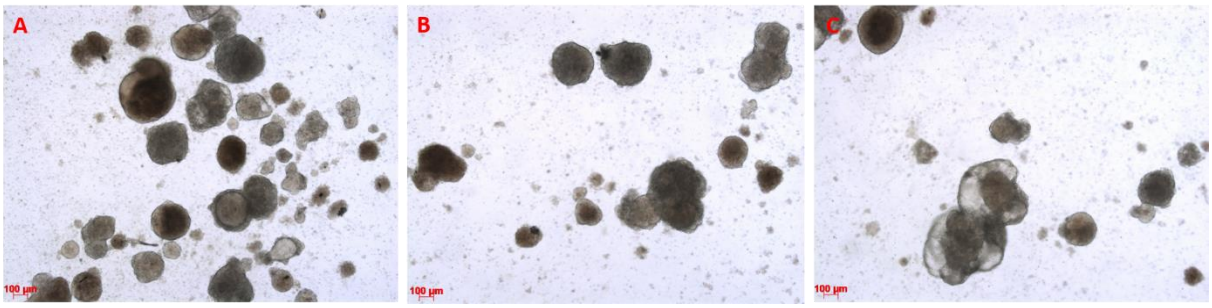


Figura 15 – Avaliação do potencial pluripotente das CTEhs *in vitro*. As três linhagens de CTEhs foram capazes de formar corpos embrióides, quando cultivadas em condições próprias em placas de baixa aderência. **A**, H1, 40x; **B**, HuES-3, 100x, **C**, H9 *feeder*-independente, 200x.

Outra característica importante e que define o potencial plutipotente das CTEhs cultivadas *in vitro* é a sua capacidade de gerar células e tecidos oriundos dos três folhetos embrionários (ecto, meso e endoderma), por meio da formação de teratomas *in vivo*. Foram

realizados ensaios de formação de teratomas em camundongos imunodeficientes e foi observado que todas as três linhagens de CTEhs são capazes de se diferenciarem em tecidos de origem endodérmica, mesodérmica e ectodérmica (Figuras 16, 17 e 18).

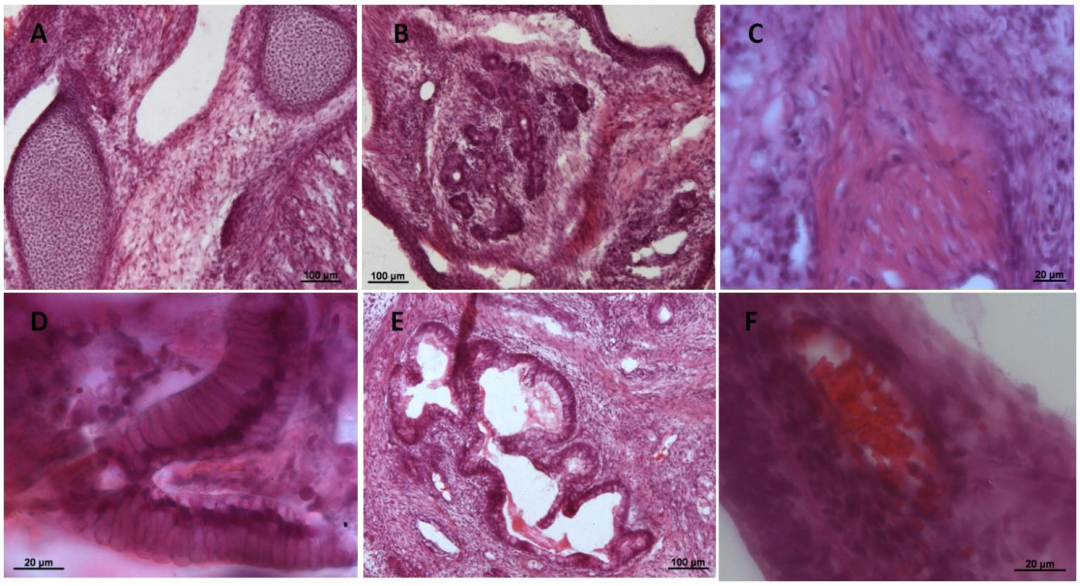


Figura 16 – Avaliação do potencial de formação de teratomas das CTEhs H1. As CTEhs H1 foram capazes de formar teratomas quando injetadas em camundongos imunodeficientes NOD/Scid, demonstrando o seu potencial pluripotente *in vivo*. A, Cartilagem. B, estruturas de origem ectodérmica. C, tecido muscular. D, tecido epitelial. E, epitélio intestinal. F, vaso e células sanguíneas. A, B e E, 100x. C, D e F, 1.000x. Coloração com hematoxilina e eosina.

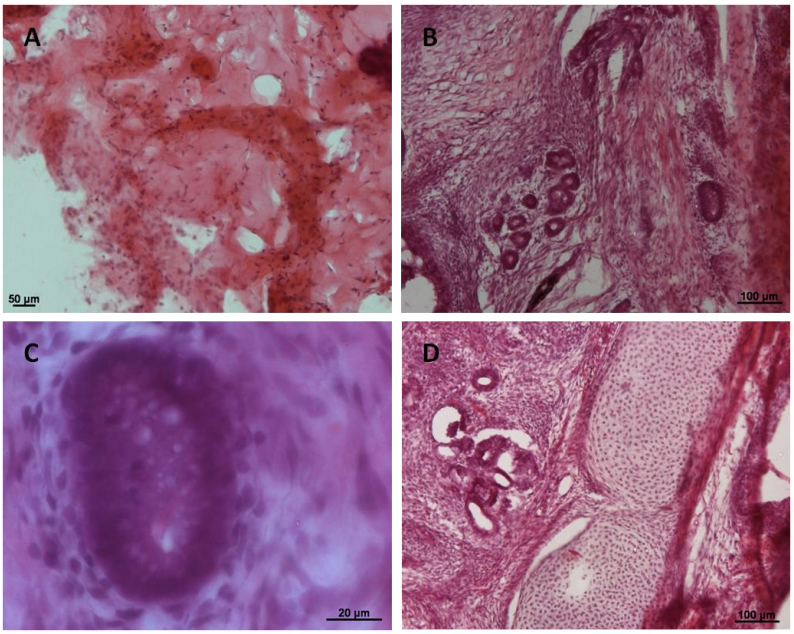


Figura 17 – Avaliação do potencial de formação de teratomas das CTEhs HuES-3. As CTEhs HuES-3 foram capazes de formar teratomas quando injetadas em camundongos imunodeficientes NSG, demonstrando o seu potencial pluripotente *in vivo*. A, controle negativo. B, estruturas de origem ectodérmica. C, epitélio glandular. D, Cartilagem. A, 630x, B e D, 100x. C, 1.000x. Coloração com hematoxilina e eosina.

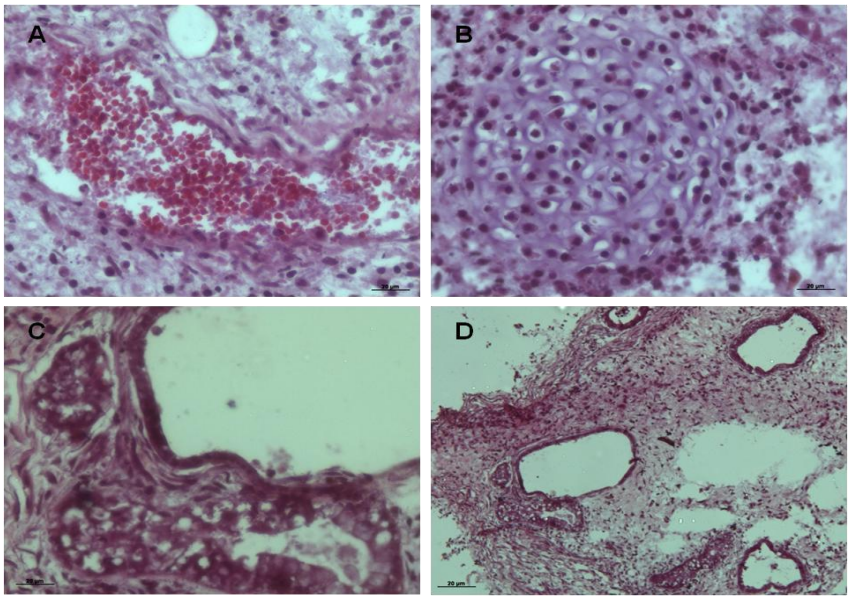


Figura 18 – Avaliação do potencial de formação de teratomas das CTEhs H9 *feeder*-independente. As CTEhs H9 *feeder*-independente também foram capazes de formar teratomas quando injetadas em camundongos imunodeficientes NSG. A avaliação histológica dos teratomas revelou a formação de vaso sanguíneo e sangue (A), cartilagem (B) e grande predominância de epitélio glandular (C e D), mas não revelou a presença de estruturas ectodérminas. Amplificação: 1.000x. Coloração com hematoxilina e eosina.

Os ensaios de formação de teratomas para as linhagens H9 *feeder*-independente e HuES-3 seguiram o mesmo protocolo utilizado para as CTEhs H1. Foi realizado por meio de injeção subcutânea das células em camundongos NSG e durou 2 meses. Foi observada uma abundante formação de tecidos diferenciados nos tumores originados pelas CTEhs H1 (Figura 16) e HuES-3 (Figura 17).

Os cortes histológicos dos teratomas formados pelas CTEhs H9 *feeder*-independente demonstraram a formação de tecidos mesodérmicos como vaso sanguíneo e sangue (Figura 18A), e cartilagem (Figura 18B). Entretanto, a formação desses tecidos foi escassa. A maior predominância foi de epitélio glandular (Figura 18C e 18D). Essa capacidade aumentada de formação de epitélio glandular em detrimento da formação de tecidos mesodérmicos e ausência de tecido ectodérmico, pode refletir uma ineficiência das CTEhs H9 *feeder*-independente cultivadas *in vitro* com relação à capacidade de diferenciação nos três folhetos embrionários, o que poderia influenciar na diferenciação em células hematopoéticas *in vitro*.

5.4 Diferenciação Hematopoética das CTEhs H1

Durante o desenvolvimento inicial do protocolo de diferenciação realizado no Mestrado (Costa, 2012), eu demonstrei que após o cocultivo da população CTEh da linhagem

H1 não diferenciada $CD34^-/CD45^-/CD31^-$ com células estromais de embriões murinos (MEFs) em meio de diferenciação por 31 dias, pode-se obter populações celulares hematopoéticas que expressam os antígenos CD45, CD43, CD31, e $CD34^{low}$.

Inicialmente, foram adicionadas citocinas indutoras da formação de mesoderma durante os três primeiros dias, como BMP4, VEGF, TPO e SCF. Este período inicial de diferenciação utilizando tais citocinas tem sido descrito na literatura como tempo ótimo para o surgimento e proliferação de células primitivas com potencial hematopoético e endotelial (Chadwick et al, 2003; Zhan *et al.*, 2004). Passadas as 72 horas iniciais da diferenciação mesodérmica, as células passaram a ser cultivadas em meio de diferenciação contendo sete citocinas hematopoéticas (SCF, EPO, IL-3, IL-6, G-CSF, FLT3L e IGF) para dirigir a diferenciação de forma mais específica. O uso dessas citocinas justifica-se pela tentativa de mimetizar a influência do microambiente hematopoético que atua através da secreção de fatores solúveis que induzem e controlam a hematopoese (Arai *et al.*, 2004; Lapidot *et al.*, 2005).

As células hematopoéticas começam a surgir na cultura entre o 10° e o 15° dia de diferenciação. No vigésimo dia de diferenciação já é evidente a formação de células hematopoéticas, que inicialmente formam colônias de células arredondadas, com baixa atividade proliferativa, descritas na literatura como *cobblestones* (Figura 19) (Oberlin *et al.*, 2002).

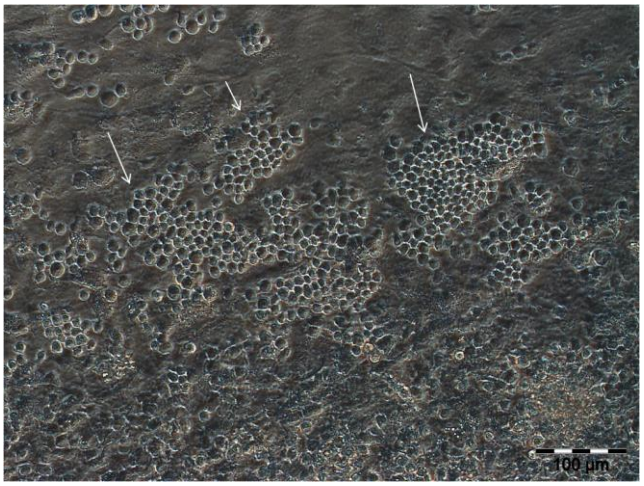


Figura 19 – *Cobblestones* orginados a partir da diferenciação de CTEhs H1 (D+20). Os cobblestones são descritos na literatura como colônias de células-hematopoéticas que abrigam células-tronco hematopoéticas *long-term*, com alto potencial de reconstituição hematopoética, porém com baixa atividade proliferativa. Estas colônias dão origem a células-tronco mitoticamente ativas (*short-term*) que proliferarão e se diferenciação em células progenitoras. Aumento de 200x.

As células originadas no interior dessas colônias entram em divisão celular, e à medida que se dividem elas se diferenciam em células-tronco/progenitoras hematopoéticas (CTHs/CPHs) com alto potencial proliferativo e de formação de progenitores linhagem-específicos. Essas células começam a proliferar no interior das colônias em íntimo contato com as células alimentadoras e com o "nicho" formado por outros tipos celulares que se diferenciaram a partir das CTEhs (figura 20A). Após 20 dias de iniciada a diferenciação, as CTHs/CPHs são mobilizadas para o sobrenadante e passam a proliferar também em suspensão (figura 20B).

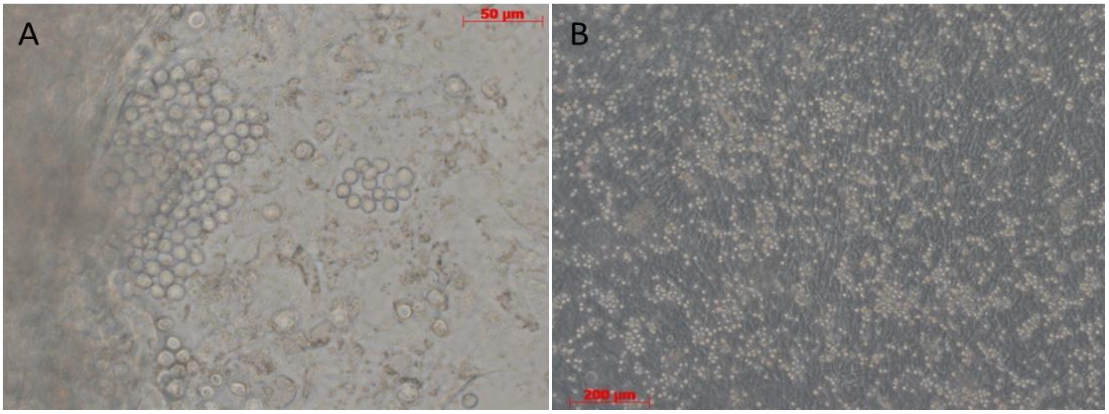


Figura 20 – Caracterização morfológica da diferenciação das CTEhs H1. A, surgimento das células hematopoéticas dentro das colônicas de CTEhs-H1 em diferenciação. **B**, CTHs/CPHs proliferando em suspensão. A, 200x; B, 100x. Microscopia de contraste de fase.

Foram realizadas vinte replicatas experimentais (ANEXO VII)[1] do protocolo de diferenciação com a linhagem H1 para verificar a reprodutibilidade do método e para melhor controlar as variáveis técnicas. Isso permitiu a obtenção de uma população de células mais homogênea e enriquecida em CTHs/CPHs. As células obtidas dessas diferenciações foram criopreservadas e montado um banco de células para a realização dos estudos de avaliação do potencial de reconstituição hematopoética em modelo murino nas etapas subsequentes.

A análise imunofenotípica por citometria de fluxo das células diferenciadas a partir de CTEhs da linhagem H1 demonstrou a consistência do protocolo na obtenção de células hematopoéticas que coexpressam os antígenos CD45, CD43, CD31 e CD34 (Figura 21). Aos 24 dias de diferenciação, já é possível observar o desenvolvimento de uma população celular

[1] No Anexo VII estão detalhadas as análises imunofenotípicas de 10 experimentos de caracterização das células hematopoéticas obtidas durante diferentes períodos da diferenciação. Os demais experimentos estão contidos na descrição do item "Resultados" e referem-se às caracterizações das células obtidas da diferenciação hematopoética das linhagens de CTEh HuES-3 e H9 *feeder*-independente, ou da padronização das diferenciações descritas nas tabelas 1 a 6, experimentos estes que foram realizados para avaliar variáveis da diferenciação e para coleta de células-tronco/progenitoras hematopoéticas para os ensaios de reconstituição hematopoética *in vivo*.

$CD45^{+}CD43^{+}CD31^{+}CD34^{low/-}$, que tem sido descrita como a primeira população de CTHs definitivas originadas a partir de células pluripotentes com grande potencial de reconstituição hematopoética em camundongos irradiados (Amabile *et al.*, 2013) (Figura 21).

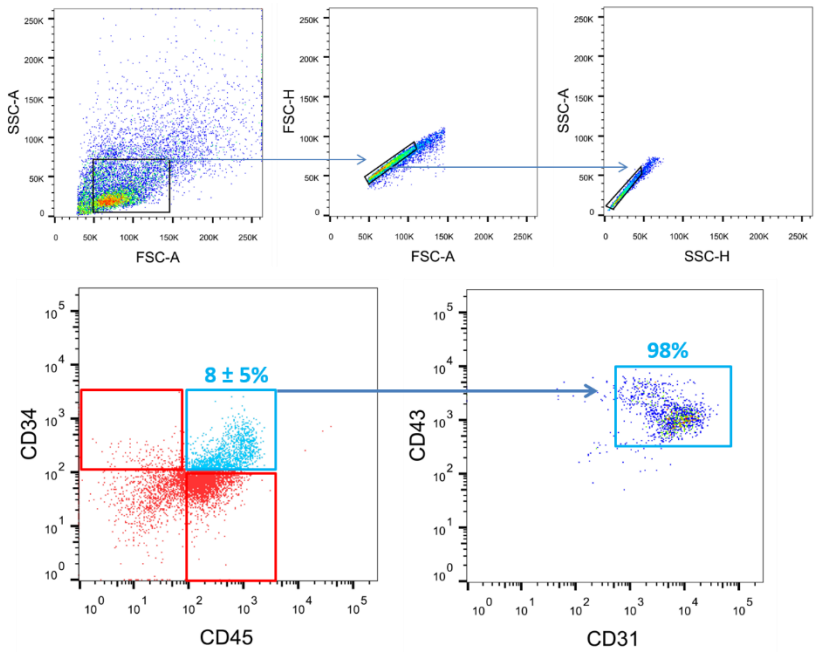


Figura 21 – Avaliação da coexpressão de marcadores hematopoéticos em células $CD45^{+}$ coletadas do sobrenadante do meio de diferenciação no dia 24. Aos 24 dias de diferenciação é possível obter uma população enriquecida em células-tronco/progenitoras hematopoéticas $CD45^{+}CD34^{+}$ que coexpressam CD43 e CD31, descrita como $CD45^{+}CD43^{+}CD31^{+}CD34^{low}$. N=4.

A análise do perfil imunofenotípico das células em diferenciação revelou a presença de populações de CTHs muito primitivas que coexpressam os marcadores CD133 e CD117 (*stem cell factor receptor*) com o marcador CD45 (Wang *et al.*, 2004) no 24º dia de diferenciação. Além disso, aproximadamente 20% das células hematopoéticas obtidas expressam CXCR4 (também conhecido como CXCL-12), uma molécula descrita como fundamental para a capacidade de domiciliamento e enxertamento das CTHs (Figura 22) (Lapidot *et al.*, 2005).

As células hematopoéticas produzidas pelo presente protocolo diferenciam-se progressivamente à medida que proliferam no sistema de cultivo. Aos 31 dias de diferenciação, a quase totalidade das células hematopoéticas obtidas do sobrenadante expressam em elevados níveis os marcadores CD45, CD43 e CD31, em contrapartida à redução de populações de células que expressam o marcador CD34 (Figura 23).

Análises adicionais acerca das populações hematopoéticas evidenciaram que as células geradas por este método de diferenciação são, marjoritariamente, das linhagens eritróide e mieloide, com coexpressão dos antígenos CD71, CD38, CD15 e CD16 (Figura 24).

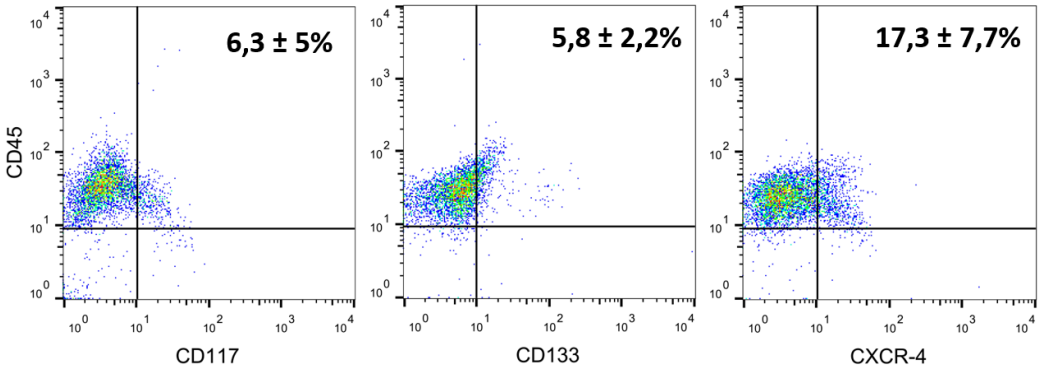


Figura 22 – Avaliação da coexpressão dos marcadores CD117, CD133 e CXCR-4 em células CD45⁺ coletadas do sobrenadante da diferenciação (D+31). Os marcadores CD117 e CD133 são coexpressos em aproximadamente 10% da população de células CD45+, ao passo que o marcador CXCR4 (CXCL-12) é coexpresso em 20% dessa população. N=4.

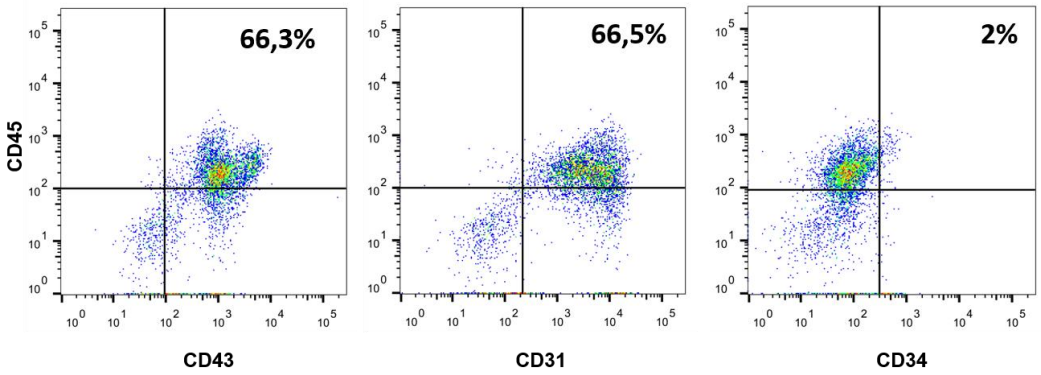


Figura 23 – Avaliação de população celular que expressa marcadores pan-hematopoéticos diferenciadas a partir de CTEhs-H1 (D+31). Aos 31 dias de diferenciação a quase totalidade das células obtidas do sobrenadante da diferenciação expressam os marcadores CD45, CD43 e CD31 à medida que perdem a expressão de CD34. N=6.

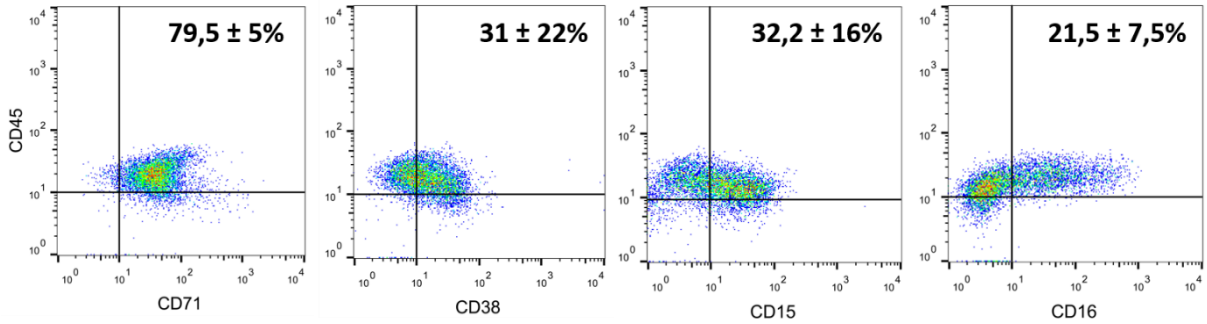


Figura 24 - Avaliação da coexpressão de marcadores hematopoéticos específicos em células CD45⁺ coletadas do sobrenadante do meio de diferenciação aos 31 dias. Verifica-se que as células CD45⁺ são em quase sua totalidade CD45⁺CD43⁺, CD45⁺CD31⁺ e CD45⁺CD71⁺, e aproximadamente 50% das células CD45⁺ coexpressam o marcador de célula hematopoética mais diferenciada (CD38) e marcadores da linhagem granulocítica (CD15, CD16). N=5.

Nós demonstramos ainda que o sistema de diferenciação é capaz de produzir células da linhagem linfóide. As análises por citometria de fluxo revelaram a presença de células que expressam os marcadores linfóides CD3, CD4 e CD8 (Figura 25).

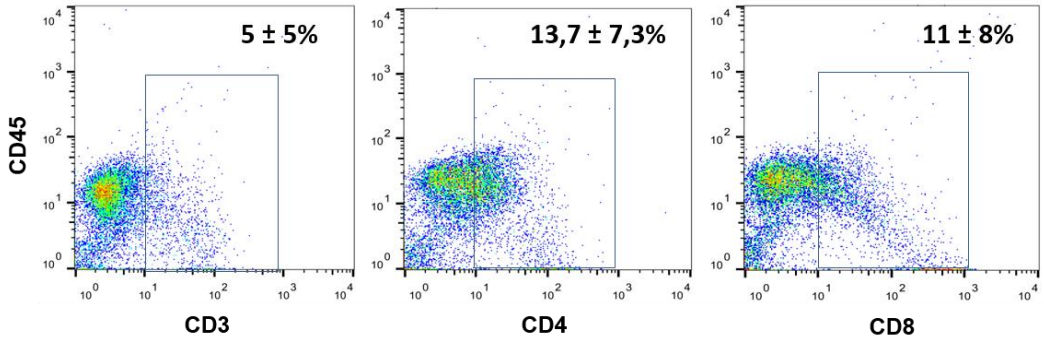


Figura 25 – Avaliação do imunofenótipo de populações de células que expressam marcadores linfóides. Foi observada a expressão dos marcadores CD3, CD4 e CD8 na população de células hematopoéticas diferenciadas. N = 3.

A análise mais minuciosa das características imunofenotípicas dessas células que expressam CD4 e CD8 demonstrou que o marcador CD8 é coexpresso com CD4 em menos de 50% na população $CD45^{+}CD4^{+}$, ao passo que, na população $CD45^{-}CD4^{+}$, CD8 é coexpresso em aproximadamente 70% das células (Figura 26).

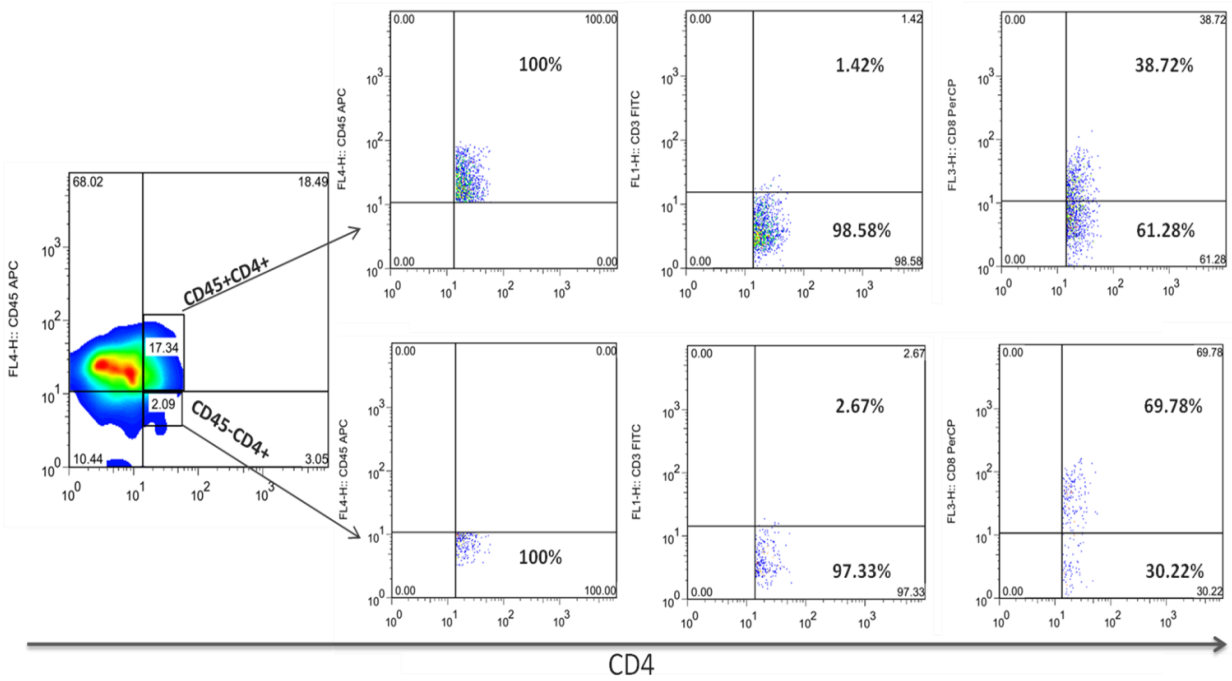


Figura 26 – Avaliação da expressão de CD4 e CD8. Foi analisada a expressão dos marcadores CD4 e CD8 nas populações de células linfóides $CD45^{+}CD4^{+}$ e $CD45^{-}CD4^{+}$. N=1.

5.5 Cinética da diferenciação *in vitro* das células hematopoéticas

Nós desenvolvemos um método de diferenciação hematopoética a partir de CTEhs baseado em sistema de cocultivo com células murinas inativadas, em meio de diferenciação suplementado com um *coktail* de citocinas hematopoéticas que permitiu um alto rendimento na obtenção de células hematopoéticas $CD45^+$ não-aderentes (mais de 90% de células positivas), obtidas do sobrenadante da diferenciação, com viabilidade superior a 80%. O cultivo foi mantido por 50 dias sem prejuízo na produção e proliferação das células hematopoéticas e o rendimento foi superior a $5x10^6$ células por placa de 6 poços por semana (Figura 27). As células hematopoéticas surgem em íntimo contato com estruturas filiformes formadas por células também filiformes que se organizam em estruturas que se assemelham a capilares, sendo denominadas neste trabalho de estruturas capilares-*like* (Figuras 27 B, C e D)

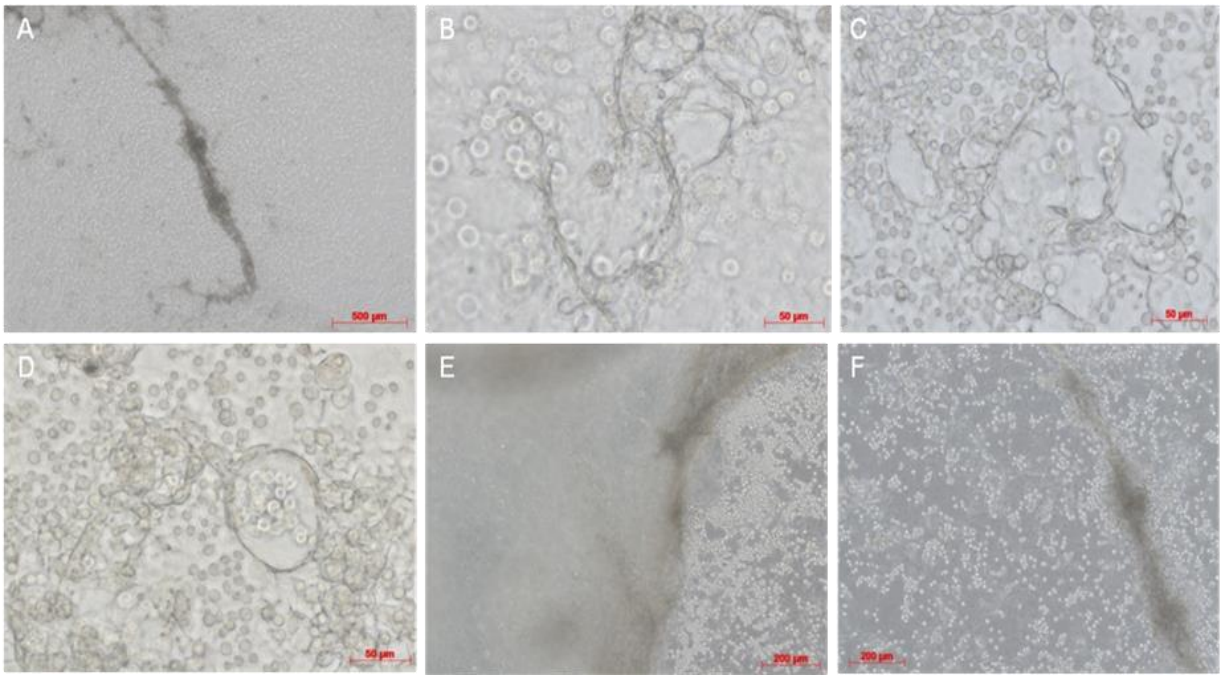


Figura 27 – Aspecto morfológico da diferenciação das colônias de CTEhs em células-tronco/progenitoras hematopoéticas. Essas estruturas capilares-*like*, assim como as células hematopoéticas podem ser observadas dentro das colônias de CTEhs em diferenciação a partir do 20º dia. A (40x); B, C e D (400x); E e F (100x).

Demonstrou-se que o presente sistema de diferenciação permite o desenvolvimento de todas as células da linhagem mielóide em diferentes estágios de maturação, desde células progenitoras até células maduras (Figura 28).

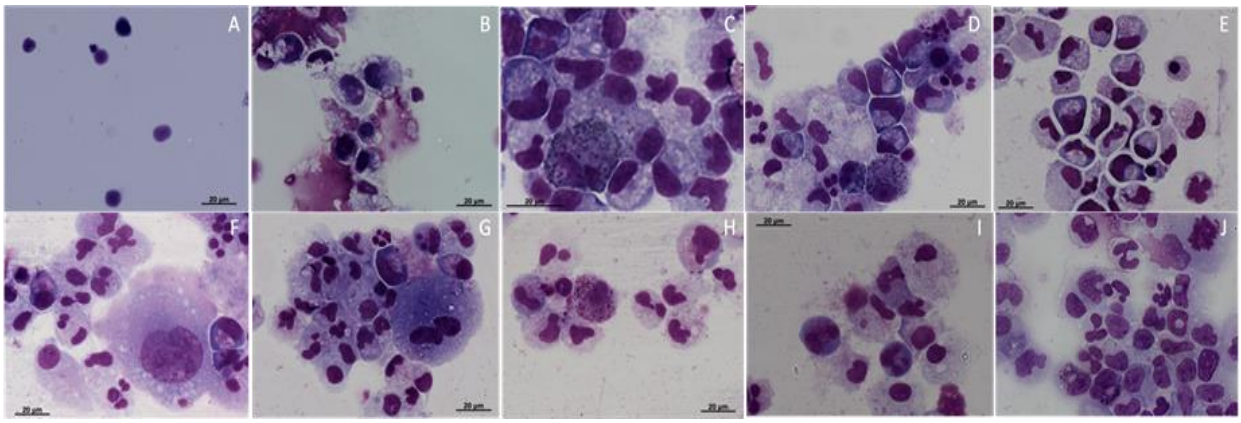
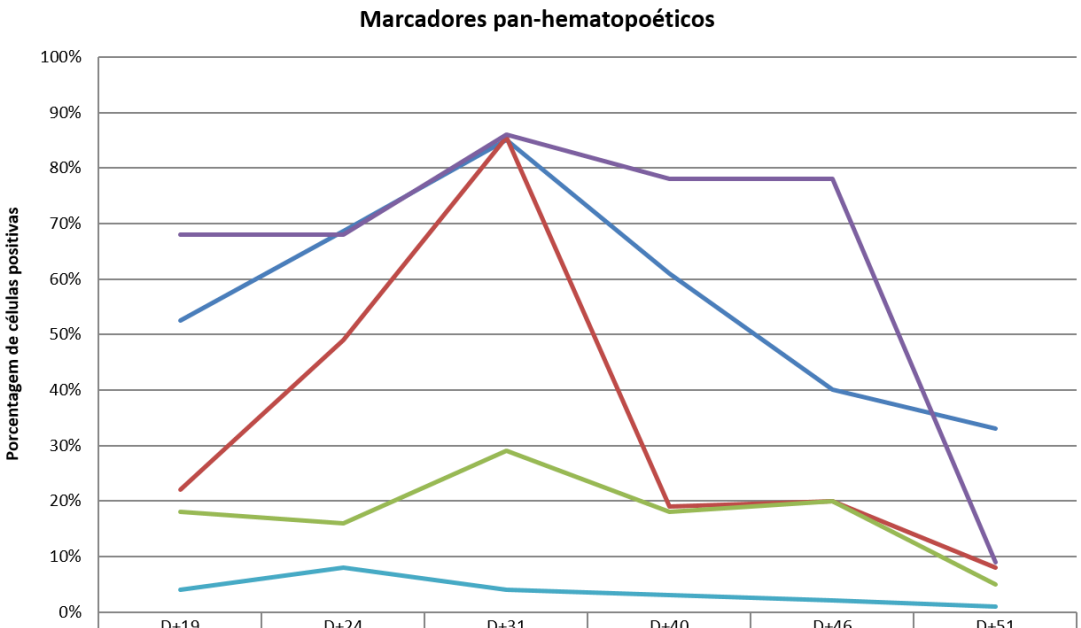


Figura 28 – Análise citológica das células hematopoéticas presentes no sobrenadante aos 24 dias de diferenciação. Foi observada a produção de todas as células mielóides hematopoéticas em diferentes estágios de maturação. **A** e **B**, eritrócitos maduros e progenitores eritróides. **C** e **D**, progenitores basofílicos e mielomonicíticos. **E**, dois eritroblastos e progenitores mielomonocíticos. **F** e **G**, dois megacariócitos, neutrófilos maduros e progenitores mielóides. **H** e **I**, progenitores eosinofílicos e neutrofílicos, e macrófagos. **J**, neutrófilos e monócitos maduros. (65x)

A análise seriada em diferentes períodos do perfil imunofenotípico das células hematopoéticas permitiu estabelecer uma cinética no surgimento e proliferação de diferentes populações de células hematopoéticas durante a diferenciação. Neste caso, a diferenciação foi mantida por 51 dias e as análises realizadas nos dias 19, 24, 31, 40, 46 e 51. Os dados a seguir representam a média dos valores obtidos nos experimentos de diferenciação hematopoética.

No 19° dia de cocultivo, 65% das células já apresentam expressão do antígeno CD45. Aos 31 dias de diferenciação, mais de 90% das células obtidas do sobrenadante da diferenciação são $CD45^+$ e coexpressam os seguintes marcadores, em média: CD43 (87%), CD31 (80%), CD71 (76%), CD11b (75%), CD38 (53%), CD15 (49%) e CD16 (29%) (figuras 29 e 30). Porém, embora 76% das células fossem positivas para o marcador eritróide CD71, a expressão de CD235a esteve restrito apenas a 9% da população celular (figura 31). O maior pico de CD235a foi observado no 24° dia, quando 20% das células expressavam este marcador (Figura 31).



	D+19	D+24	D+31	D+40	D+46	D+51
CD45	53%	69%	85%	61%	40%	33%
CD43	22%	49%	86%	19%	20%	8%
CD38	18%	16%	29%	18%	20%	5%
CD31	68%	68%	86%	78%	78%	9%
CD34	4%	8%	4%	3%	2%	1%

Figura 29 – Avaliação da cinética de aparecimento de marcadores hematopoéticos não-específicos durante a diferenciação.

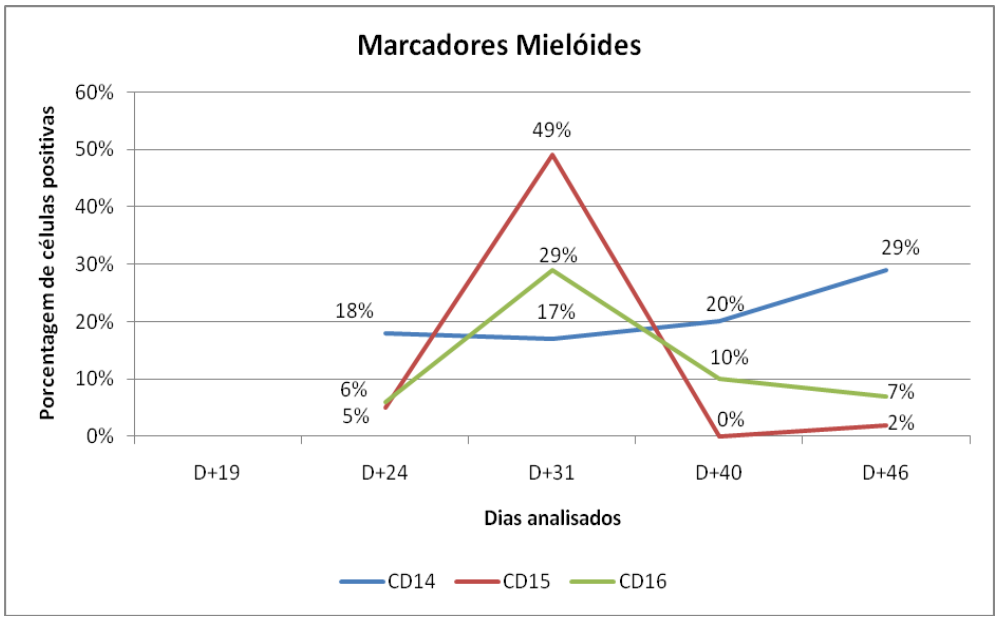


Figura 30 – Avaliação da cinética de aparecimento dos marcadores de células mielóides (monócitos e neutrófilos) durante a diferenciação.

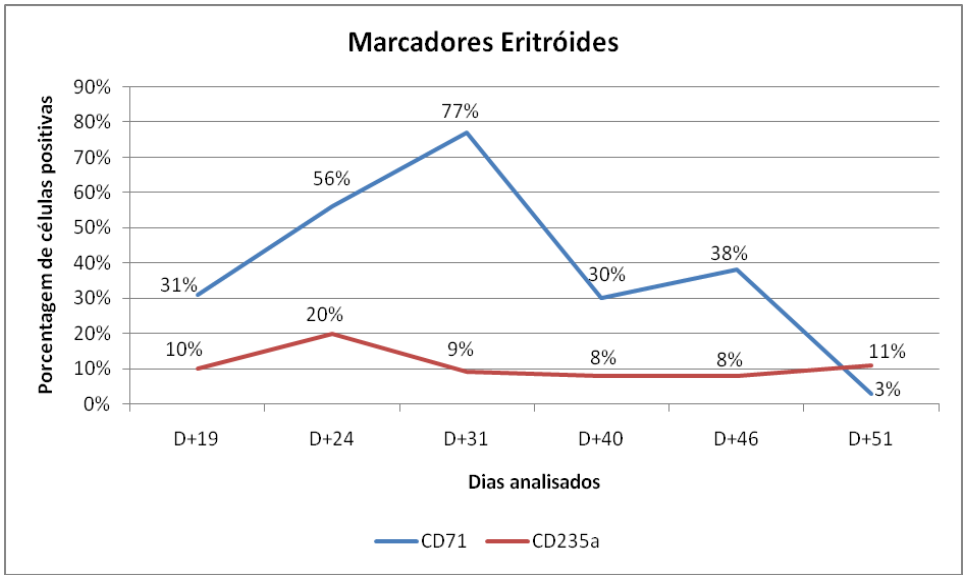


Figura 31 – Avaliação da cinética de aparecimento dos marcadores eritróides durante a diferenciação.

5.6 Potencial clonogênico *in vitro* das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas de CTEhs

Para melhor avaliar o potencial de formação de colônias das células hematopoéticas, foram conduzidos ensaios em metilcelulose durante os diferentes dias da diferenciação (Figura 32) em que as células foram caracterizadas imunofenotipicamente, para verificar a cinética de produção de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e o ponto preciso de diferenciação em que existe maior quantidade de células-tronco para que fosse realizado o isolamento dessas células e os ensaios de reconstituição hematopoética *in vivo*.

Foram avaliados os dois compartimentos nos quais podem ser isoladas as células hematopoéticas: colônias (colônias de CTEhs diferenciadas) e sobrenadante. Foi utilizada amostra de sangue de cordão umbiilical como controle-positivo dos ensaios clonogênicos e como parâmetro para avaliação do rendimento na geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas.

Os resultados demonstraram que as colônias diferenciadas a partir de CTEhs apresentam maior quantidade de células-tronco/progenitoras hematopoéticas com potencial de formação de colônias quando comparadas ao sobrenadante, sendo o 24º dia o de maior pico de formação de colônias, equivalente ao potencial clonogênico das células-tronco hematopoéticas obtidas de sangue de cordão umbilical (Figura 32).

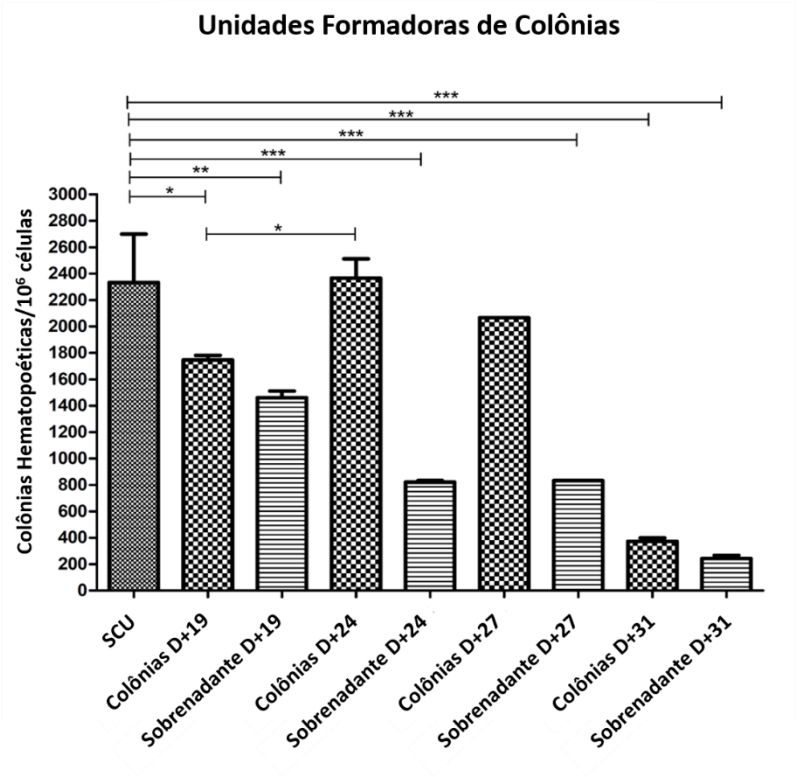


Figura 32 – Potencial clonogênico *in vitro* das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas de CTEhs. Foi avaliação do potencial geral de formação de colônias hematopoéticas das células diferenciadas a partir de CTEhs durante os diferentes dias em comparação ao potencial das células isoladas de sangue de cordão umbilical. N=4.

Como o objetivo de estudar o potencial clônogênico *in vitro* para a obtenção de uma população celular com maior potencial clonogênico multilinhagem, investigamos qual o período da diferenciação favorece a geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas com capacidade de geração de colônias multilinhagem CFU-GEMM. Os resultados demonstraram que as colônias obtidas no 24º dia de diferenciação apresentam maior potencial clonogênico mutilinhagem e representam o melhor dia para isolamento de células hematopoéticas para os estudos de reconstituição hematopoética *in vivo* (Figura 33).

Quando avaliada a distribuição geral das colônias hematopoéticas originadas em metilcelulose nos diferentes dias estudados, pôde-se observar que existe um aumento gradativo na geração de colônias multinhagens até o 24º dia de diferenciação. Este potencial decai após este período, com predomínio na geração de colônias linhagem-específicas, demonstrando uma exaustão no sistema de diferenciação para a manutenção de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e aumento de células progenitoras e maduras da linhagem mielóide entre o 24º e 30º dia de diferenciação (Figura 34).

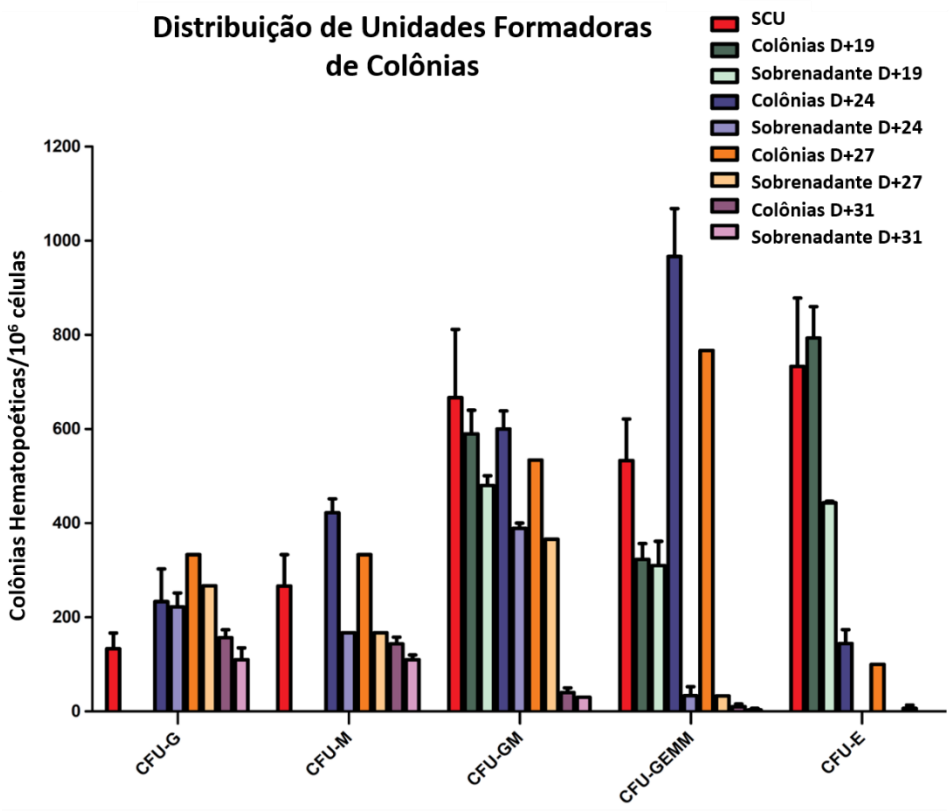


Figura 33 – Cinética do potencial de formação de colônias hematopoéticas durante os diferentes períodos da diferenciação hematopoética. N=4.

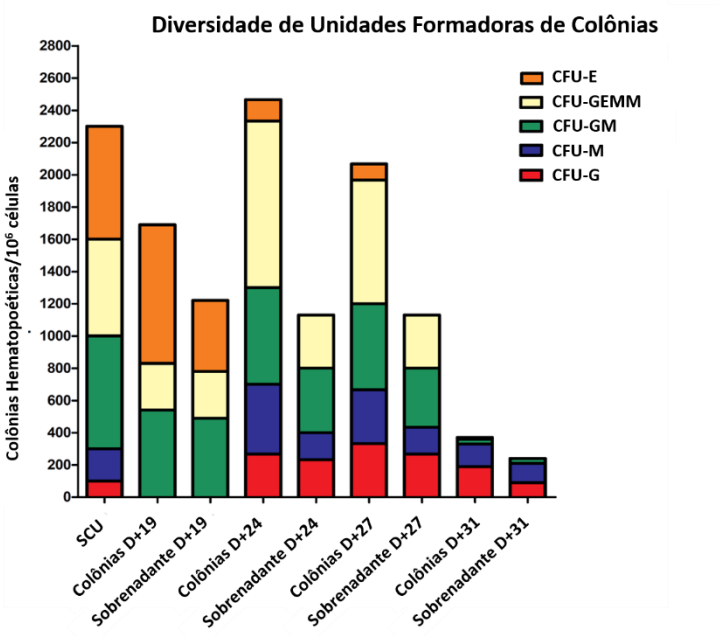


Figura 34 – Diversidade do potencial clonogênico das células hematopoéticas isoladas a partir das colônias diferenciadas e do sobrenadante nos diferentes dias de diferenciação. N=4.

A avaliação citológica das colônias formadas em metilcelulose corroboraram a classificação das colônias e sua constituição por tipos celulares específicos (Figura 35).

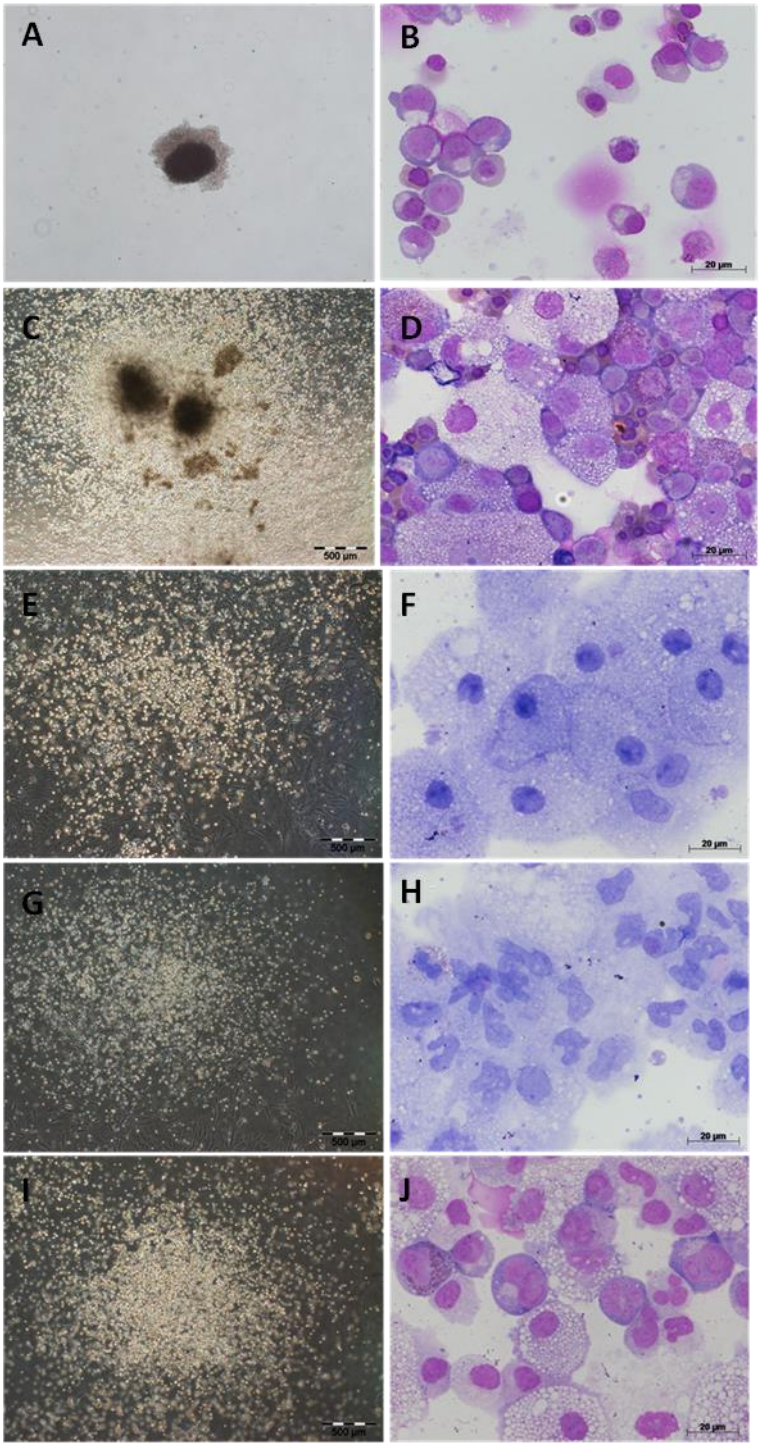


Figura 35 – Avaliação citológica das colônias hematopoéticas. A, CFU-E e eritroblastos **(B)**. **C**, CFU-GEMM e macrófagos, monócitos, eritroblastos e granulócitos em **D**. **E**, CFU-M e macrófagos **(F)**. **G**, CFU-G e granulócitos em **(H)**. **I**, CFU-GM e granulócitos e macrófagos em **(J)**. A, C, E, G e I, 40x. B, D, F, H e J, 1.000x.

5.7 Considerações sobre a padronização do protocolo de diferenciação com a linhagem de CTEh-H1 e avaliação da eficiência na produção de células hematopoéticas

Os experimentos foram repetidos várias vezes para melhor avaliação e controle das variáveis envolvidas. As replicatas experimentais com a linhagem H1 permitiram o estabelecimento de um protocolo consistente com o delineamento de inúmeros parâmetros que interferem na eficiência da diferenciação hematopoética tais como quantidade de dias de cultivo das CTEhs para início da diferenciação, número de colônias plaqueadas *versus* relação com número de colônias aderidas e qualificação morfológica das colônias de embrionárias.

Para o início da diferenciação das CTEhs-H1 as colônias foram expandidas por 12 dias em meio mTeSr® sobre matrigel® para que as colônias ficassem mais robustas e aumentasse a eficiência de aderência ao *feeder*. Os experimentos, em sua maioria, foram realizados em placas de 6 poços e a quantidade de células por poço para início do experimento com a linhagem H1 foi calculado para aproximadamente $1x10^6$ para o estabelecimento de uma quantidade de 10 a 15 colônias aderidas ao *feeder* (D+0).

Foram realizados 4 experimentos sequenciais para validar a eficiência da diferenciação utilizando estes parâmetros (Tabela 1). Das 20 repetições experimentais da diferenciação hematopoética com a linhagem H1, 15 experimentos apresentaram diferenciação satisfatória com obtenção de células hematopoéticas. Os 5 experimentos que apresentaram baixo rendimento ou não-diferenciação hematopoética estão entre os 10 primeiros ensaios, período no qual as variações ainda eram muito pouco conhecidas e controladas.

Tabela 1 – Resultados da padronização da diferenciação com CTEhs-H1 e eficiência na obtenção de células hematopoéticas.

	Poço	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
Exp. 15	1	12	$1,05x10^6$	14	5	35,0%	$1,15x10^7$
	2	12	$1,05x10^6$	11	6	54,5%	
	3	12	$1,05x10^6$	13	3	23,0%	
	4	12	$1,05x10^6$	9	4	44,4%	
	5	12	$1,05x10^6$	11	2	18,2%	
	6	12	$1,05x10^6$	15	5	33,3%	
Média				12,2	4,2	34,7%	

	Poço	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
Exp. 16	1	12	$8,9x10^5$	7	1	14,3%	$8x10^6$
	2	12	$8,9x10^5$	10	3	30,0%	
	3	12	$8,9x10^5$	10	3	30,0%	
	4	12	$8,9x10^5$	9	0	0,0%	
	5	12	$8,9x10^5$	9	0	0,0%	
	6	12	$8,9x10^5$	12	5	41,7%	
Média				9,5	2	19,3%	

	Poço	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
Exp. 17	1	12	$1,1x10^6$	13	5	38,5%	$1,2x10^7$
	2	12	$1,1x10^6$	10	5	50,0%	
	3	12	$1,1x10^6$	11	4	36,4%	
	4	12	$1,1x10^6$	9	2	22,2%	
	5	12	$1,1x10^6$	12	3	25,0%	
	6	12	$1,1x10^6$	10	4	40,0%	
Média				10,8	3,8	35,4%	

	Poço	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
Exp. 18	1	12	$9,5x10^5$	12	4	33,3%	$9,5x10^6$
	2	12	$9,5x10^5$	10	3	30,0%	
	3	12	$9,5x10^5$	8	3	37,5%	
	4	12	$9,5x10^5$	8	2	25,0%	
	5	12	$9,5x10^5$	12	5	41,6%	
	6	12	$9,5x10^5$	12	4	33,3%	
Média				10,3	3,5	33,5%	

Com a sistematização do protocolo de diferenciação foi possível demonstrar que experimentos realizados com colônias de H1 expandidas por 12 dias (Figura 36D)

diferenciam-se de maneira mais eficiente que CTEhs-H1 expandidas por 5 ou 6 dias. Aos 12 dias de expansão as colônias estão bastante densas, apresentam um centro levemente acastanhado, o que indica uma pré-diferenciação, e aderem de maneira mais eficiente ao *feeder*, o que facilita o processo de diferenciação.

Colônias jovens, com 5 ou 6 dias de expansão, diferenciam-se com maior dificuldade e o sistema apresenta baixo rendimento (Tabela 2). O contrário, colônias com mais de 14 ou mais dias de expansão apresentam o centro com uma tonalidade marrom-escuro com elevada taxa de morte celular, mas as células viáveis que ali ainda proliferam já estão em processo avançado de diferenciação. Colônias com mais de 12 dias de expansão não são indicadas para a diferenciação hematopoética.

Tabela 2 – Diferenciação de CTEhs-H1 com 5 e 6 dias de expansão e eficiência na obtenção de células hematopoéticas.

	Poço	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
Exp. 19	1	5	$1x10^6$	15	0	0,0%	$8,5x10^5$
	2	5	$1x10^6$	12	1	8,3%	
	3	5	$1x10^6$	14	0	0,0%	
	4	5	$1x10^6$	11	2	18,2%	
	5	5	$1x10^6$	14	0	0,0%	
	6	5	$1x10^6$	12	0	0,0%	
Média				13	0,5	4,4%	
	Poço	**Dias de expansão das CTEh**	**No. de células plaqueadas**	**No. de colônias aderidas**	**No. de colônias diferenciadas**	**% de colônias diferenciadas**	**No. de células obtidas em 30 dias**
Exp. 20	1	6	$9,8x10^5$	13	2	15,4%	$6,8x10^5$
	2	6	$9,8x10^5$	10	0	0,0%	
	3	6	$9,8x10^5$	7	0	0,0%	
	4	6	$9,8x10^5$	10	0	0,0%	
	5	6	$9,8x10^5$	12	0	0,0%	
	6	6	$9,8x10^5$	12	1	8,3%	
Média				10,7	0,5	4,0%	

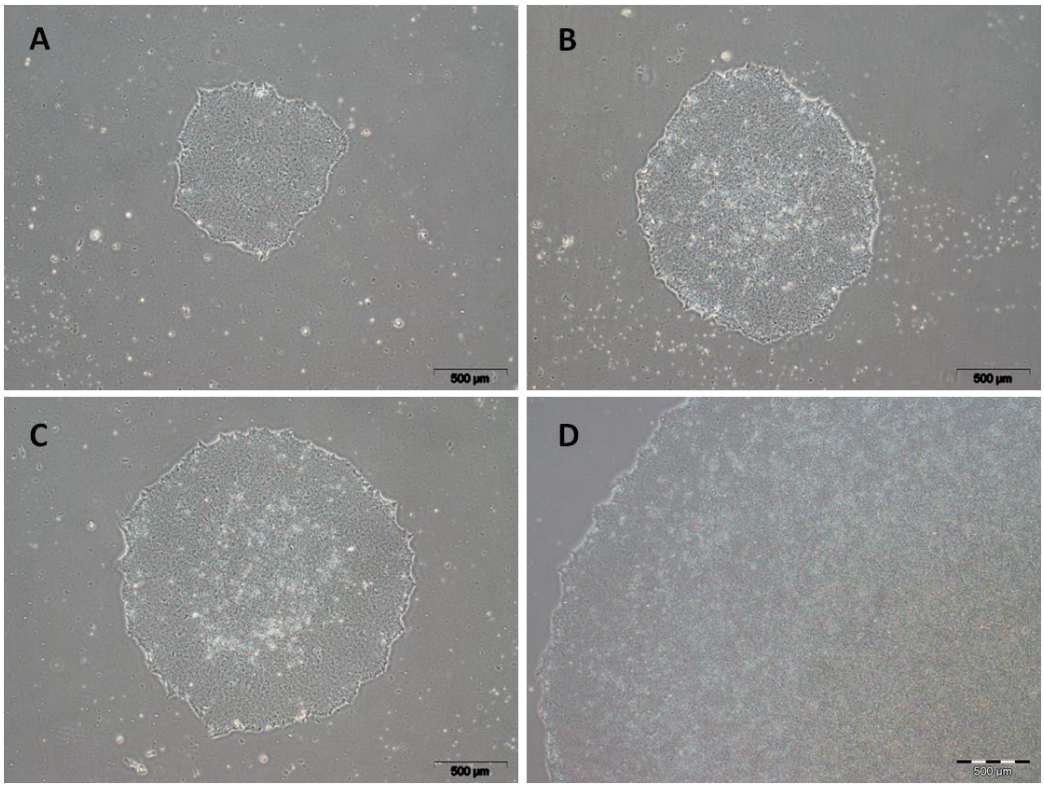


Figura 36 – Avaliação morfológica das colônias de CTEhs-H1 expandidas por até 12 dias. A: 3 dias de cultivo; **B:** 5 dias de cultivo; **C:** 7 dias de cultivo; **D:** 12 dias de cultivo. Aumento: 40x.

Um fato observado com relação à diferenciação hematopoética realizada em placas de 6 poços foi a discrepância na eficiência de diferenciação entre poços de uma mesma placa. Na tentativa de aumentar a eficiência e evitar a diferenciação em alguns poços e outros não, realizamos 3 ensaios de diferenciação em placas de $100mm^3$ (Tabela 3).

Tabela 3 – Padronização e eficiência da diferenciação hematopoética em placas de $100mm^3$.

Experimento	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
1	12	$5x10^6$	38	7	18,4%	$6,8x10^6$
2	12	$5x10^6$	35	11	31,4%	$1,08x10^7$
3	12	$5x10^6$	41	9	21,9%	$9,5x10^6$

Os resultados demonstraram que não houve aumento significativo na quantidade de colônias diferenciadas e na quantidade absoluta de células hematopoéticas obtidas do sobrenadante da diferenciação. Essas variações com relação à diferenciação podem ser

atribuídas às características intrínsecas das próprias células embrionárias cultivadas e expandidas, além de variações inerentes a lotes dos reagentes utilizados.

Além da avaliação das variáveis quantitativas do sistema de diferenciação, realizamos também uma avaliação qualitativa das MEFs e das colônias de CTEhs utilizadas nos ensaios de diferenciação.

As MEFs representam uma importante variação no sistema de diferenciação. Por se tratar de células que atuam como estroma e exercem importantes funções na secreção de fatores que contribuem para a diferenciação celular, a densidade de plaqueamento e a sua heterogeneidade celular, são fatores que podem interferir na eficiência do método de diferenciação hematopoética.

Para os ensaios de diferenciação, as MEFs são plaqueadas em uma densidade de $2x10^6$ células por placa de 6 poços e inativadas com Mitomicina-C quando atingem 80% de confluência (1 ou 2 dias após o plaqueamento, dependendo se as células foram descongeladas ou repicadas pós-expansão), para atingir uma confluência de 100% pós-inativação (Figura 37).

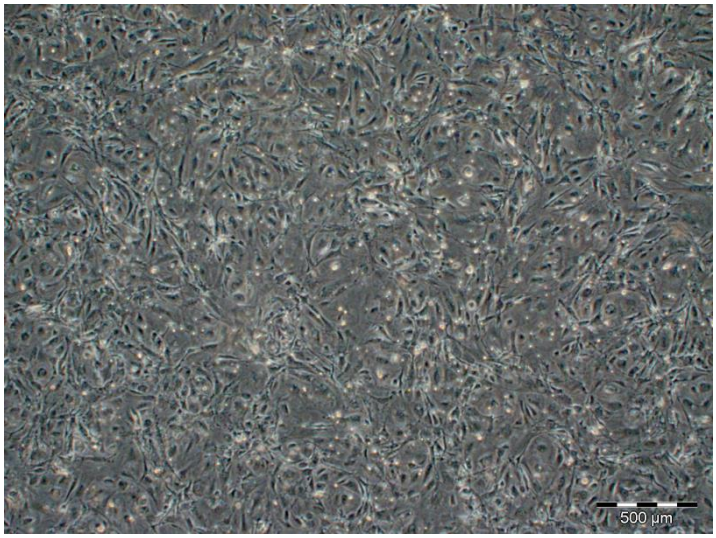


Figura 37 – Morfologia das MEFs pós-inativação. As MEFs foram inativadas com 80% de confluência para alcançarem 100% de confluência no dia do início da diferenciação (D+0). Aumento: 40x.

O acompanhamento morfológico das colônias de CTEhs plaqueadas para diferenciação permitiu o mapeamento de colônias que apresentam maior eficiência na diferenciação hematopoética (Figura 38). Colônias densas sem evidências morfológicas de diferenciação celular não-mesodermal (Figura 38a) no terceiro dia pós-plaqueamento (D+3) apresentam maior capacidade de diferenciação. Eventualmente, colônias com centro mais diferenciado apresentando aspecto tridimensional e tonalidade acastanhada, típicas do 6º dia

pós-plaqueamento (D+6) podem ser visualizadas já no D+3 em virtude da pré-diferenciação das colônias de CTEhs expandidas por 12 dias.

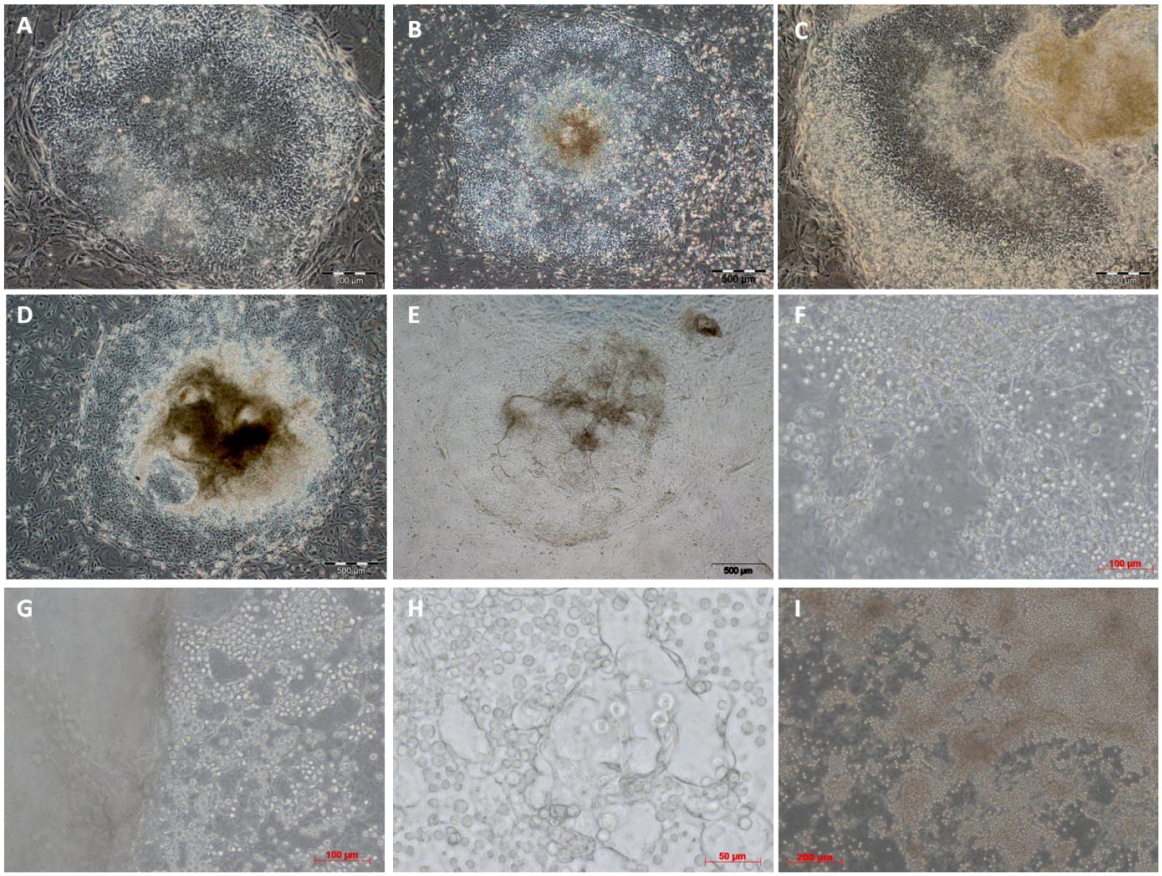


Figura 38 – Morfologia das colônias de CTEhs-H1 em diferentes períodos da diferenciação. As colônias em diferenciação apresentam uma diferenciação gradativa, com início da formação de estruturas capilares-*like* entre os dias 9 (D+9) e 15 (D+15) e posterior surgimento das células hematopoéticas. **A,** D+3; **B,** D+6; **C,** D+9; **D,** D+12; **E,** D+15; **F,** D+18; **G,** D+21; **H,** D+24; **I,** D+27. Aumentos: B, D e E, 40x; A e C, 100x; F, G e I, 200x; H, 400x.

Para avaliar a influência das MEFs no sistema de diferenciação, foram realizados 2 experimentos sobre matrigel utilizando o mesmo protocolo de diferenciação, porém, sem MEFs como células alimentadoras (Figura 39).

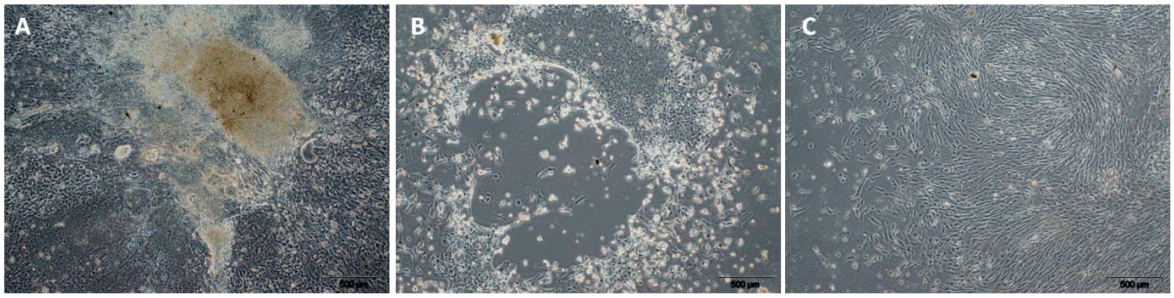


Figura 39 – Diferenciação das CTEhs-H1 sobre matrigel. Foi realizada a diferenciação das colônias de H1 sobre matrigel com os mesmos meios de diferenciação utilizados nos experimentos realizados com MEFs e não houve diferenciação hematopoética. Aumento: 40x.

Não foram observadas evidências morfológicas da diferenciação hematopoética utilizando os mesmos meios de diferenciação em sistema sem MEFs (sobre matrigel), demonstrando a importância dessas células como *feeder* no sistema de diferenciação. As colônias adquiriram um aspecto morfológico diferente do apresentado pelas colônias em diferenciação sobre MEFs, com formação de uma densa população de células fibroblastóides, e não foi observada a formação de células hematopoéticas (células arredondadas). Um ensaio-controle sobre MEFs com a linhagem H1 foi realizado em paralelo para comparação.

As MEFs exercem importante influência no sistema de diferenciação, possivelmente pela secreção de fatores que estimulam o desenvolvimento mesodérmico e hematopoético. Quando realizados experimentos de diferenciação de CTEhs sobre MEFs em meio DMEM High Glucose suplementado com 15% de SFB mas sem suplementação com citocinas, o sistema é capaz de produzir células hematopoéticas positivas para os marcadores CD45 e CD31, embora a expressão do marcador CD43 seja observada apenas em uma pequena população celular (Tabela VIII). Esses dados evidenciam importância das MEFs na diferenciação hematopoética. Estudos adicionais acerca das características biológicas e funcionais das MEFs são necessários para definir de maneira mais precisa a participação destas na diferenciação

5.8 Avaliação do potencial de diferenciação das linhagens de CTEhs HuES-3 e H9 *feeder*-independente

Para validar a eficiência do método, foram realizados ensaios de diferenciação com a linhagem de CTEh H9 *feeder*-independente, concomitante com a diferenciação da linhagem H1 (controle positivo).

Foi observado que todas as linhagens de células pluripotentes apresentam características de crescimento, aderência e diferenciação diferentes das apresentadas pela linhagem H1 com a qual o método de diferenciação foi padronizado. Mesmo seguindo rigorosamente o protocolo estabelecido, os ensaios iniciais indicavam que embora o método funcionasse muito bem para a diferenciação hematopoética da linhagem H1 (Figura 41), aparentemente, ele não era capaz de promover a diferenciação de CTEh H9 *feeder*-independente (Figura 40). Neste caso, ambos os ensaios com as duas linhagens de embrionárias foram conduzidos simultaneamente.

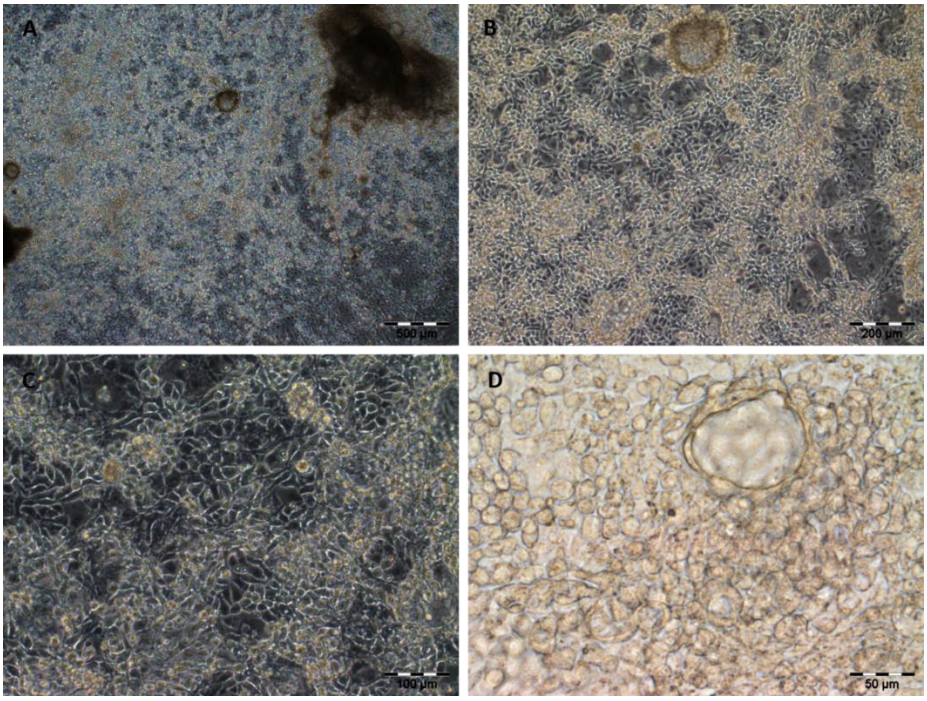


Figura 40 – Diferenciação hematopoética da linhagem de CTEh H9 *feeder*-independente (D+24). A e B, observa-se a diferenciação das colônias de CTEh H9. C e D, as colônias são constituídas por células com formato poliédrico e não tão arredondadas se comparadas às células hematopoéticas obtidas da diferenciação da linhagem H1.

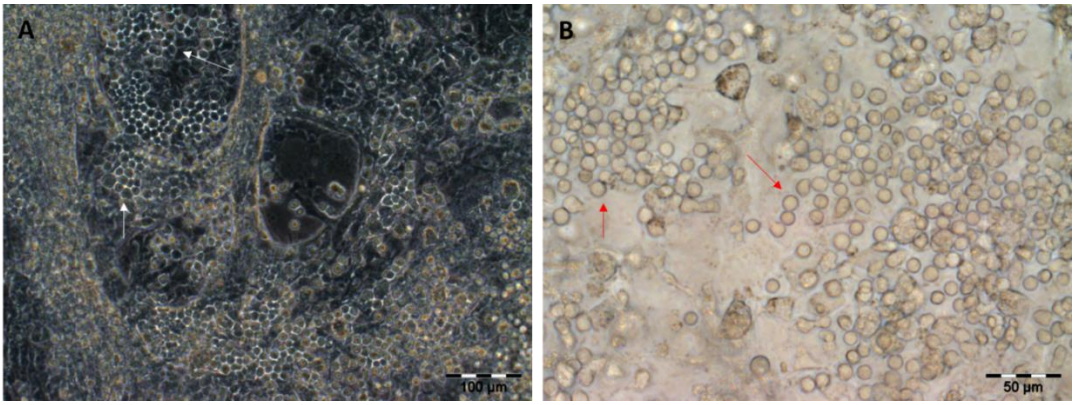


Figura 41 – Diferenciação hematopoética da linhagem de CTEh H1 (D+24). A, pode ser observada a formação de colônias de células arredondadas (setas brancas), o que indica o início da formação das células hematopoéticas (**B**, setas vermelhas). **A**, 200X. **B**, 400X.

No 24º de diferenciação da linhagem de CTEh H1 já era evidente a formação de células hematopoéticas (Figura 41). Já é descrito na literatura que a linhagem de CTEh H9 apresenta menor potencial de diferenciação hematopoética comparado à linhagem H1 (Melichar *et al.*, 2011). No 24º dia de diferenciação da linhagem H9, as colônias apresentam-se bem diferenciadas, no entanto, a morfologia da diferenciação era diferente da observada na diferenciação das CTEhs H1. Não era possível observar a formação dos *cobblestones* e

células com morfologia arredondada. As células apresentavam morfologia mais poliédrica e não apresentavam positividade para marcadores hematopoéticos (Figura 42).

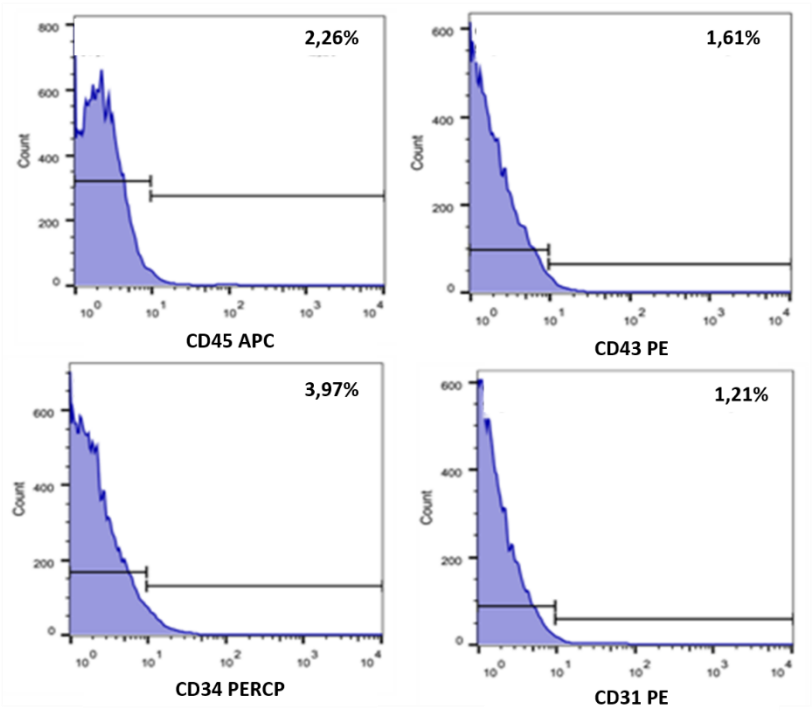


Figura 42 – Análise imunofenotípica das colônias de CTEh-H9 *feeder*-independente após 30 dias de diferenciação. Os resultados comprovam a ausência de células positivas para marcadores hematopoéticos, demonstrando que a diferenciação hematopoética não ocorreu mesmo empregando o mesmo protocolo padronizado para CTEhs-H1. N=1.

Entretanto, embora não fosse observado o desenvolvimento das células hematopoéticas, as células apresentavam aparência morfológica evidente de diferenciação. As tentativas frustradas de diferenciação hematopoética com a linhagem H9 demonstraram que devido às características intrínsecas das próprias células de adaptação ao meio, aderência e crescimento, seriam necessárias algumas adaptações no protocolo de diferenciação.

Após alguns ensaios de diferenciação mal-sucedidos, a adaptação do protocolo para um total inicial de células de $5x10^5$ com no máximo 15 colônias por poço de uma placa de 6 poços, demonstrou que a concentração inicial de células é um fator limitante para a capacidade de diferenciação destas (Tabela 5). O protocolo desenvolvido foi padronizado para uma quantidade inicial de $1x10^6$ CTEh-H1 com a aderência de no máximo 15 colônias por poço de uma placa de 6 poços. Porém as CTEh-H1 apresentam um potencial de aderência pós-repique reduzido se comparadas com a linhagem H9, o que gerava o dobro de quantidade de colônias aderidas de H9 quando utilizado a mesma quantidade inicial de células nos experimentos (Tabela 4).

Tabela 4 – Diferenciação de CTEhs H9 *feeder*-independente com 1x10^6 células plaqueadas.

	Poço	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
Exp. 1	1	12	1,02x10^6	26	0	0,0%	0,0
	2	12	1,02x10^6	27	0	0,0%	
	3	12	1,02x10^6	25	0	0,0%	
	4	12	1,02x10^6	25	0	0,0%	
	5	12	1,02x10^6	23	0	0,0%	
	6	12	1,02x10^6	28	0	0,0%	
Média				25,7	0	0,0%	
	Poço	**Dias de expansão das CTEh**	**No. de células plaqueadas**	**No. de colônias aderidas**	**No. de colônias diferenciadas**	**% de colônias diferenciadas**	**No. de células obtidas em 30 dias**
Exp. 2	1	12	9,85x10^5	24	0	0,0%	0,0
	2	12	9,85x10^5	26	0	0,0%	
	3	12	9,85x10^5	23	0	0,0%	
	4	12	9,85x10^5	22	0	0,0%	
	5	12	9,85x10^5	25	0	0,0%	
	6	12	9,85x10^5	23	0	0,0%	
Média				23,8	0	0,0%	

Essas diferenças nas características de cultivo e expansão *in vitro* das diferentes linhagens de células pluripotentes evidenciaram que a quantidade de células iniciais para o início da diferenciação precisa ser adaptada para cada linhagem.

Os resultados demonstraram que o ideal é manter uma quantidade de 10 a 15 colônias por poço de uma placa de 6 poços, e que a quantidade inicial de células para alcançar essa quantidade de colônias/poço varia de 5x10^5 para a CETh-H9 *feeder*-independente (Tabela 5) a 1x10^6 para as linhagens H1 (Tabela 1) e HuES-3 (Tabela 6).

Tabela 5 – Diferenciação de CTEhs H9 *feeder*-independente com $5x10^5$ células plaqueadas.

	Poço	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
Exp. 3	1	12	$4,9x10^5$	13	4	30,8%	$1,2x10^6$
	2	12	$4,9x10^5$	13	3	23,1%	
	3	12	$4,9x10^5$	12	1	8,3%	
	4	12	$4,9x10^5$	13	3	23,1%	
	5	12	$4,9x10^5$	14	2	14,3%	
	6	12	$4,9x10^5$	14	3	21,4%	
Média				13,1	2,7	20,1%	
	Poço	**Dias de expansão das CTEh**	**No. de células plaqueadas**	**No. de colônias aderidas**	**No. de colônias diferenciadas**	**% de colônias diferenciadas**	**No. de células obtidas em 30 dias**
Exp. 4	1	12	$5,35x10^5$	15	4	26,7%	$8,75x10^5$
	2	12	$5,35x10^5$	10	2	20,0%	
	3	12	$5,35x10^5$	13	2	15,4%	
	4	12	$5,35x10^5$	13	4	30,8%	
	5	12	$5,35x10^5$	11	1	9,1%	
	6	12	$5,35x10^5$	12	2	16,7%	
Média				12,3	2,5	19,8%	

Tabela 6 – Diferenciação de CTEhs HuES-3 com $1x10^6$ células plaqueadas.

	Poço	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
Exp. 1	1	12	$1x10^6$	16	3	18,7%	$8x10^6$
	2	12	$1x10^6$	11	1	9,1%	
	3	12	$1x10^6$	13	4	30,8%	
	4	12	$1x10^6$	10	2	20,0%	
	5	12	$1x10^6$	15	2	13,3%	
	6	12	$1x10^6$	12	0	0,0%	
Média				12,8	2	15,3%	

	Poço	Dias de expansão das CTEh	No. de células plaqueadas	No. de colônias aderidas	No. de colônias diferenciadas	% de colônias diferenciadas	No. de células obtidas em 30 dias
Exp. 2	1	12	$1x10^6$	13	3	23,1%	$9,85x10^6$
	2	12	$1x10^6$	14	0	0,0%	
	3	12	$1x10^6$	10	2	20,0%	
	4	12	$1x10^6$	12	2	16,7%	
	5	12	$1x10^6$	14	5	35,7%	
	6	12	$1x10^6$	12	3	25,0%	
Média				12,5	2,5	20,1%	

Além disso, foi observado que mesmo utilizando a mesma quantidade inicial de colônias por poço para o desenvolvimento do protocolo de diferenciação, as linhagens apresentam metabolismo diferente. Enquanto para a linhagem H1 as trocas do meio 2 (segundo meio de diferenciação que utiliza 7 citocinas hematopoéticas, vide Material e Métodos) pudessem ser realizadas a cada 3 dias sem evidência de excessiva acidificação do meio, a diferenciação da linhagem H9 exigiu trocas do meio 2 a cada 2 dias devido à excessiva acidificação do meio de diferenciação que tomava tonalidade amarelo intenso.

Os ensaios de diferenciação com a linhagem H1 com trocas de meio 2 a cada 2 dias revelaram que não ocorria prejuízo na diferenciação. No entanto, o uso de citocinas recombinantes e o aumento na quantidade de trocas de meio aumenta o custo dos experimentos. Neste caso, para reduzir custos, o ideal é adaptar a quantidade de trocas de meio 2 para cada linhagem celular a ser diferenciada.

Após a adequação do método de diferenciação hematopoética com a CTEh H9 *feeder*-independente, foram realizados outros 3 ensaios de diferenciação esta linhagem e 3 ensaios com outra linhagem de CTEh, a HuES-3, como continuidade dos ensaios de validação do método de diferenciação (Figura 43).

As células hematopoéticas obtidas da diferenciação das linhagens H9 *feeder*-independente e Hues-3 foram caracterizadas imunofenotipicamente (Figuras 44 e 45) e quanto ao seu potencial clonogênico *in vitro* (Figura 46). As populações de células hematopoéticas diferenciadas de ambas as linhagens também apresentaram expressão dos marcadores CD45, CD43, CD31 e CD34, semelhante ao observado nas populações de células hematopoéticas obtidas da diferenciação da CTEh-H1 (D+31).

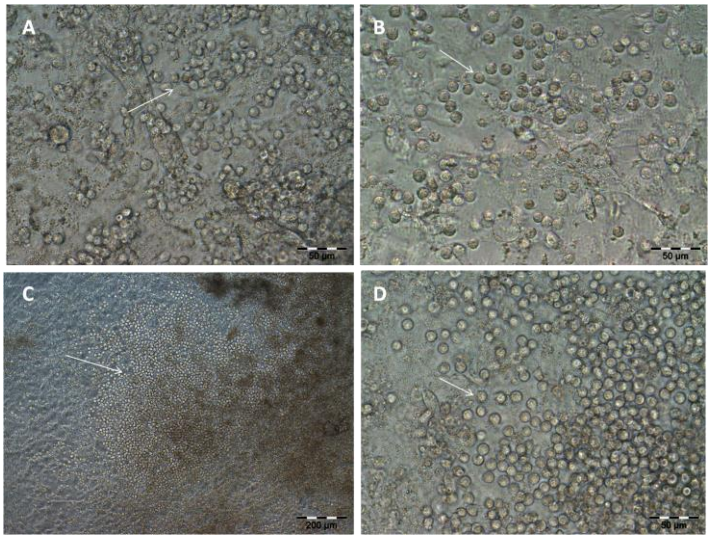


Figura 43 – Diferenciação das CTEhs H9 *feeder*-independente e HuES-3. Após 30 dias de difenciação é possível observar a formação de células arredondadas, semelhante a células hematopoéticas em alguns pontos específicos e esparsos da diferenciação. A e B, HUES-3. C e D, H9 *feeder*-independente.

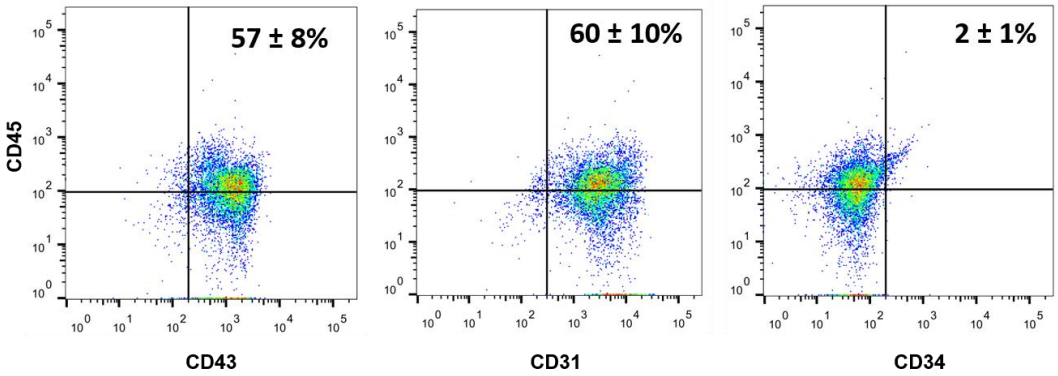


Figura 44 – Avaliação de população celular que expressa marcadores pan-hematopoéticos diferenciada a partir de CTEhs H9 *feeder*-independente (D+31). Aos 31 dias de diferenciação a quase totalidade das células obtidas do sobrenadante da diferenciação expressam os marcadores CD45, CD43 e CD31. N=2.

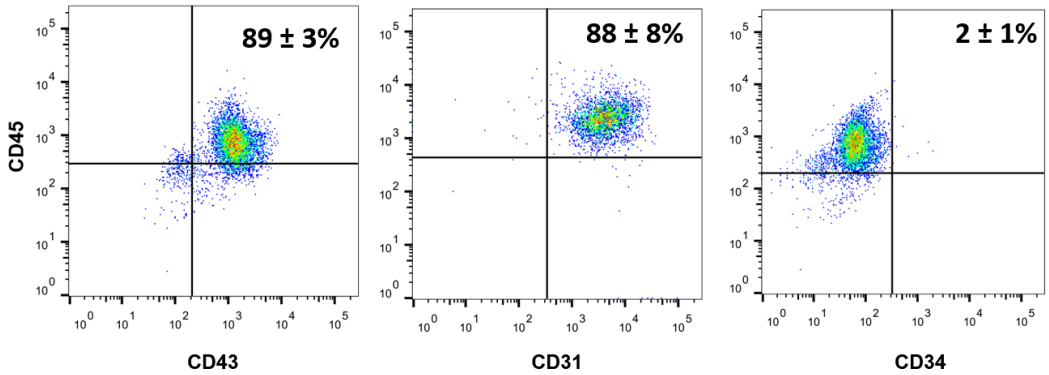


Figura 45 – Avaliação de população celular que expressa marcadores pan-hematopoéticos diferenciada a partir de CTEhs HuES-3 (D+31). Aos 31 dias de diferenciação a quase totalidade das células obtidas do sobrenadante da diferenciação expressam os marcadores CD45, CD43 e CD31. N=2.

No entanto, foi observado que as células hematopoéticas obtidas das linhagens HuES-3 e H9 *feeder*-independente apresentam menor potencial clonogênico *in vitro* em meio semi-sólido de metilcelulose no 24º dia de diferenciação quando comparadas às células hematopoéticas derivadas da linhagem H1 (D+24) e do SCU (Figura 46).

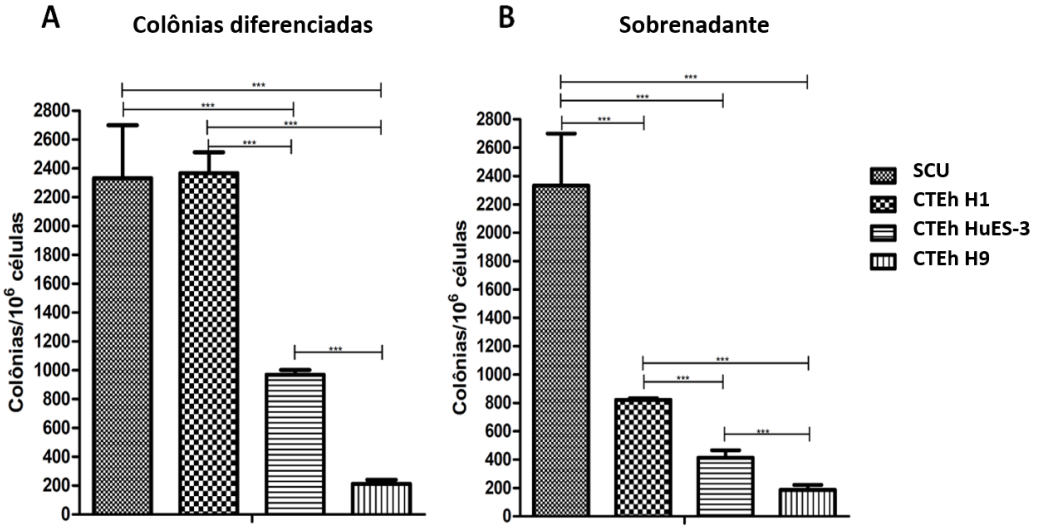


Figura 46 – Avaliação do potencial geral de formação de colônias hematopoéticas das células diferenciadas (D+24) a partir de CTEhs HuES-3 e H9 *feeder*-independente em comparação ao potencial das células isoladas de sangue de cordão umbilical e da linhagem de CTEh H1 (D+24). A, potencial de formação de colônias em metilcelulose de células hematopoéticas isoladas das colônias em diferenciação (D+24). **B,** potencial de formação de colônias em metilcelulose de células hematopoéticas isoladas do sobrenadante da diferenciação (D+24)**.** SCU: sangue de cordão umbilical. N=2.

Quando avaliada a composição geral de colônias hematopoéticas geradas aos 24 dias de diferenciação, pôde-se observar a predominância de unidades formadoras de colônias de granulócitos (CFU-G), de macrófagos (CFU-M) e de granulócitos/macrófagos (CFU-GM) tanto dentre as células-tronco/progenitoras obtidas das colônias diferenciadas quanto da população de células obtidas do sobrenadante da diferenciação de CTEhs HuES-3 (Figura 47) e H9 *feeder*-independente (Figura 48).

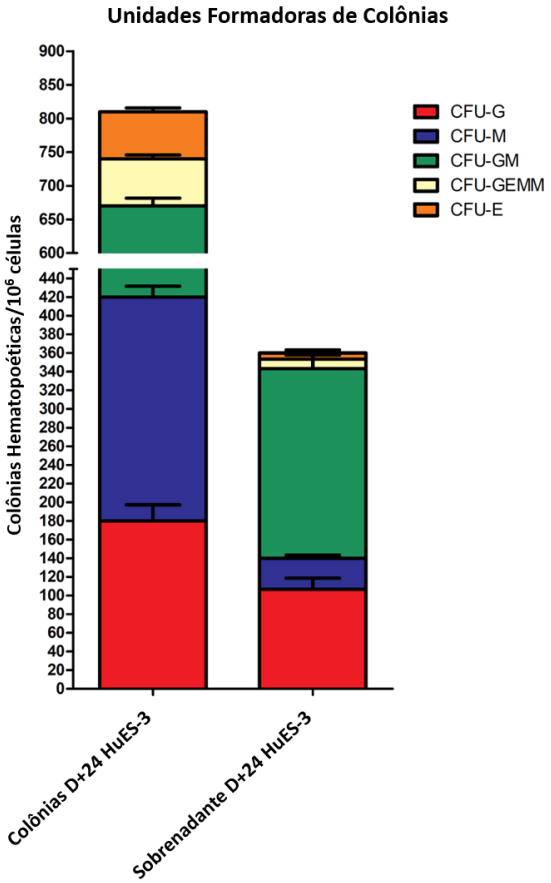


Figura 47 – Diversidade do potencial clonogênico das células hematopoéticas isoladas a partir das colônias diferenciadas e do sobrenadante aos 24 dias de diferenciação da CTEh HuES-3. N=2.

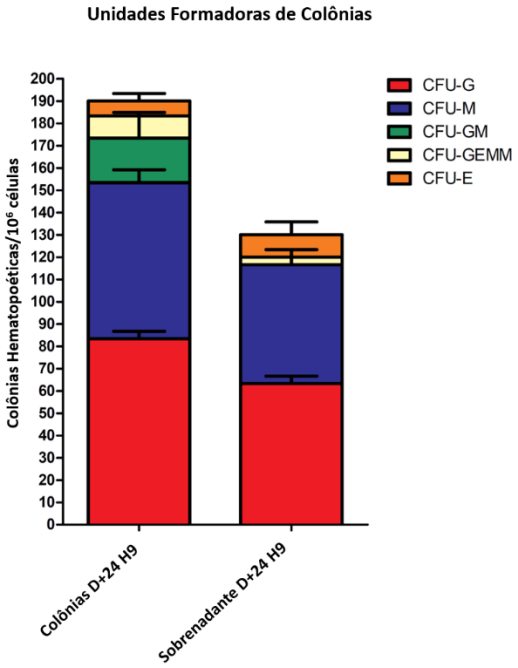


Figura 48 – Diversidade do potencial clonogênico das células hematopoéticas isoladas a partir das colônias diferenciadas e do sobrenadante aos 24 dias de diferenciação da CTEh H9 *feeder*-independente. N=2.

5.9 Diferenciação das CTEhs H1 sobre diferentes MEFs

Para validar o método de diferenciação e avaliar a interferência das MEFs, realizamos 4 ensaios de diferenciação sobre diferentes MEFs: 3 cepas de MEFs produzidas *in house*, denominadas MEF-RP N3 (Figura 49), MEF-RP N5 (Figura 50) e MEF-RP N6 (Figura 52); e 1 linhagem de MEF obtida da ATCC® (Figura 51), denominada MEF ATCC.

Os ensaios de diferenciação realizados sobre as MEFs N3, N5 e ATCC produziram células hematopoéticas com o mesmo perfil imunofenotípico. Entretanto, o experimento realizado sobre a MEF N6 (Figura 52) não foi capaz de produzir células hematopoéticas.

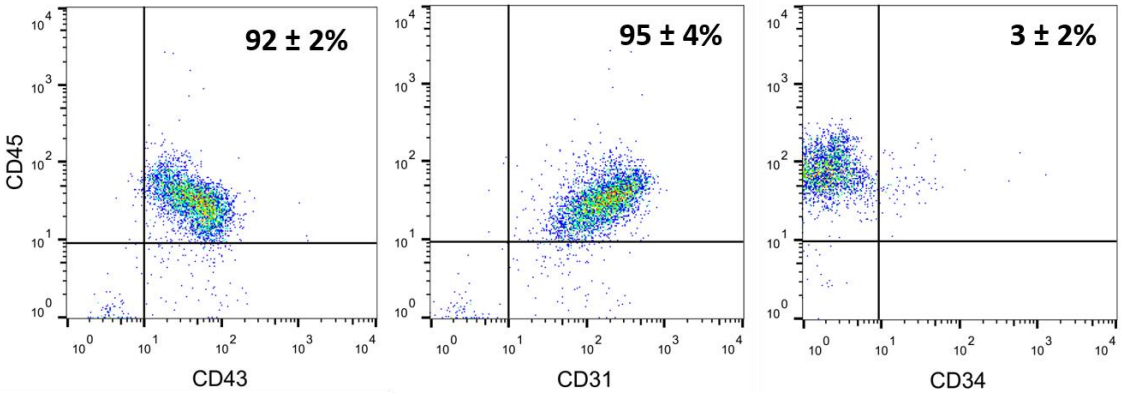


Figura 49 – Avaliação da diferenciação de CTEhs-H1 sobre MEF-RP N3 (D+24). As células hematopoéticas obtidas do sobrenadante da diferenciação coexpressam os marcadores CD45, CD43 e CD31, e CD34 em menor frequencia. N=3.

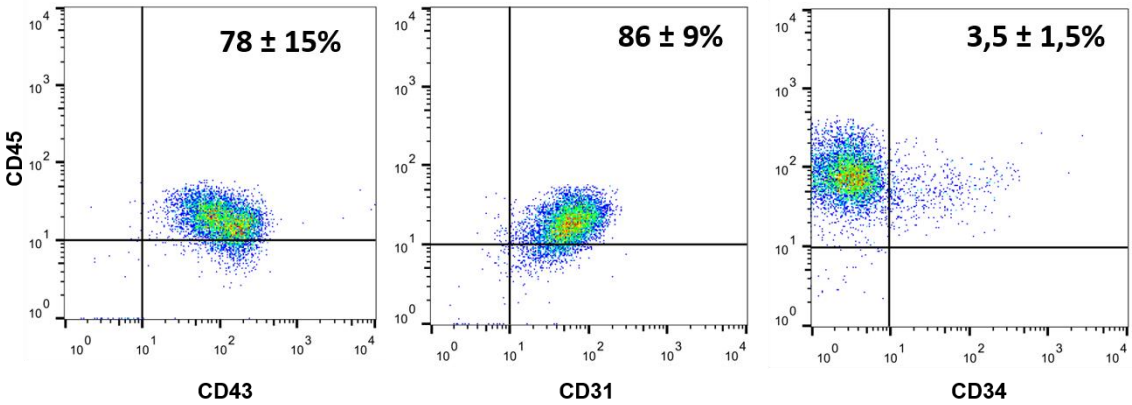


Figura 50 – Avaliação da diferenciação de CTEhs-H1 sobre MEF-RP N5 (D+24). As células hematopoéticas obtidas do sobrenadante da diferenciação coexpressam os marcadores CD45, CD43 e CD31, e CD34 em menor frequencia. N=5.

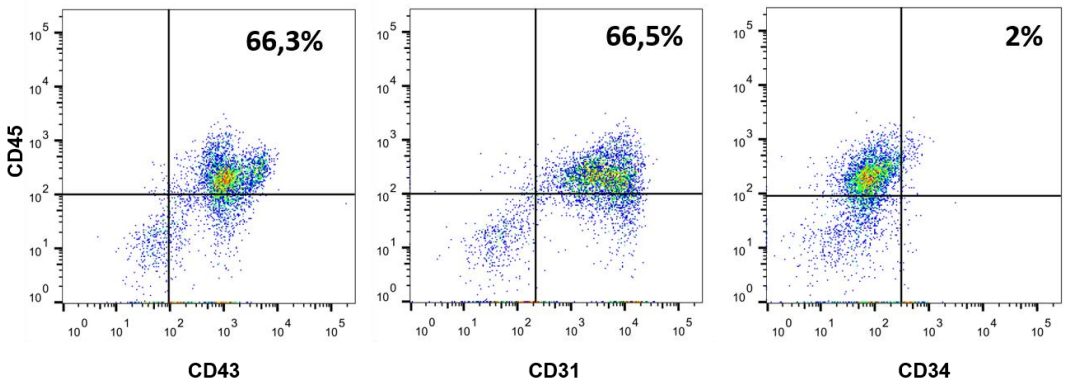


Figura 51 – Avaliação da diferenciação de CTEhs-H1 sobre MEF ATCC (D+24). As células hematopoéticas obtidas do sobrenadante da diferenciação coexpressam os marcadores CD45, CD43 e CD31, e CD34 em menor frequencia. N=1.

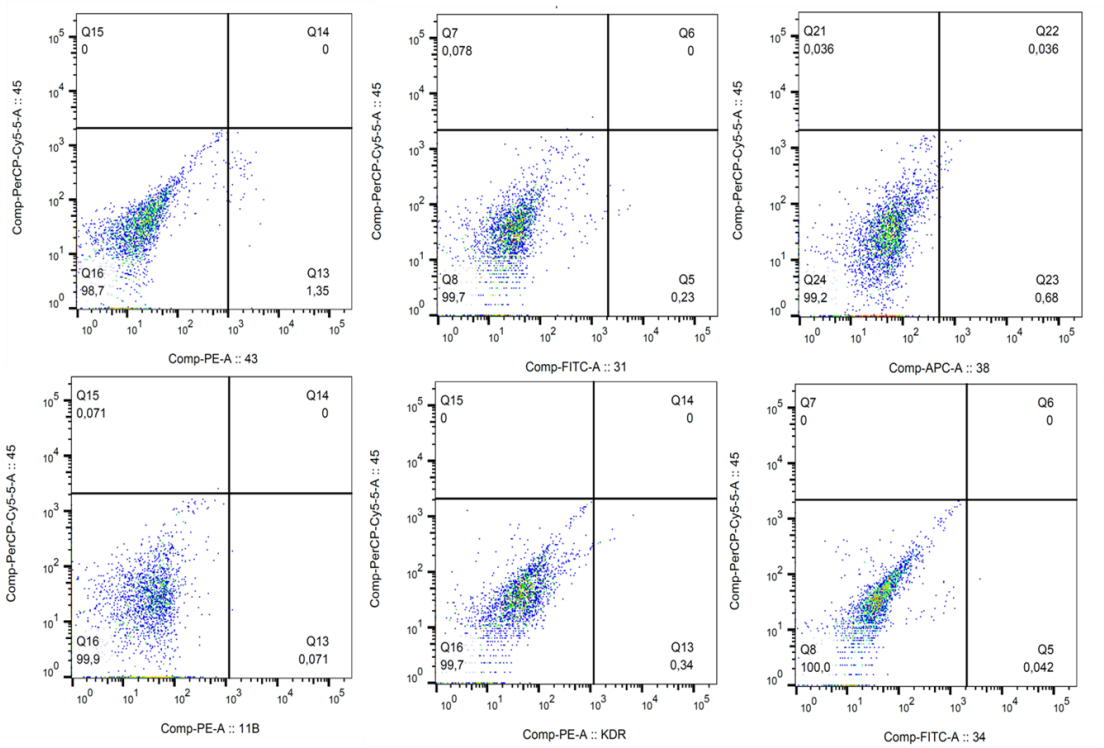


Figura 52 – Avaliação da diferenciação de CTEhs-H1 sobre MEF-RP N6 (D+24). As células isoladas a partir da digestão do sistema de diferenciação não expressam marcadores hematopoéticos. A diferenciação sobre MEF-RP N6 não produziu células hematopoéticas. N=1.

5.10 Avaliação do potencial de comissionamento de subpopulação mielomonocítica

Para investigar o potencial de diferenciação de células que expressam o marcador CD38 e entender como acontece o comissionamento para linhagens hematopoéticas específicas, foi realizado um estudo piloto de isolamento de populações celulares específicas a partir das células obtidas do sobrenadante da diferenciação aos 27 dias para avaliar o

potencial de comissionamento destas populações em células maduras. Neste ensaio foram isoladas duas populações celulares: uma população CD45+43+38-34- e uma população CD45+43+38+34- (Figura 53).

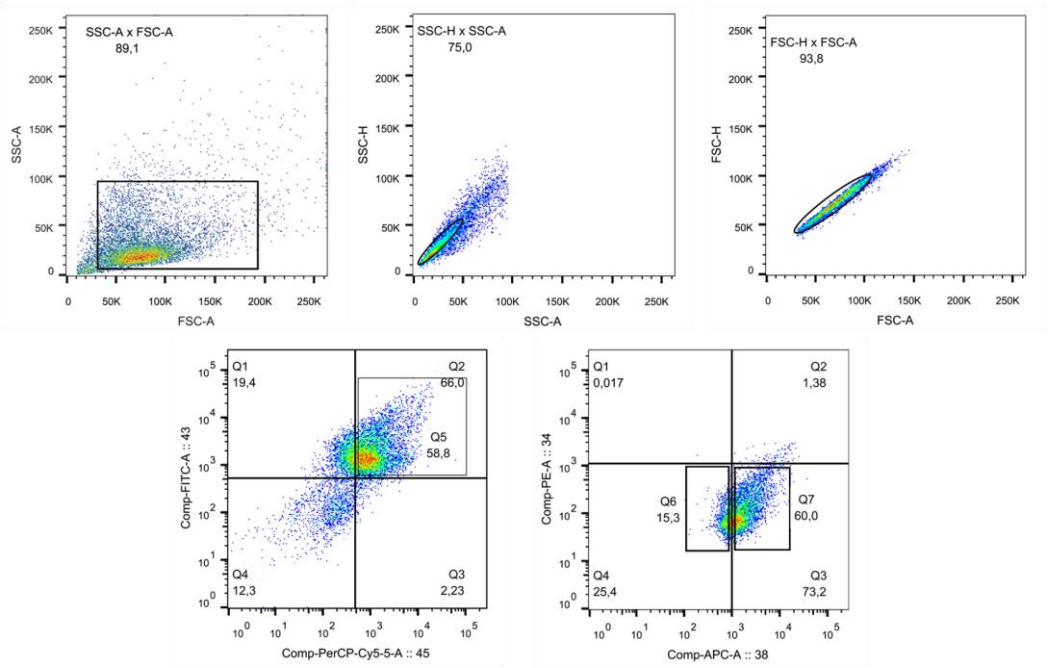


Figura 53 – Isolamento de populações CD45+43+38-34- (Q6) e CD45+43+38+34- (Q7) após 27 dias de diferenciação.

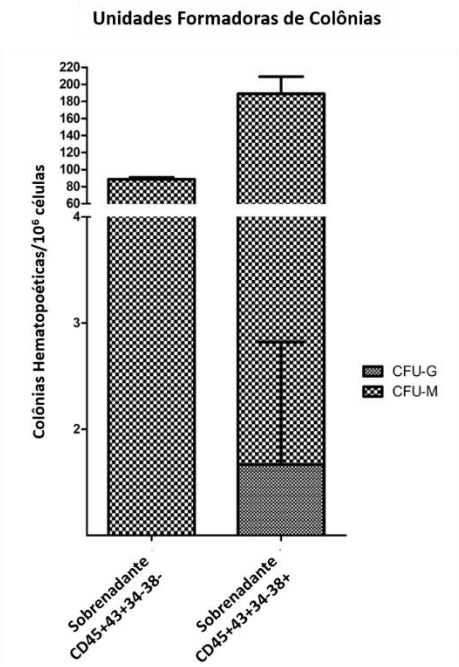


Figura 54 – Avaliação do potencial de comissionamento e formação de colônias das subpopulações CD45+43+38-34- e CD45+43+38+34-. Foi observado que apenas a população CD45+43+38+34- é capaz de produzir colônias de macrófagos (CFU-M) e raríssimas colônias de granulócitos (CFU-G), enquanto a população CD45+43+38-34- produz exclusivamente colônias de macrófagos.

A análise de populações celulares CD45+CD43+CD38+CD34- e CD45+CD43+CD38-CD34- revelou que ambas as populações abrigam células progenitoras mielomonocíticas. Todavia, apenas a população CD45+CD43+CD38+CD34- foi capaz de gerar granulócitos e monócitos/macrófagos maduros, ao passo que progenitores CD45+CD43+CD38-CD34- foram apenas capazes de se diferenciar monócitos/macrófagos maduros, indicando um importante papel para o marcador CD38 durante o comissionamento hematopoético.

5.11 Caracterização *in situ* das células hematopoéticas e do microambiente da diferenciação

Após a padronização do método e caracterização das células obtidas durante os diferentes períodos da diferenciação, passamos a estudar o microambiente de diferenciação hematopoética para caracterizar os elementos que o constituem e sua correlação com os elementos que conhecidamente compõem o nicho hematopoético medular *in vivo*.

Realizamos, inicialmente, um estudo por microscopia eletrônica de varredura para uma análise morfológica do nicho hematopoético artificial criado pela diferenciação das CTEhs (Figura 55).

As análises por microscopia eletrônica de varredura não forneceram muitas informações acerca do microambiente de desenvolvimento das células hematopoéticas, uma vez que parece não existir uma correlação histológica entre o sistema de diferenciação desenvolvido e o nicho medular, a exemplo da presença de tecido ósseo e trabéculas na medula óssea, o que dificultou a interpretação da avaliação morfológica. Os resultados revelaram, no entanto, a complexidade do microambiente da diferenciação, com a presença de células arredondadas, putativas células hematopoéticas, e uma grande diversidade de tecido estromal.

Decidimos então, utilizar ensaios imunohistoquímicos para estudo das populações de células hematopoéticas e dos elementos estromais para avaliar a composição do nicho hematopoético artificial criado pela diferenciação de células embrionárias. Para isso, foi realizada a padronização do protocolo para diferenciação hematopoética em placas de cultivo de 24 poços. Os resultados para a padronização da marcação de células $CD45^+$ (Figuras 56, 57 e 58) revelaram a localização dessas células em nichos formando aglomerados de células

hematopoéticas em diferentes estágios de diferenciação, como pode ser evidenciado pela marcação do núcleo por DAPI.

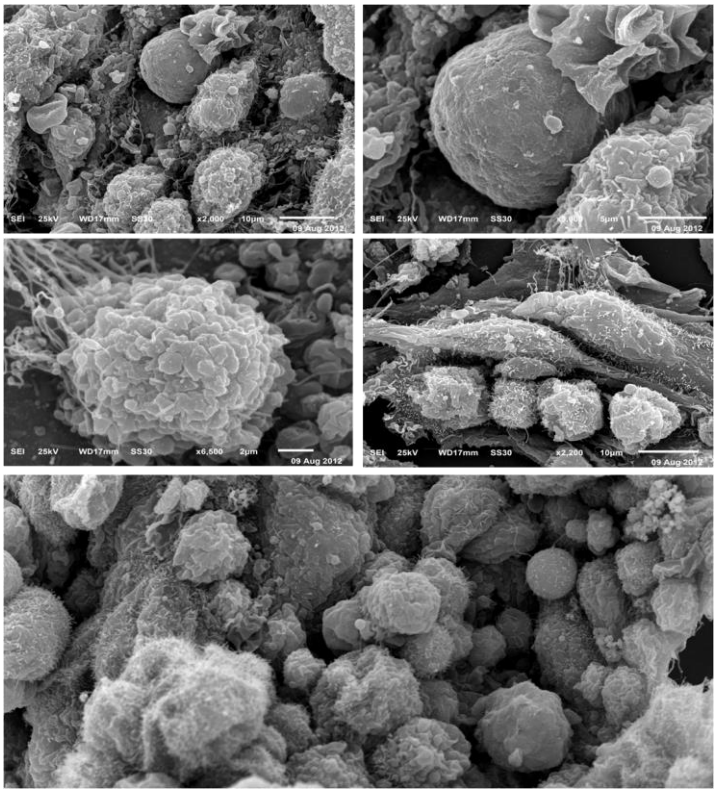


Figura 55 – Avaliação morfológica das colônias em diferenciação por microscopia eletrônica de varredura. As imagens relevaram um microambiente complexo constituído por uma abundante variedade de tipos celulares.

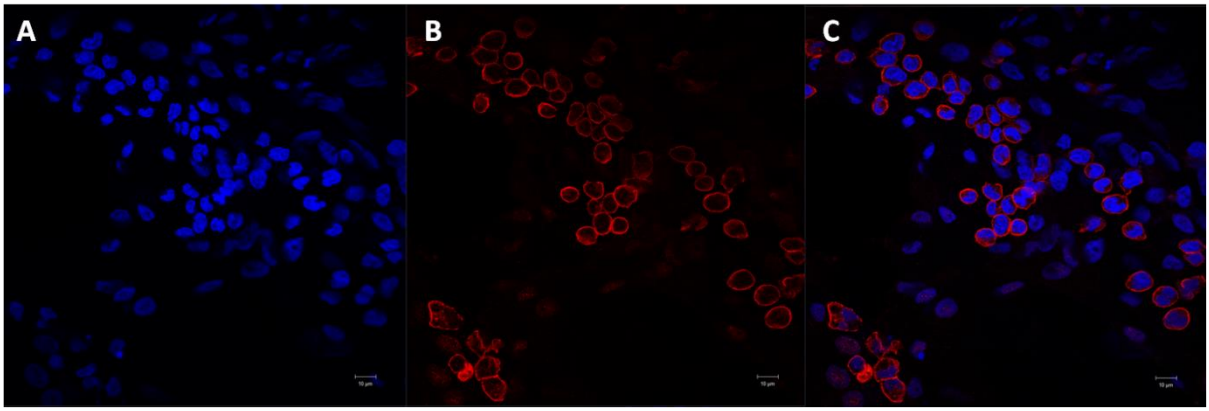


Figura 56 – Expressão do marcador CD45 in situ no nicho de diferenciação em imagem 2D. Pode ser observada uma abundante quantidade de células hematopoéticas $CD45^+$ (vermelho) associadas ao estroma dentro da colônia de CTEh em diferenciação. A, DAPI. B, marcação anti-CD45 humano (vermelho). C, sobreposição DAPI + CD45.

Por se tratar de uma estrutura tridimensional, adotamos a metodologia de avaliação por microscopia confocal por meio de cortes de aproximadamente 1µm de espessura com posterior sobreposição dos cortes para a construção de uma imagem 3D (Figuras 57, 58 e 59).

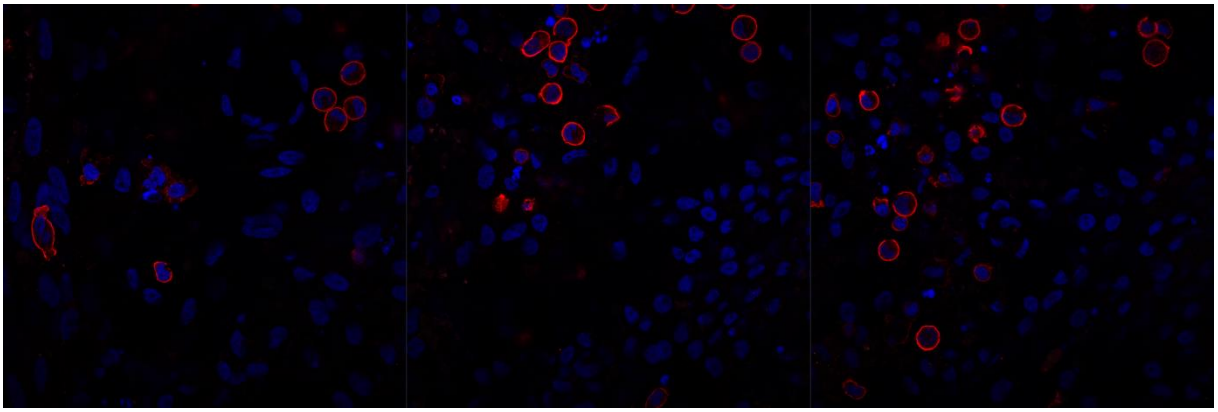


Figura 57 – Marcação para CD45 em plano de 3 cortes. A avaliação da marcação do nicho com anti-CD45 humano (vermelho) em 3 planos de corte demonstrou a existência da população de célula hematopoética $CD45^+$ dentro do nicho de diferenciação. Entretanto, 3 cortes apenas não foram suficientes para a correlação colocalização de núcleo e citoplasma. Azul = DAPI, vermelho = marcação anti-CD45 humano.

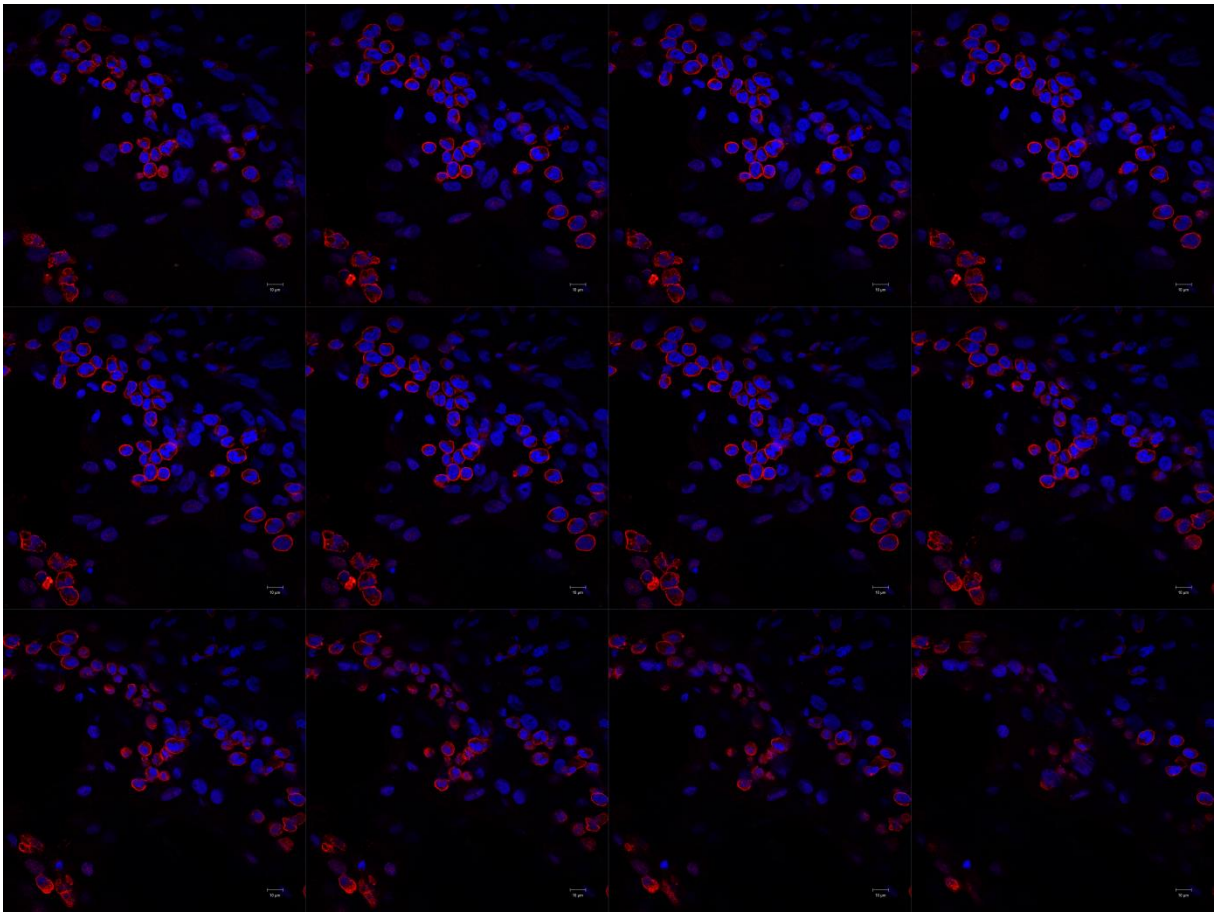


Figura 58 – Marcação para CD45 em plano de 12 cortes. Foi necessária a realização de cortes para a avaliação da presença de células hematopoéticas em diferentes planos devido à grande sobreposição do tecido diferenciado dentro do nicho hematopoético. Azul = DAPI, vermelho = marcação anti-CD45 humano.

A realização da captura de imagens por cortes permitiu uma avaliação tridimensional do microambiente no qual residem células que expressam o marcador CD45 e a construção de uma imagem 3D mais representativa (Figura 59).

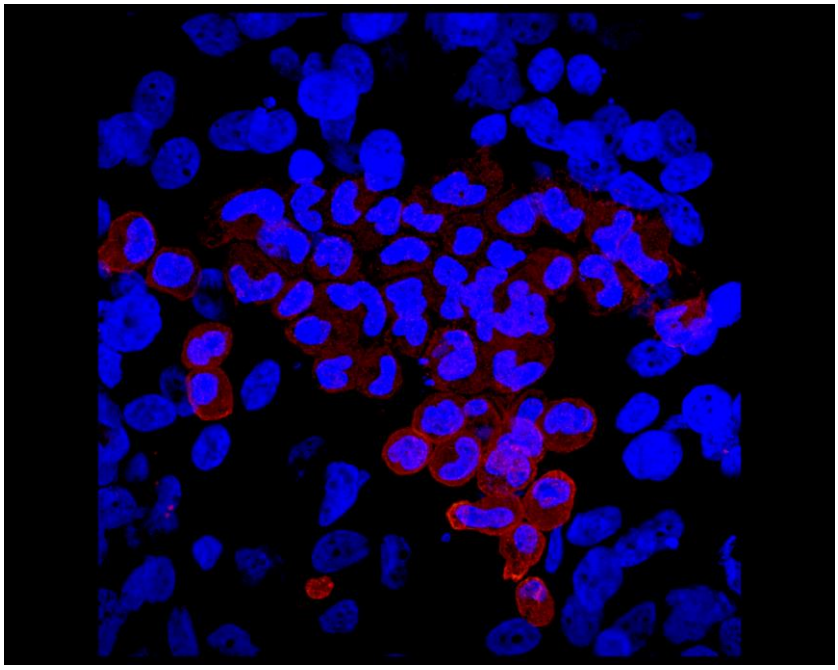


Figura 59 – Imagem 3D de células hematopoéticas CD45+. Foi realizada a sobreposição de 12 cortes para construção de imagem 3D que evidencia a presença de células hematopoéticas que expressam o marcador CD45 dentro do nicho da diferenciação no qual essas células residem.

As avaliações da expressão de CD45 em populações de células hematopoéticas dentro do nicho da diferenciação revelaram o comprometimento com a diferenciação mieloide dessas células evidenciadas pelas suas características morfológicas, principalmente pela arquitetura nuclear.

Também foram realizadas avaliações adicionais para verificar a correlação na expressão das moléculas CD34 e CD31, descritas como expressas por progenitores primitivos responsáveis por dar origem a células endoteliais e hematopoéticas.

Nós constatamos que no 15º dia de diferenciação, as colônias desenvolvem estruturas capilares-*like*, que nós descrevemos durante a avaliação morfológica da diferenciaçãio hematopoética (Figura 27), que expressam principalmente o marcador CD34 (Figura 60).

Essas estruturas capilares-*like* formadas por células $CD34^+$ passam a coexpressar o marcador CD31 aos 20 dias de diferenciação (Figuras 61 e 62). As imagens adquiridas durante a diferenciação hematopoética das CTEhs evidenciam o desenvolvimento de estruturas primitivas, caracterizadas *in vivo* como endotélio hemogênico (Hirschi *et al.*, 2012; Antas *et al.*, 2013), cujas células endoteliais transdiferenciam-se e dão origem às células hematopoéticas.

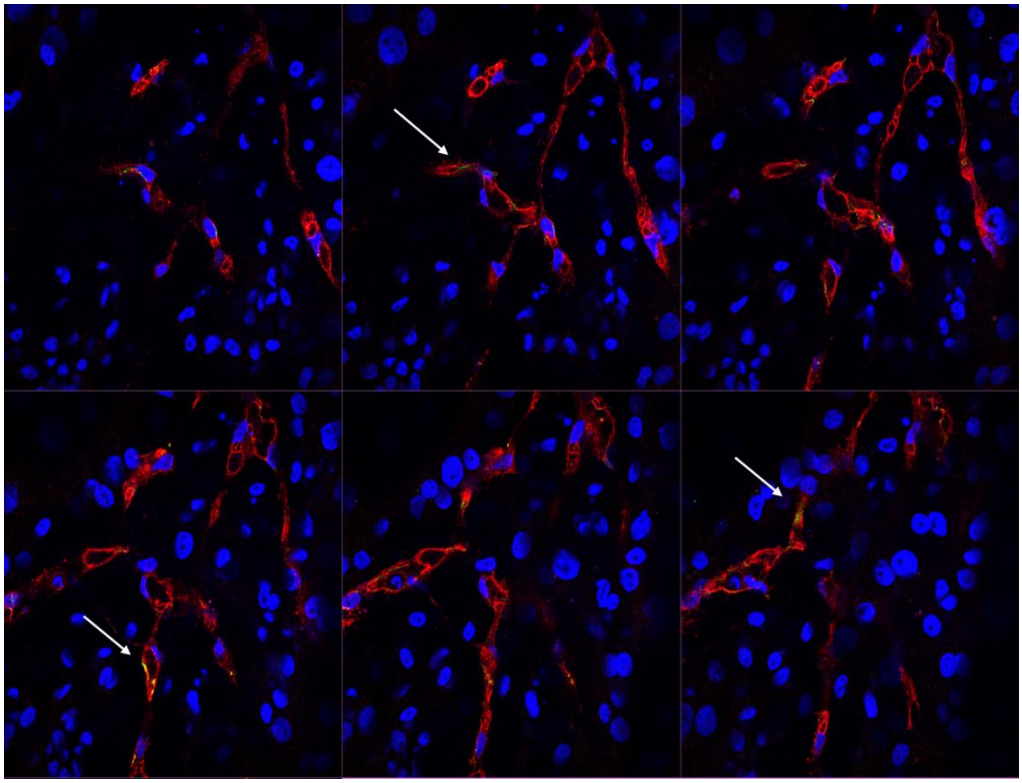


Figura 60 – Avaliação da expressão dos antígenos CD34 e CD31 no 15º de diferenciação das colônias de CTEhs. Observa-se a predominância de estruturas capilares-*like* que expressam o antígeno CD34 (vermelho) com poucas células com coexpressão (setas brancas) de CD31 (verde).

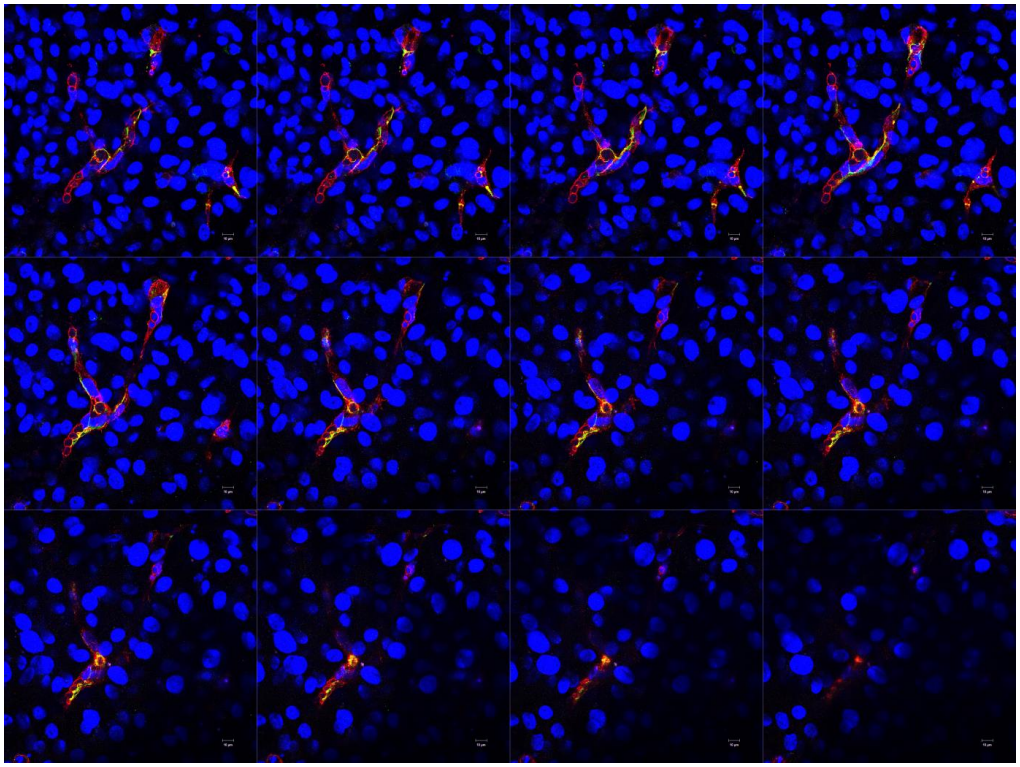


Figura 61 – Avaliação da expressão dos antígenos CD34 e CD31 no 20º de diferenciação das colônias de CTEhs. As estruturas capilares-*like* $CD34^+$ (vermelho) passam a expressar progressivamente o antígeno CD31 (verde).

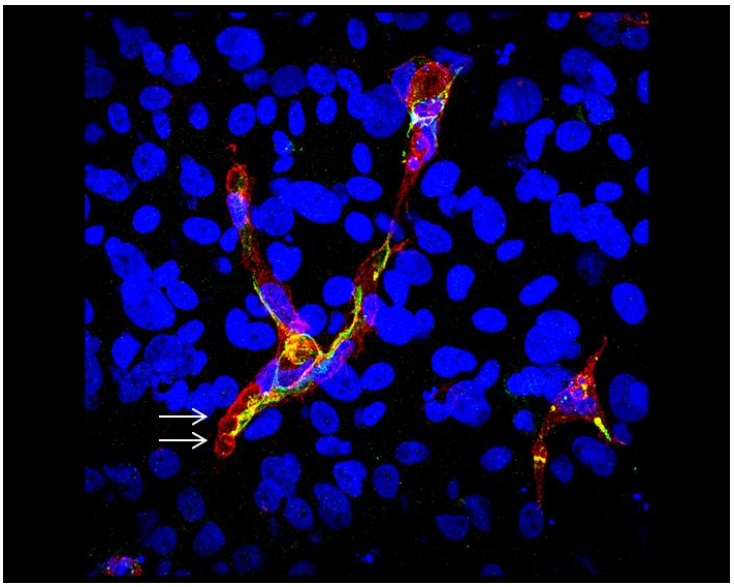


Figura 62 – Imagem 3D com sobreposição de 12 cortes para avaliação da expressão dos antígenos CD34 e CD31 no 20º de diferenciação das colônias de CTEhs. Observa-se a coexpressão do antígeno CD31 (verde) em células $CD34^+$ (vermelho) que constituem estruturas primitivas semelhantes a um endotélio, com células arredondadas $CD34^+$ (setas brancas), putativas células hematopoéticas, associadas.

Os estudos por microscopia confocal permitiram a identificação de células arredondadas (Figura 62, setas brancas) que expressam o marcador CD34 intimamente associadas às estruturas capilares-*like*, assemelhando-se morfologicamente a células hematopoéticas. Estas células $CD34^+$ originadas a partir destas estruturas podem ser o primórdio da origem das células hematopoéticas *in vitro* no nosso sistema de diferenciação. Entretanto, nestes ensaios nós não identificamos a presença de células $CD45^+$ associadas a estas estruturas, a exemplo do que se tem descrito na literatura acerca do surgimento de células hematopoéticas $CD45^+$ a partir do endotélio hemogênico em modelos animais.

O nosso repertório de anticorpos (disponíveis no laboratório) produzidos em diferentes fontes para a realização de marcações duplas para diferentes antígenos limitou nossas análises com relação à averiguação de populações hematopoéticas que expressam outros antígenos e sua correlação com estas estruturas. Futuras análises poderão evidenciar melhor a correlação destas estruturas capilares-*like* com o desenvolvimento das células hematopoéticas *in vitro*.

Além da avaliação a expressão de antígenos hematopoéticos, nós investigamos a existência de elementos conhecidamente importantes para o microambiente hematopoético medular dentro do nosso sistema de diferenciação como colágeno IV e células $Nestina^+$. Os resultados demonstraram a presença de matriz extracelular evidenciada pela expressão de colágeno IV (Figura 63), assim como o desenvolvimento de células $nestina^+$ (Figura 64).

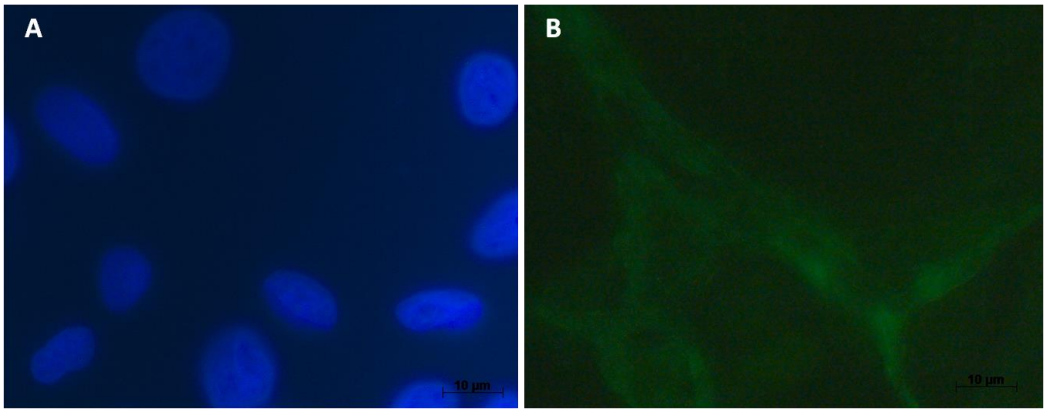


Figura 63 – Expressão de colágeno IV no nicho de diferenciação. Pode ser observada uma a expressão de colágeno IV (verde) em células presentes dentro da colônia de CTEh em processo de diferenciação. **A**, DAPI. **B**, marcação anti-colágeno IV humano (verde). Imagem por imunofluorescência convencional. Aumento: 630x.

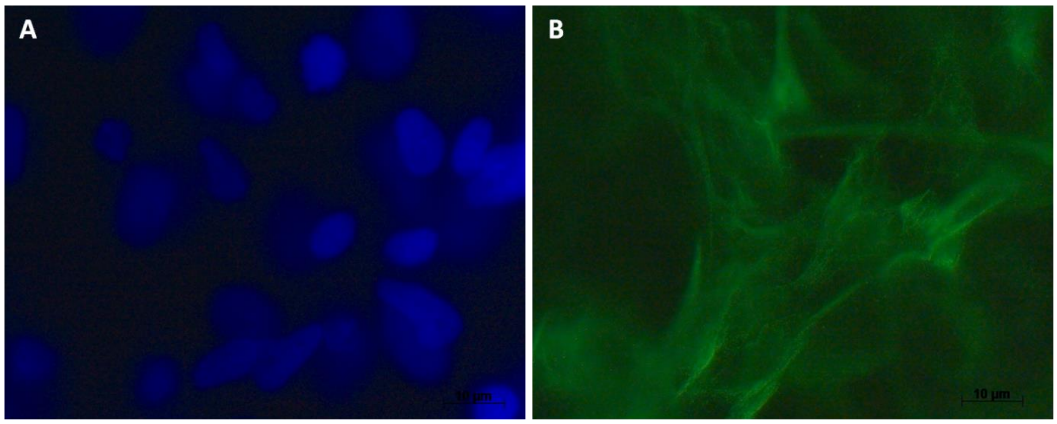


Figura 64 – Expressão de Nestina no nicho de diferenciação. Pode ser observada a expressão de Nestina (verde) em células presentes dentro da colônia de CTEh em processo de diferenciação. **A**, DAPI. **B**, marcação anti-nestina humana (verde). Imagem por imunofluorescência convencional. Aumento: 630x.

5.12 Avaliação Funcional *in vivo* das células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas da diferenciação de CTEhs

Após a caracterização fenotípica e funcional *in vitro* das CTHs obtidas, nós realizamos um ensaio piloto para avaliação da capacidade funcional de reconstituição hematopoética dessas células quando transplantadas em camundongos imunodeficientes. Para isso, realizamos um ensaio piloto com camundongos NSG (NOD/Scid-$\gamma^{null/null}$) que foram irradiados em aparelho de raio-x a 200cGy. As células hematopoéticas foram transplantadas via plexo orbital aproximadamente 4 horas após a irradiação.

Contudo, a irradiação foi letal para a cepa de camundongos NSG, que vieram a óbito entre o 4º e o 5º dia pós-irradiação/pós-transplante. Vários estudos de reconstituição

hematopoética empregaram doses bem maiores de irradiação que variaram de 200 a 350cGy, embora as fontes de irradiação tenham sido diversas (Kim *et al.*, 1999; André *et al.*, 2010; McDermott *et al.*, 2010).

Não obstante, nós fomos verificar se apesar da morte dos animais entre o 4º e 5º dias pós-transplante, as células hematopoéticas transplantadas se alojaram na medula óssea dos animais. Para isso, a medula óssea total da tíbia e fêmur dos camundongos foi isolada e marcada com anticorpo anti-CD45 humano para a detecção das células hematopoéticas humanas $CD45^+$ que foram transplantadas. Os resultados demonstraram que o grupo experimental que foi transplantado com as células hematopoéticas diferenciadas de CTEhs (células hematopoéticas D+24) apresentou um nível maior de quimerismo (0,4 ± 0,2%) quando comparado ao grupo controle transplantado com células hematopoéticas isoladas do sangue de cordão umbilical (SCU, enxertia de 0,15%) (controle positivo) (Figura 65).

Entretanto, devido à aplasia medular dos camundongos promovida pela irradiação, não foi possível isolar células e avaliar os animais do controle positivo (transplantados com células do SCU) isoladamente. Ao invés disso, para não perder parâmetros de comparação, foi realizado um *pool* das células obtidas da medula óssea do grupo controle positivo tornando-a uma amostra única. Por consequência, não foi possível avaliar estatisticamente os resultados.

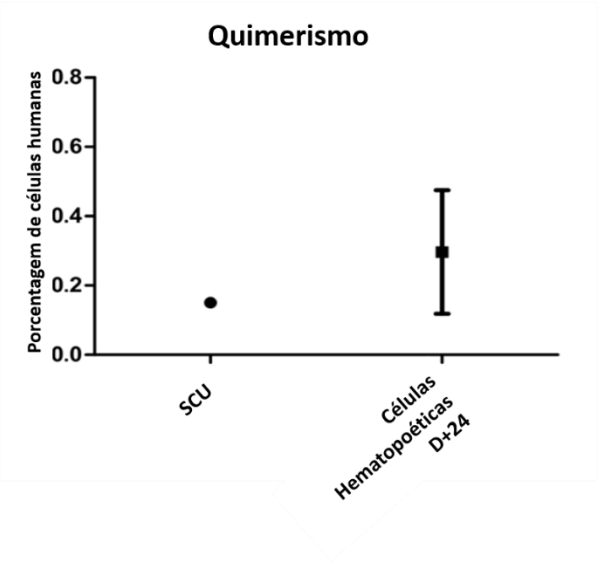


Figura 65 – Quimesrismo pós-transplante. Avaliação do *homing* das CTHs do sangue do cordão umbilical e das CTPHs obtidas de CTEhs (D+24) após 5 dias de transplantadas.

A letalidade da dose de irradiação empregada no nosso primeiro estudo piloto demonstrou que este parâmetro ainda precisava ser melhor avaliado e a dose de irradiação

precisava ser diminuída para permitir que as células hematopoéticas tivessem tempo suficiente para realizarem o domiciliamento (*homing*) e, em princípio, reconstituir o sistema hematopoético dos camundongos. Estudos demonstraram que em ensaios de reconstituição hematopoética, células humanas isoladas de SCU demoram entre 10 e 14 dias para realizarem domiciliamento e enxertamento na medula óssea de murinos (Andrade *et al.*, 2011).

Realizamos então a avaliação do potencial de depleção hematopoética e sobrevida dos camundongos NSG frente a diferentes doses de irradiação para realizarmos os estudos de reconstituição hematopoética com as células diferenciadas a partir de CTEhs.

Foram testadas 4 doses de irradiação (125cGy, 150cGy, 175cGy e 200cCGy) e avaliado o grau de aplasia e depleção de células hematopoéticas no sangue periférico, para verificar qual a melhor dose subletal de irradiação para a realização dos transplantes (Figura 66). Os resultados demonstraram que 150cGy é a melhor dose subletal de irradiação para o nosso estudo (Figura 66A), pois permitiu uma sobrevida dos camundongos de no mínimo 7 dias, necessária para o tempo de *homing* e *engraftment* das células hematopoéticas, com elevada taxa de depleção hematopoética quando avaliados os elementos figurados no sangue periférico.

Após a avaliação da melhor dose de irradiação, iniciamos os ensaios de transplante de células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas da diferenciação de CTEhs. Foram transplantados 2 grupos experimentais com células hematopoéticas diferenciadas de embrionárias. Nos transplantes, foram usadas uma mistura de células isoladas do sobrenadante da diferenciação e células isoladas a partir da digestão total das colônias diferenciadas onde podiam ser observadas células hematopoéticas em desenvolvimento, uma vez que os estudos de potencial clonogênico revelaram que as colônias continham uma maior quantidade de células-tronco/progenitoras com maior potencial de formação de colônias hematopoéticas.

No delineamento experimental inicial dos transplantes, seriam estudados os dois grupos experimentais de 5 animais transplantados com um número igual de $1x10^6$ células por animal em cada grupo por via retro-orbital. Destes 2 grupos, um seria avaliado com 1 mês pós-transplante e o outro, 3 meses pós-transplante.

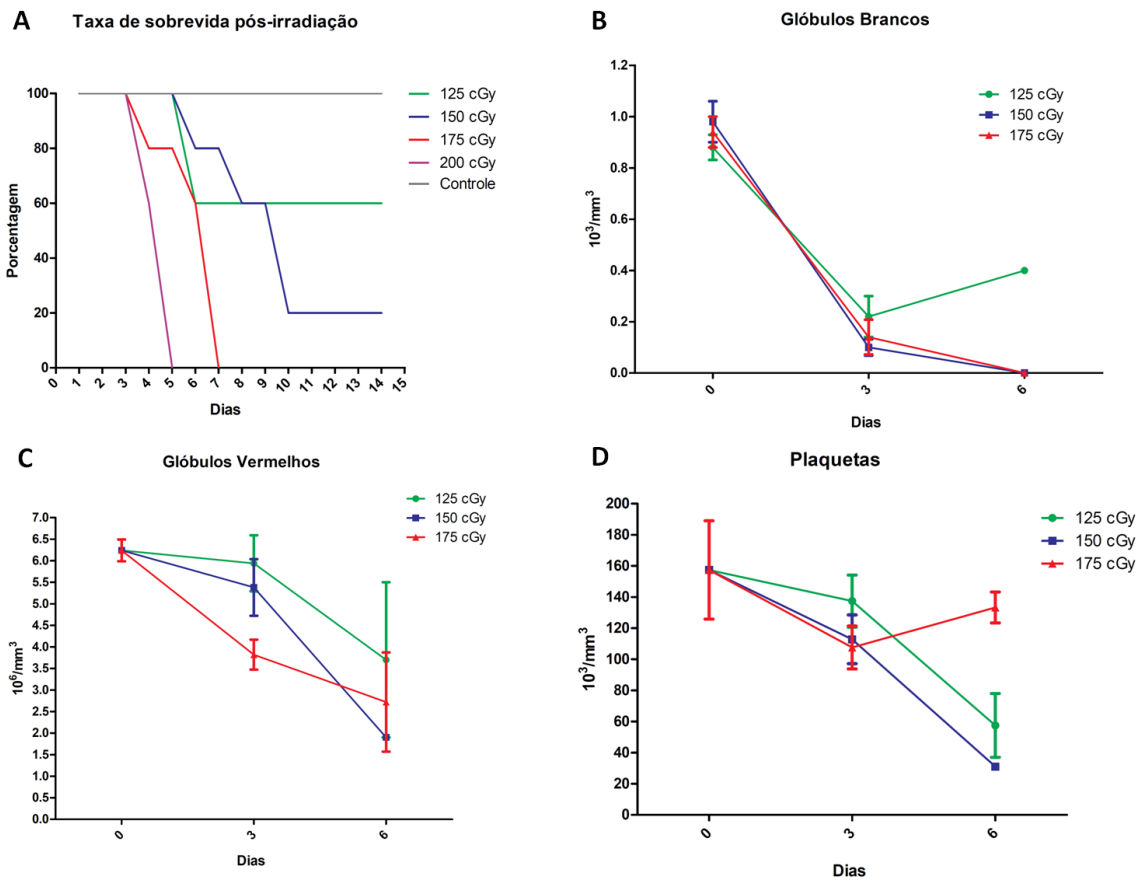


Figura 66 – Avaliação da sobrevida e aplasia celular de camundongos imunodeficientes NSG após irradiação. Foram avaliadas 4 diferentes doses de irradiação com relação à sobrevida dos animais e à aplasia para glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas por hemograma de sangue periférico após 3 e 6 dias de irradiados.

Todavia, os dois primeiros animais transplantados vieram a óbito imediatamente após a infusão das células, provavelmente por causa de embolia. As células que já haviam sido filtradas após o descongelamento, foram novamente filtradas para a retirada de grumos celulares que haviam se formado dentro dos tubos com as alíquotas celulares para transplante.

Dos 3 outros animais transplantados com $1x10^6$ células (refiltradas), todos os animais sobreviveram ao transplante inicial mas apresentaram uma grande demora na recuperação pós-infusão com prejuízo no seu comportamento habitual. Os animais ficaram demasiadamente quietos e apresentaram pouca mobilidade, ou ainda começaram a girar em círculos, um comportamento não-habitual. Atribuímos estes comportamentos a sequelas pós-transplante que não causaram a morte dos animais, em primeira instância, mas que provavelmente estavam interferindo com a fisiologia dos animais. O transplante de todo o nicho de diferenciação pode ter ocasionado obstruções vasculares nos animais por conter células grandes e com alta expressão de matriz celular, além das células hematopoéticas.

Para evitar o mesmo problema com o outro grupo de 5 animais, decidimos diminuir em 25% a dose de células para diminuir o impacto do transplante na fisiologia dos animais. O segundo grupo de animais transplantados com células experimentais receberam via retro-orbital uma quantidade de $7{,}5x10^5$ células constituída pela mesma mistura de células obtidas da digestão das colônias diferenciadas com células hematopoéticas isoladas do sobrenadante da diferenciação. Neste grupo, todos os animais reagiram bem ao transplante, apresentaram boa recuperação sem prejuízo no seu comportamento com relação à mobilidade e alimentação.

Um terceiro grupo de 5 animais receberam células mononucleares totais isoladas do sangue de cordão umbilical, e constituíram o grupo controle positivo.

Dos 3 animais sobreviventes do grupo experimental que receberam $1x10^6$, 2 animais morreram até o 3º dia pós-transplante e não foi possível a obtenção de material para os estudos de enxertia. O terceiro animal deste grupo começou a agonizar no 9º dia pós-transplante. Decidimos então eutanasiá-lo, isolar e digerir seus órgãos para verificar se as células hematopoéticas diferenciadas de CTEhs e transplantadas nestes animais haviam migrado para estes sítios anatômicos. Foram avaliados a medula óssea, o baço e o fígado do camundongo eutanasiado (Figura 67).

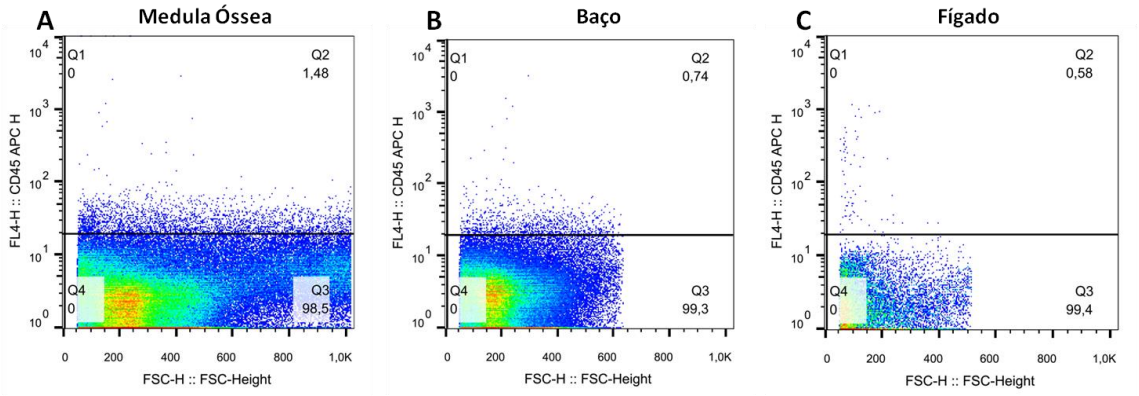


Figura 67 – Avaliação do enxertamento de células hematopoéticas humanas em camundongo eutanasiado no 9º dia pós-transplante com estroma de diferenciação hematopoética D+24. Foi observada uma baixa frequência de células hematopoéticas humanas derivadas da diferenciação de CTEhs em camundongo transplantado com $1x10^6$ células e eutanasiado no 9º dia pós-transplante.

Foi observada uma baixa frequência de células humanas nos órgãos avaliados: 1,48% na medula óssea, 0,74% no baço e 0,58% no fígado. Essa baixa frequência poderia ser atribuída, em princípio, ao curto período de tempo entre o dia do transplante e o dia de avaliação do enxertamento.

Os dois outros grupos de animais (grupo experimental que recebeu $7,5x10^5$ células e grupo controle positivo que recebeu células de sangue de cordão umbilical) foram mantidos vivos por 6 semanas. Entretanto, dos 5 animais em cada grupo, 2 animais (de cada grupo) vieram a óbito até o 12º dia pós-transplante, dos quais também não foi possível a obtenção de amostras frescas com tecidos viáveis para estudos de enxertamento.

Após 6 semanas, os 3 animais sobreviventes de cada grupo foram eutanasiados e tiveram a medula óssea (Figura 68), o sangue periférico (Figura 69), o baço (Figura 70) e o fígado (Figura 71) coletados e processados para avaliação do enxertamento por células hematopoéticas humanas nestes órgãos. Os gráficos A, B e C das análises de medula óssea, baço e fígado representam os 3 animais transplantados com células mononucleares de sangue de cordão umbilical, onde A = animal 1, B = animal 2 e C = animal 3. Os gráficos D, E e F nestas mesmas figuras, os animais transplantados com células hematopoéticas obtidas da diferenciação de CTEhs, onde D = animal 1, E = animal 2 e F = animal 3.

Os camundongos transplantados com células mononucleares de sangue de cordão umbilical (controle positivo) apresentaram elevado, porém variável, percentual de enxertamento com células humanas na medula óssea (10,1% ± 11,9%) (Figura 68A, B e C), no baço (9,97% ± 3,53%) (Figura 70A, B e C) e no fígado (6,57% ± 6,43%) (Figura 71A, B e C), mas baixo quimerismo no sangue periférico (1,4% ± 0,95%) (Figura 69A e B), muito próximo ao quimerismo observado no sangue periférico de animais transplantados com células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas da diferenciação de CTEhs (0,62% ± 0,06%) (Figura 69C, D e E).

Os camundongos transplantados com células hematopoéticas (nicho de diferenciação + células hematopoéticas do sobrenadante do sistema da diferenciação), no entanto, apresentaram consistentemente uma baixa e uniforme enxertia nos 3 animais analisados e em todos os órgãos avaliados: medula óssea (0,42% ± 0,04%) (Figura 68D, E e F), sangue periférico (0,62% ± 0,06%) (Figura 69D, E e F), baço (0,4% ± 0,28%) (Figura 70D, E e F) e fígado (0,01% ± 0,03%) (Figura 71D, E e F).

Das amostras de sangue de sangue periférico coletadas dos animais transplantados com células do sangue do cordão umbilical, apenas as amostras dos animais 2 (Figura 69A) e 3 (Figura 69B) foram viáveis para análise por citometria de fluxo. A amostra obtida do animal 1 coagulou e não foi possível de ser analisada. As figuras 69C, 69D e 69E, representam os animais 1, 2 e 3, respectivamente, transplantados com células-tronco/progenitoras hematopoéticas diferenciadas a partir de CTEhs.

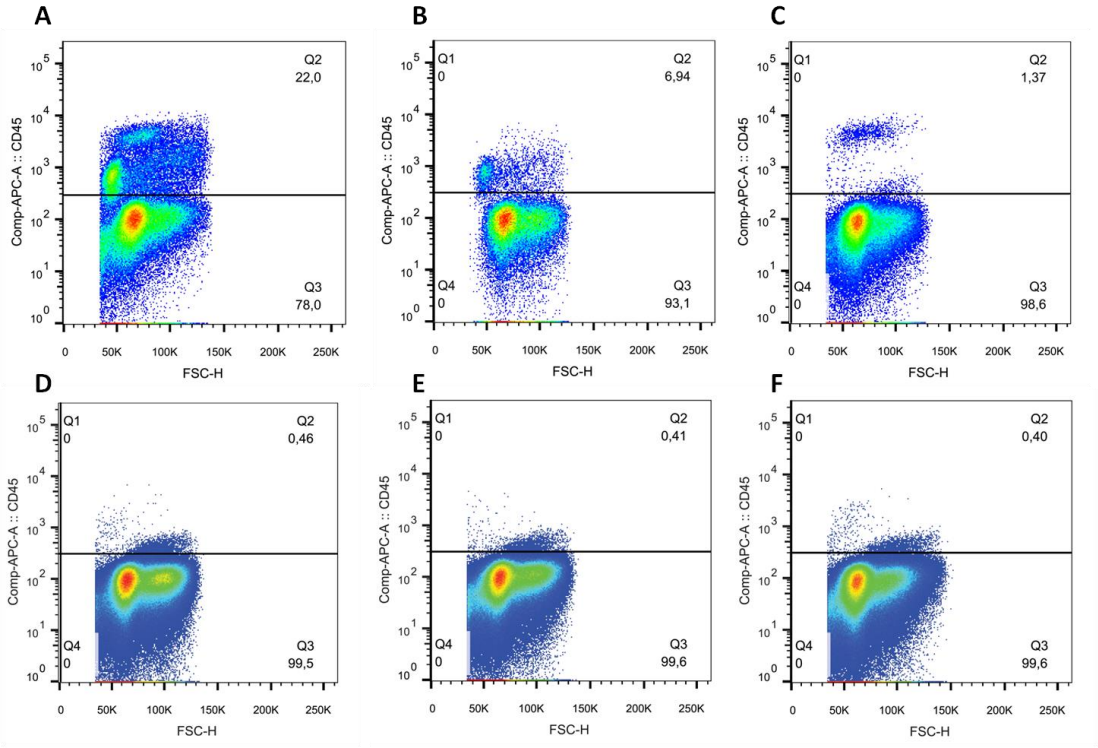


Figura 68 – Análise do enxertamento com células humanas na medula óssea de camundongos 6 semanas pós-transplante. A, B e C, medula óssea de camudongos transplantados com células mononucleares isoladas de sangue de cordão umbilical (controle positivo); D, E e F, medula óssea de camundongos transplantados com células hematopoéticas obtidas da diferenciação *in vitro* de CTEhs.

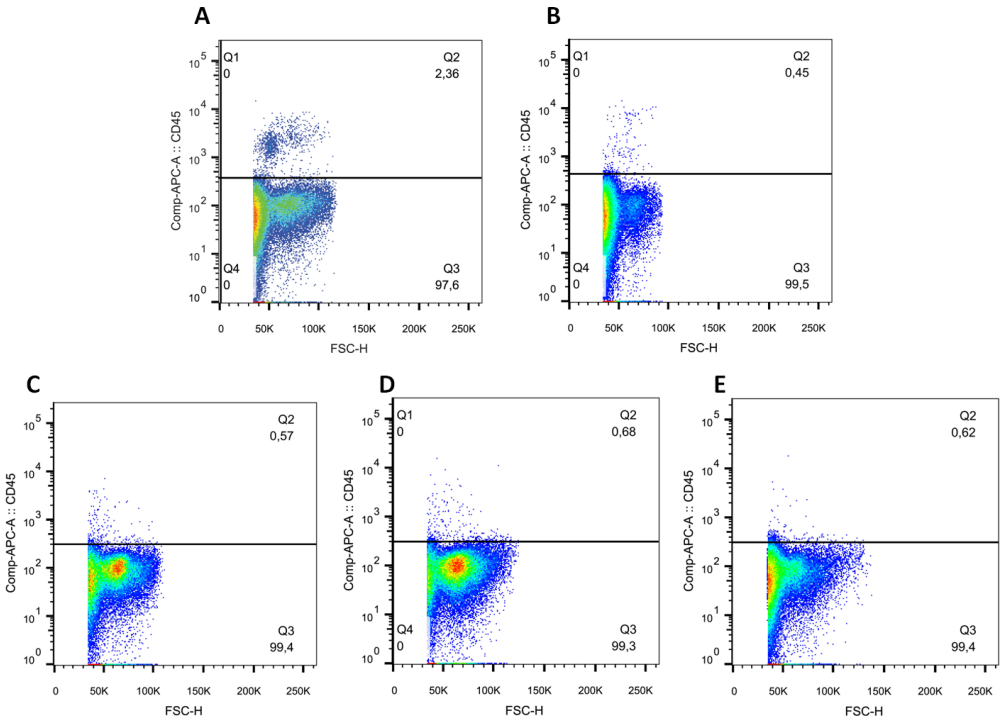


Figura 69 – Análise da presença de células humanas no sangue periférico de camundongos 6 semanas pós-transplante. A e B, sangue periférico de camundongos transplantados com células hematopoéticas isoladas de sangue de cordão umbilical. C, D e E,sangue periférico de camundongos transplantados com células hematopoéticas obtidas da diferenciação *in vitro* de CTEhs.

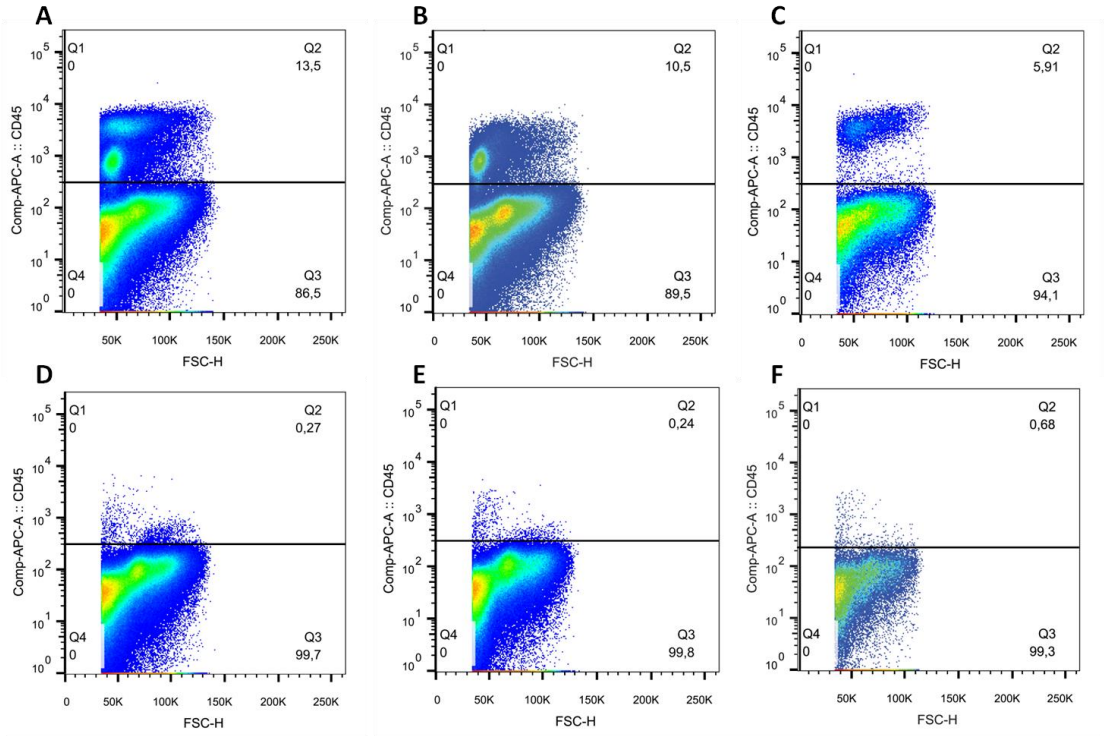


Figura 70 – Análise do enxertamento com células humanas no baço de camundongos 6 semanas pós-transplante. A, B e C, baço de camudongos transplantados com células mononucleares isoladas de sangue de cordão umbilical (controle positivo); D, E e F, baço de camundongos transplantados com células hematopoéticas obtidas da diferenciação *in vitro* de CTEhs.

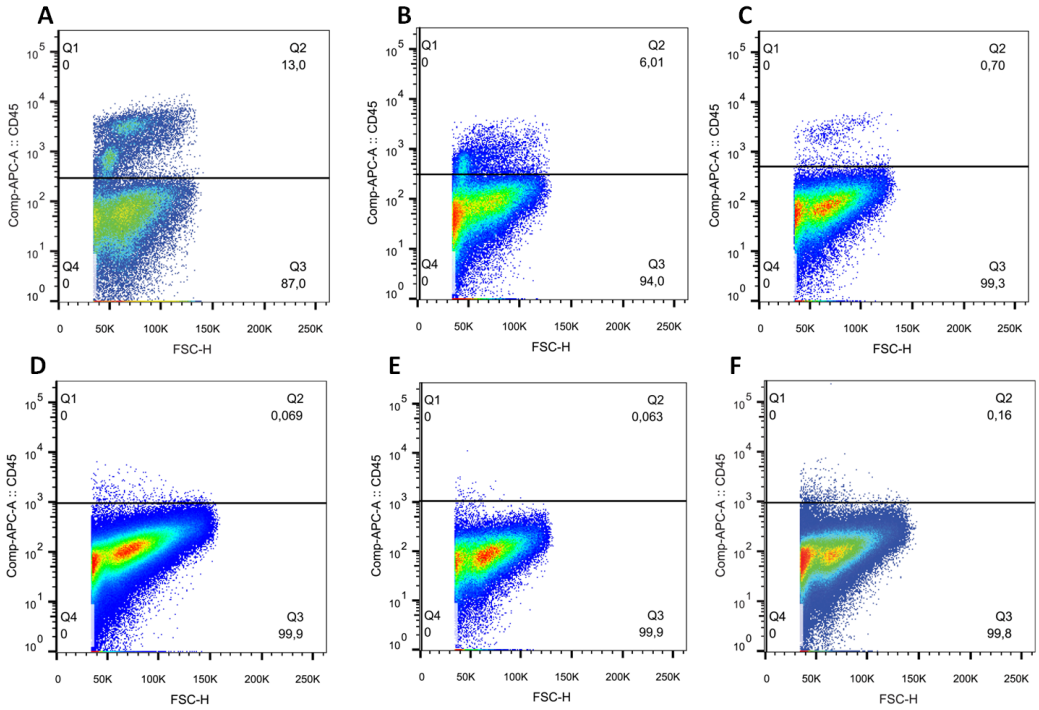


Figura 71 – Análise do enxertamento com células humanas no fígado de camundongos 6 semanas pós-transplante. A, B e C, fígado de camudongos transplantados com células mononucleares isoladas de sangue de cordão umbilical (controle positivo); D, E e F, fígado de camundongos transplantados com células hematopoéticas obtidas da diferenciação *in vitro* de CTEhs.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

As células-tronco embrionárias (CTEs) isoladas da massa celular interna de blastocistos de mamíferos e cultivadas *in vitro*, apresentam capacidade de se diferenciarem em todos os tipos de células somáticas de um do seu organismo de origem. Devido a essa propriedade, essas células são classificadas como células-tronco pluripotentes. Além disso, as CTEs possuem capacidade proliferativa ilimitada *in vitro* quando mantidas sob condições específicas de cultura, ao passo que mantêm sua propriedade de célula pluripotente (Thomson *et al.*, 1998).

As primeiras CTEs foram isoladas a partir de embriões de camundongos no início da década de 80 (Evans, 1981), porém somente no final dos anos 90 foi estabelecida a primeira linhagem de CTE derivada da espécie humana (CTEh) (Thomson *et al.*, 1998). Desde então, as CTEhs têm sido amplamente empregadas nos estudos de diferenciação celular e para obtenção de tipos celulares específicos, tais como neurônios, cardiomiócitos, células do músculo liso, hematopoéticas, osteócitos, hepatócitos, queratinócitos, células produtoras de insulina, células endoteliais, entre outro (Reubinoff *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001; Kehat *et al.*, 2001; Kaufman *et al.*, 2001; Sottile *et al.*, 2003; Green *et al.*, 2003; Rambhatla *et al.*, 2003; Levenberg *et al.*, 2002).

O grande potencial de diferenciação dessas células em linhagens celulares específicas por métodos de indução *in vitro* faz delas grandes promessas para o desenvolvimento de novas tecnologias aplicáveis à medicina regenerativa e terapia celular (Thomson *et al.*, 1998; Kaufman *et al.*, 2001)

Embora diversos grupos de pesquisa já tenham derivado CTHs e tipos específicos de células hematopoéticas a partir de CTEhs *in vitro*, a avaliação funcional dessas células em modelos *in vivo* tem sido decepcionante. Até o presente momento, não há relatos da produção de CTHs com capacidade de repovoamento da medula óssea por longos períodos e de maneira completa com a subseqüente produção de todas as linhagens hematopoéticas. Desse modo, diversos grupos de pesquisa têm focado nos mecanismos que governam e determinam o potencial de *engraftment* e *homing* das CTHs derivadas de CTEhs (Wang *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2005; Tian *et al.* 2006).

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

Neste trabalho, nós demonstramos que após o cocultivo da população CTEh da linhagem H1 não diferenciada $CD34^-/CD45^-/CD31^-$ com células estromais de embriões murinos (MEFs) em meio de diferenciação por 31 dias, pode-se obter uma população celular $CD45^+/$ $CD43^+/$ $CD31^+/CD34^{low}$. As células hematopoéticas obtidas por nosso grupo de pesquisa apresentam características imunofenotípicas de células adultas, ou seja, de hematopoese definitiva, diferente dos demais grupos de pesquisa (Wang *et al.,* 2004; Sasaki *et al.,* 2005; Tian *et al.,* 2006) que demonstraram a obtenção de células com características ainda de hematopoese primitiva, o que aumentou nosso interesse pela investigação do potencial funcional dessas células e de uma caracterização mais detalhada.

Em nosso estudo, fomos capazes de produzir todas as células das linhagens eritroide e mielóide em diferentes estágios de maturação. O perfil imunofenotípico e as análises citológicas demonstraram que no 31° dia, no qual foi observada a maior quantidade de células positivas para marcadores hematopoéticos, as células eram majoritariamente da linhagem granulocítica.

Durante a diferenciação, por não se tratar de células únicas e sim de colônias de células, o potencial de diferenciação das CTEhs pode variar grandemente entre as próprias colônias em um mesmo sistema de cultivo e sob mesmas condições. Isso se deve à heterogeneidade de células que constituem cada colônia (Thomson *et al.,* 1998), visto que as CTEhs também se diferenciam espontaneamente em outros tipos celulares mesmo em sistema de diferenciação induzida. Sendo que os fatores que influenciam o cultivo e a propensão de diferenciação espontânea das CTEhs ainda não são completamente conhecidos.

Para promover a diferenciação hematopoética de forma mais eficiente, foi elaborado um meio de diferenciação contendo SFB ao qual foram adicionadas citocinas e fatores de crescimento hematopoéticos que têm sido mais comumente descritos nos protocolos de diferenciação hematopoética via corpos embrióides (Chadwick *et al*, 2003; Zhan *et al.*, 2004), em baixas doses, uma vez que as células alimentadoras, a princípio, já secretariam certa quantidade desses fatores.

Inicialmente, foram adicionadas citocinas indutoras da formação de mesoderma durante os três primeiros dias, tais como BMP4, VEGF, TPO e SCF. Este período inicial de diferenciação utilizando tais citocinas tem sido descrito na literatura como tempo ótimo para o surgimento e proliferação de células com potencial hematoendoteliais primitivas (Chadwick *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2004). Passadas as 72 horas iniciais da diferenciação mesodérmica, as células passaram a ser cultivadas em meio de diferenciação contendo sete citocinas hematopoéticas (SCF, EPO, IL-3, IL-6, G-CSF, FLT3L e IGF) para dirigir a diferenciação de forma mais específica. O uso dessas citocinas justifica-se pela tentativa de mimetizar a influência do microambiente hematopoético que atua através da secreção de fatores solúveis que induzem e controlam a hematopoese (Arai *et al.*, 2004; Lapidot *et al.*, 2005).

A análise imunofenotípica por citometria de fluxo das células obtidas demonstrou a reprodutibilidade e consistência do protocolo na obtenção de CTHs/CPHs positivas para os marcadores CD45, CD43, CD31 e CD34 utilizando diferentes MEFs como células alimentadoras e diferentes linhagens de células embrionárias.

O marcador CD45, tem emergido como uma das principais moléculas expressas pelas CTHs *long term*, que são as CTHs da hematopoese definitiva com potencial de reconstituição hematopoética *in vivo* por um longo período. Estudos *in vivo* revelaram que a coexpressão da molécula CD34 com CD45 parece ser a principal característica imunofenotípica dessas células (Ledran *et al.*, 2008; Amabile *et al.*, 2013). Em nosso estudo, nós também evidenciamos a presença de células $CD45^{+}CD34^{+}$, que coexpressam os antígenos CD43 e CD31. Isso demonstra que nosso sistema de diferenciação, diferente dos demais grupos de pesquisa, é capaz de produzir CTHs com imunofenótipo maduro e que, em princípio, poderiam possuir um grande potencial de reconstituição hematopoética *in vivo*, justificando os estudos adicionais de caracterização fenotípica e funcional dessas células.

Para avaliar se as populações de células obtidas das colônias de CTEhs diferenciadas (células hematopoéticas aderentes ao estroma) e das células hematopoéticas recolhidas do

sobrenadante do meio de diferenciação (células que proliferam de maneira independente de ancoragem ao estroma) eram enriquecidas em CTHs com potencial clonogênico, foram realizados ensaios de formação de colônias hematopoéticas através do cultivo em meio semi-sólido de metilcelulose. Essa técnica é uma maneira de inferir indiretamente por estudos *in vitro* qual seria a capacidade funcional *in vivo* dessas células, uma vez que essas colônias abrigam células com grande potencial proliferativo e de diferenciação.

Nós então comparamos o potencial total de formação de colônias das células obtidas pelo nosso grupo de pesquisa com o potencial de CTHs isoladas do sangue de cordão umbilical. Os estudos clonogênicos *in vitro* demonstraram que não houve diferença significativa com relação à capacidade de formação de colônias das CTHs/CPHs isoladas a partir das colônias e do sobrenadante do sistema de diferenciação desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa quando comparadas ao potencial de formação de colônias das células isoladas do sangue de cordão umbilical, indicando uma semelhança na capacidade funcional *in vitro* das células obtidas de ambas as fontes.

Nós demonstramos, pela primeira vez, um protocolo de diferenciação para a obtenção de CTHs utilizando MEFs (*mouse embryonic fibroblasts*) derivadas *in house* a partir de embriões de camundongos C57/BL6 entre os períodos E13.5 e E14.5, como células estromais. As MEFs têm sido amplamente empregadas na derivação e nos protocolos para expansão das CTEhs (Thomson *et al.*, 1998; Kaufman *et al.*, 2001). No entanto, foi demonstrado que essas células não são capazes de promover a diferenciação hematopoética a partir de CTEhs (Kaufman *et al.*, 2001).

Porém, ao contrário do que tem sido descrito, nosso grupo tem demonstrado que a diferenciação hematopoética das CTEhs é possível de ser realizada sobre MEFs em meio enriquecido com fatores de crescimento e na presença de soro fetal bovino, e permite o desenvolvimeto de células que apresentam características imunofenotípicas de CTHs definitivas.

Essa hipótese foi testada, uma vez que, as MEFs são derivadas a partir de tecidos fetais murinos que abrigam importantes sítios de hematopoese definitiva durante o desenvolvimento, a exemplo da região AGM (aorta-gônada-mesonefros) (Cumano *et al.*, 2001; Tavian *et al.*, 2001). Desse modo, as MEFs possuiriam, em parte, propriedades de potencial hematopoético dos tecidos isolados dessa região, seriam mais fáceis de serem derivadas e empregadas nos estudos de diferenciação hematopoética das CTEhs, pois não

exigiriam a dissecção microcirúrgica para isolamento das regiões de aorta, gônada e mesonefros para serem utilizadas como células alimentadoras, como demonstrado por Ledran *et al.* (2008).

Alguns estudos demonstraram que a formação de EBs a partir de CTEhs cultivadas em placas de baixa aderência e em meio suplementado com SCF, FLT3L, IL-3, IL-6, G-CSF e BMP4, induz a hematopoese. Foi observado nestes estudos que 15% das células derivadas de EBs expressavam o marcador CD45, possuíam propriedades de progenitores hematopoéticos multilinhagens e potencial de formação de colônias hematopoéticas no 15º dia de diferenciação. No 22° dia, mais de 90% das células eram positivas para o marcador CD45 e apresentavam o mesmo potencial hematopoético detectado no 15° dia (Chadwick *et al.*, 2003; Zhan *et al.*, 2004).

Em outro estudo, Zhan *et al.* (2004), apresentaram uma modificação deste protocolo e demonstraram que a partir da diferenciação de CTEhs por meio da formação de EBs por 10-20 dias, com posterior plaqueamento dessas estruturas e cultivo em placas tratadas para adesão celular, em meio KO-DMEM (*Knock-out Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com SFB, SCF, FLT3L, TPO, IL-3, IL-4 e G-CSF, é possível a obtenção de células hematopoéticas após 27 a 30 dias de iniciada a diferenciação.

O uso de SFB e citocinas como SCF, FLT3L, IL-3, IL-6, G-CSF e BMP4 em meios de cultivo para diferenciação são capazes de promover a produção de células hematopoéticas $CD45^+$ por meio da formação dos EBs. Interessantemente, quando as citocinas hematopoéticas são removidas após 10 dias de induzidos os EBs, nenhum prejuízo é observado na diferenciação hematopoética, indicando que as citocinas utilizadas nestes protocolos de diferenciação parecem atuar principalmente nos estágios iniciais do desenvolvimento das CTHs a partir das CTEhs, e não exercem grande influência em células mais diferenciadas (Chadwick *et al.*, 2003).

Adicionalmente, os estudos de Zambidis *et al.* (2005) revelaram que após o cultivo em meio suplementado com EPO, GM-CSF, SCF, G-CSF, IL-3 e IL-6, células $CD45^+$ derivadas dos EBs formam colônias de células semelhantes aos cobblestones e a estruturas observadas durante o desenvolvimento hematopoético no saco vitelino *in vivo* (Blazsek *et al.*, 2000), que passam a produzir CPHs multipotenciais, eritroblastos primitivos e macrófagos.

Análises posteriores dessas estruturas revelaram que células-tronco/progenitoras hematopoéticas surgiam em diferentes momentos e com características particulares.

Inicialmente, foi observado o desenvolvimento de hematopoese dentro dos EBs com a emergência de um progenitor mesodérmico primitivo com propriedades hematopoética e endotelial, que originava eritroblastos primitivos com fenótipo CD71/235a e expressavam globinas embrionárias e fetais. Posteriormente, surgiam células-tronco/progenitoras hematopoéticas com potencial de formação de BFU-E, CFU-E, CFU-GM e CFU-GEMM, expressando altos níveis dos genes SCL, GATA-1, GATA-2, CD34, CD31 e CDX4.

Todos estes estudos demonstraram relativa eficiência na produção de células hematopoéticas a partir da formação de EBs utilizando, basicamente, a mesma associação de citocinas e fatores de crescimento.

Em outros trabalhos, foi demonstrado que a introdução de BMP4 ao meio de diferenciação por curtos períodos (24 horas) durante a formação dos EBs é suficiente para induzir a formação do mesoderma, ao passo que a manutenção desse fator de crescimento por longos períodos resulta na formação de trofoblasto e endoderma extra-embrionário (Woll *et al.*, 2008). Ainda, a combinação de BMP4 com os fatores de crescimento VEGF, SCF e FGF-2, foi capaz de originar todas a linhagens hematopoéticas a partir de CTEhs nos estudos de Pick *et al.* (2007).

Outra via de sinalização que possui importantes funções na regulação da hematopoese é a Wnt. Alguns estudos evidenciaram a importância das proteínas Wnt na proliferação de CPHs, e no desenvolvimento dos linfócitos (Staal e Clevers, 2005; Naito *et al.*, 2006). Durante a diferenciação de CTEhs, a ativação da via Wnt induz o desenvolvimento de células bipotenciais $CD34^{bright}CD31^{+}Flk\text{-}1^{+}$, e a sua inibição culmina no prejuízo do desenvolvimento das células hematopoéticas (Woll *et al.*, 2008).

Além da diferenciação via EBs, inúmeros trabalhos na literatura demonstraram a capacidade das células estromais em suportar o desenvolvimento de progenitores hematopoéticos a partir de CTE murinas e humanas. Dentre as linhagens de células estromais mais utilizadas na diferenciação hematopoética destacam-se as células S17, C166, M210-B4 (Kaufman *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2005) e as células OP9 (Vodyanik *et al.*, 2005).

Kaufman *et al.* (2001) demonstraram que o cocultivo de CTEhs com ambas as linhagens de células estromais S17 e C166, durante 17 dias, em meio suplementado com SFB sem citocinas e sem fatores de crescimento hematopoéticos exógenos, é capaz de produzi células hematopoéticas que expressam o antígeno CD34. Porém, este estudo demonstrou baixa eficiência no protocolo de diferenciação com a obtenção de apenas 1-2% de células

positivas para CD34 e negativas para CD45. Aproximadamente 50% das células $CD34^+$ coexpressavam o antígeno CD31, e quando cultivadas em meio semi-sólido por 14 dias, essa população de células purificada foi capaz de produzir colônias mielóides, eritróides e megacariocíticas típicas.

Em sistemas de cocultivo, a linhagem de célula estromal mais utilizada e com maior eficiência na diferenciação hematopoética é a OP9 (Nakano *et al.,* 1994). Essa linhagem celular foi estabelecida a partir de camundongos *op/op* deficientes em fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), que possui efeitos nocivos durante o início do desenvolvimento das células hematopoéticas (Mukouyama *et al.,* 1998).

Alguns estudos demonstraram que hESCs em sistemas de cocultivo com células OP9 de em meio de diferenciação suplementado com citocinas específicas, as células embrionárias são capazes de se diferenciarem em células-tronco precursoras hematopoéticas $CD34^+$ com potencial de diferenciação multinhagem (Choi *et al.,* 2009b; Timmermans *et al.,* 2009).

Em um trabalho clássico, Vodyanik e colaboradores (2005) demonstraram que a linhagem de célula estromal murina OP9 induz mais eficientemente a diferenciação hematopoética quando comparadas às células S17 e C166 utilizadas nos estudos de Kaufman *et al.* (2001), alcançando uma porcentagem de 15-20% de células $CD34^+$.

Neste estudo, foi observado que as células $CD34^+$ surgem um dia após o aparecimento de células $CD31^+$, que ocorre por volta do 3° dia, sendo que o maior pico de população de células expressando ambos os antígenos de superfície (12-14% de células positivas) foi observado no 7° dia de cocultivo das CTEhs com as células OP9, momento no qual começaram a emergir células $CD45^+$. Neste ponto da diferenciação, 88,5% (± 3,5%) das células $CD34^+$ coexpressavam CD31, além dos marcadores CD90 (Thy-1), CD117 (c-kit), CD133 e CD164, mas não expressavam CD38. Ainda, o cocultivo de células $CD34^+$ isoladas com células estromais murinas MS-5 em meio de diferenciação suplementado com SFB, SCF, FLT3L, IL-7 e IL-3, diferenciaram-nas em células mielóides $CD45^+$, incluindo macrófagos, granulócitos, e em células linfóides B e NK (Vodyanik *et al.,* 2005).

Estudos posteriores realizados pelo mesmo grupo de pesquisa realizando a diferenciação hematopoética sobre células estromais OP9, revelaram a emergência de uma população hematopoética primitiva positiva para um novo marcador, o antígeno de superfície CD43 (Vodyanik *et al.,* 2006). Eles observaram que, segundo o modelo utilizado, células progenitoras $CD43^+$ podem ser identificadas durante o desenvolvimento hematopoético a

partir de CTEhs anteriormente à emergência do marcador CD45. Células $CD34^+CD43^+$ foram caracterizadas como progenitoras hematopoéticas, enquanto células com fenótipo $CD34^+CD43^-$ apresentaram potencial endotelial e mesenquimal. Neste estudo, foi relatado que células hematopoéticas adquirem gradual e sucessivamente a expressão dos antígenos CD34, CD43 e CD45, ao passo que perdem a expressão de marcadores endoteliais Ve-Caderina (CD144) e KDR (Flk-1 ou VEGF-R), e passam a expressar genes relacionados ao potencial linfohematopoético.

Durante a indução da diferenciação das CTEhs em células progenitoras hematopoéticas (CPHs) sobre *feeder* de células estromais murinas, as colônias de embrionárias perdem gradualmente suas características de células pluripotentes. O surgimento das células hematopoéticas está intimamente relacionado com estruturas semelhantes a vasos capilares, conhecidos como endotélio hemogênico (Goossens *et al.,* 2011), nos quais as células hematopoéticas evoluem a partir de células endoteliais-*like*. Adicionalmente, observa-se também a formação de estruturas chamadas de saco vitelino-*like* (Vodyanik *et al.,* 2005), que consistem em estruturas globosas e ocas, dentro das quais também ocorre o desenvolvimento das células hematopoéticas.

Com o auxílio da técnica de imunofluorescência com marcação *in situ* no nicho de diferenciação hematopoética, nós evidenciamos no nosso trabalho a localização das células hematopoéticas $CD45^+$ e os primórdios da produção de células $CD34^+$ e $CD31^+$. No início da diferenciação hematopoética, por volta do 15º dia, estruturas capilares-*like* constituídas por células que expressam o marcador CD34 surgem anteriormente ao aparecimento de células hematopoéticas $CD34^+$ e $CD45^+$. Posteriormente, por volta do 20º dia, as células CD34+ presentes nestas estruturas passam a expressar o marcador CD31, concomitante com o aparecimento das primeiras células arredondadas $CD34^+$, putativas células hematopoéticas.

Os sistemas de diferenciação das hCTEs representam um mecanismo alternativo que mimetiza o desenvolvimento embrionário inicial e permitem o desenvolvimento de células hematopoéticas para o estudo dos estágios mais primitivos da hematopoese, ainda muito pouco compreendida em humanos (Kennedy *et al.,* 2007).

Em murinos, as primeiras células hematopoéticas e vasculares surgem no mesoderma extra-embrionário do saco vitelínico no dia 7,5 de gestação. Uma vez formadas, estas células progenitoras iniciais organizam-se em ilhotas de sangue, que são constituídas por eritroblastos primitivos circundados por uma camada de células endoteliais (Fehling *et al.,* 2003;

Yokomizo *et al.,* 2007). A estreita associação entre essas duas linhagens nos leva à hipótese de que elas se originam de um precusor endotelial-hematopoético comum chamado hemangioblasto (Choi, 1998; Ribatti, 2008).

In vitro, o hemangioblasto tem sido descrito como a primeira população celular que apresenta a bipotencialidade de produzir progenitores hematopoéticos e endotelial em nível clonal. Os primeiros progenitores com propriedades de hemangioblasto derivados de células-tronco embrionárias têm sido identificados e denominados Células Formadoras de Colônias Blásticas (BL-CFCs), as quais expressam o receptor tirosina-quinase Flk1 (KDR) e o gene T de diferenciação mesodérmica. Essas células são capazes de gerar colônias blásticas imaturas que exibem potencial hematopoético e vascular quando cultivadas em metilcelulose (Kennedy *et al.,* 2007).

Lu *et al.* (2007) evidenciaram em estudos *in vitro* que hemangioblastos derivados de CTEhs possuem a capacidade de migrarem para áreas de injúria vascular para restaurar a função vascular. Ainda, a utilização de diferentes sistemas de cultivo em meio de diferenciação suplementado com os fatores de crescimento hematopoéticos TPO, VEGF, BMP4, SCF e FGF-2, aumentam a diferenciação dos hemangioblastos em células progenitoras hematopoéticas $CD34^{+}CD31^{+}$ (Srivastava *et al.,* 2007; Tian *et al.,* 2004; Chadwick *et al.,* 2003; Pick *et al.,* 2007).

Com relação à avaliação funcional das células hematopoéticas obtidas de CTEhs, os estudos *in vivo* das propriedades biológicas dessas células são realizados através de xenotransplantes. No entanto, questões relativas às diferenças fisiológicas e de xenocompatibilidade entre as células transplantadas e o organismo receptor ainda são muito pouco compreendidas (Chadwick *et al.,* 2003; Cerdan *et al.,* 2004; Vodyanik *et al.,* 2005).

O potencial de enxertamento das CTHs/CPHs obtidas de CTEhs em modelos murinos de reconstituição hematopoética é inferior a 1% na quase totalidade dos estudos publicados. Adicionalmente, alguns estudos demonstram que essas células não são detectáveis após a realização de transplantes secundários, refletindo o seu baixo potencial de auto-renovação (Wang *et al.,* 2005; Tian *et al.,* 2006; Ledran *et al.,* 2008). Estes estudos demonstram que os atuais métodos de diferenciação hematopoéticas ainda não são eficientes para a produção de CTEhs com grande capacidade funcional.

Isso pode ser explicado pelo fato de que os protocolos de diferenciação promovem uma espécie de “choque” nas CTEhs, que são estimuladas bruscamente à diferenciação

precoce e não passam por todas as etapas de maturação. As CTEhs acabam por não dispor de tempo para passar, de forma correta, por todos os eventos que levam à produção dos elementos necessários à sua atividade funcional, como receptores e moléculas específicas relacionadas a sua ancoragem ao microambiente hematopoético, auto-renovação e diferenciação.

As características imunofenotípicas das CTHs relacionadas à expressão de moléculas envolvidas no potencial de *homing* e *engraftment in vivo* tem sido arguido como um importante fator na biologia das CTHs geradas *in vitro* a partir da diferenciação de células pluripotentes. A caracterização imunofenotípica das CTHs obtidas de CTEhs é realizada principalmente por meio da detecção do antígeno de superfície CD34 (Strauss *et al.,* 1986; Civin *et al.,* 1987; Wang *et al.,* 2004; Wang *et al.,* 2005; Tian *et al.,* 2006; Ledran *et al.,* 2008).

Essa molécula foi descrita inicialmente como um dos principais marcadores de CTHs adultas, e desde então vem sendo aplicada na prática clínica para isolamento de CTHs para transplantes. No entanto, alguns estudos demonstraram que este marcador não é exclusivo de CTHs e que, na verdade, pode não representar uma população de CTHs com grande potencial funcional (Osawa *et al.,* 1996; Goodell *et al.,* 1996; Goodell *et al.,* 1997). Os resultados têm demonstrado que populações de células $CD34^+$ obtidas de CTEhs representam uma população de células muito primitivas que apresentam baixa capacidade de enxertamento *in vivo* (Wang *et al.,* 2005; Tian *et al.,* 2006; Ledran *et al.,* 2008).

No trabalho de Menendez *et al.* (2004), a análise detalhada de uma outra população de CTHs/CPHs caracterizadas como $CD45^{neg}PFV$ ($CD45^-PECAM\text{-}1^+Flk\text{-}1^+VE\text{-}caderina^+$) revelou que elas possuíam a habilidade de se diferenciarem nas linhagens hematopoética e endotelial. Todavia, quando transplantadas em camundongos NOD/SCID por via intravenosa, essas células não foram capazes de repovoar a medula óssea murina por mais de 6 semanas. Em contrapartida, quando injetadas via intra-femoral permitiram enxertia multilinhagem hematopoética detectável por até 10 semanas pós-transplante, mas com limitada capacidade proliferativa e de migração quando comparadas ao transplante de CTHs somáticas adultas isoladas da medula óssea e do sangue de cordão umbilical (Wang *et al.,* 2005).

Em outro estudo, foram injetadas células hematopoéticas e não-hematopoéticas obtidas da diferenciação das CTEhs sobre células estromais S17 também por ambas as vias de infusão. Foi observada enxertia das células transplantadas via intravenosa e intra-óssea por

um longo período, com a produção de células da linhagem mielóide, no entanto, em níveis muito baixos (Tian *et al.*, 2006). De maneira semelhante, utilizando CTEs de primatas diferenciadas em CPHs após seis dias em sistema de cocultivo com células estromais OP9, Sasaki *et al.* (2005) demonstraram que as CPHs eram capazes de promover um quimerismo hematopoético por longo período quando transplantadas *in útero* no fígado fetal de ovelhas. Entretanto, a porcentagem de enxertia também não foi eficiente, correspondendo a 1-2% do total de células.

Na tentativa de otimizar o potencial de *engraftment* das CPHs produzidas, tem sido empregado a tecnologia do DNA recombinante para a criação de células transgênicas superexpressando genes relacionados ao *homing* das CTHs. Em CPHs derivadas de CTEms, por exemplo, a superexpressão do gene HOXB4 demonstrou um significante aumento na habilidade de *engraftment* e reconstituição do sistema hematopoético (Kyba *et al.*, 2002). HOXB4, neste caso, parece exercer importante papel hematopoese, provendo preferencialmente a mielopoese (Chan *et al.*, 2008). Adicionalmente, quando HOXB4 é superexpresso juntamente com o gene Cdx4, otimiza o potencial de enxertia e a produção de multinhagens hematopoéticas, como observado nos estudos de Wang *et al.* (2005) após o transplante das células em camundongos letalmente irradiados.

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

Um estudo de Kennedy e colaboradores (2012) demonstrou que populações de CTHs maduras relativas à hematopoese definitiva e com grande potencial de enxertia apresentam fenótipo $CD45^{+}CD43^{+}CD34^{low/-}$, demonstrando a importância de marcadores como o CD45 e o CD43 para a atividade funcional das CTHs.

Neste trabalho, nós demonstramos que a diferenciação de CTEhs não diferenciada ($CD34^{-}/CD45^{-}/CD31^{-}$) por meio do nosso protocolo, é possível a obtenção de uma população celular $CD45^{+}CD43^{+}CD31^{+}CD34^{low}$. As características imunofenotípicas apresentadas pelas células-tronco/progenitoras hematopoéticas obtidas pelo método de diferenciação

desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa conduziu-nos a estudos subsequentes para a avaliação de suas propriedades funcionais *in vivo*.

Todavia, embora as células tenham apresentado tais características fenotípicas, os resultados obtidos pelos ensaios de reconstituição hematopoética pelo nosso grupo demonstraram que essas células possuem capacidade funcional de enxertamento semelhante à das células diferenciadas por outros grupos de pesquisa (Wang *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2006; Ledran *et al.*, 2008). Não identificamos quimerismo maior que 1,5% em todos os órgãos avaliados dentre os animais transplantados pela via retro-orbital.

Entretanto, alguns fatores podem ter contribuído para o baixo quimerismo pós-transplante. Em princípio, nós utilizamos uma mistura de células hematopoéticas obtidas do sobrenadante da diferenciação com células isoladas das colônias aos 24 dias de diferenciação, pois nossos estudos *in vitro* demonstraram que as colônias neste período da diferenciação apresentavam maior potencial de formação de colônias em metilcelulose e poderiam, em tese, ser também mais eficientes no enxertamento *in vivo*.

Apesar do elevado número de colônias identificadas nos ensaios *in vitro*, as colônias em diferenciação (D+24) são constituídas, majoritariamente, por células não-hematopoéticas, o que pode ter levado a uma quantidade bem menor de células hematopoéticas transplantadas comparadas ao *pool* de células isoladas de sangue de cordão umbilical, que eram em sua totalidade de células hematopoéticas. Essa variação na quantidade absoluta de células hematopoéticas transplantadas pode estar diretamente relacionada ao percentual de quimerismo identificado pelo nosso grupo de pesquisa.

Outro fator a ser considerado é a via de administração das células. O trabalho que demonstrou melhores resultados com relação ao percentual de células enxertadas pós-transplante, foi realizado por via intra-femoral. Esse maior sucesso no transplante por esta via é justificado pelo fato de que as células transplantadas são inseridas diretamente no nicho medular, o que facilita o seu enxertamento, uma vez que as células produzidas *in vitro* podem responder de maneira diferente das células somáticas aos estímulos fisiológicos que induzem o *homing* e *engraftment*. Ensaios adicionais de reconstituição hematopoética serão realizados pela via intra-femoral para investigar a influência da via de administração de células durante os transplantes.

Uma possível explicação para a ineficiência funcional das CTHs obtidas de CTEhs, é que o microambiente criado *in vitro* pelos atuais protocolos de diferenciação é

demasiadamente simplificado e não apresenta elementos essenciais que existem no nicho hematopoético medular, tais como hipóxia e tipos diversos de células estromais (osteoblastos, células endoteliais, células mesenquimais 146^+ e nestina$^+$, entre outros), que seriam responsáveis pela manutenção das CTHs (Shi e Gronthos, 2003; Kaigler *et al.*, 2005; Sugiyama *et al.*, 2006; Sacchetti *et al.*, 2007).

O interesse pelo nicho hematopoético teve grande impulso na última década como parte fundamental no entendimento da biologia das células-tronco e sua relação com o microambiente (Wilson e Trumpp, 2006; Adam *et al.*, 2007; Papayannopoulou e Scadden, 2008). Essa atual vertente no estudo da biologia das células-tronco emergiu de estudos que evidenciaram a participação do nicho na gênese de diversas doenças e demonstraram que a sua manipulação também é uma forma de manipular as próprias células-tronco (Adams e Scadden, 2006; Adams *et al.*, 2007; Papayannopoulou e Scadden, 2008; Raaijmakers e Scadden, 2008).

Até o presente momento, são escassos os relatos na literatura sobre a composição do nicho hematopoético artificial criado *in vitro* a partir da diferenciação de CTEhs e sobre a sua importância na obtenção de CTHs maduras e funcionais.

Nós investigamos a composição do microambiente hematopoético presente no sistema de diferenciação desenvolvido pelo nosso grupo. Nós evidenciamos que elementos que são constituintes conhecidos do nicho medular e que apresentam íntima relação com as CTHs, tais como células Nestina$^+$ e colágeno IV estão presentes dentro das colônias em diferenciação hematopoética. Em contrapartida, células CD146$^+$ não foram evidenciadas nos estudos de imunofluorescência.

Neste estudo, nós não conseguimos estabelecer uma correlação direta entre estes elementos estromais com as células hematopoéticas. A grande dificuldade reside na manutenção da integridade da diferenciação realizada sobre lamínulas mesmo após as excessivas lavagens para a execução da técnica de imunofluorescência. A maior parte dos experimentos realizados para esta finalidade foi perdida devido ao desprendimento das colônias das lamínulas ou pela desconfiguração do nicho artificial também devido ao desprendimento de partes da diferenciação. Para essa caracterização, nós tomamos cuidado para analisarmos apenas os materiais que permaneceram íntegros para não influenciar na observação e interpretação dos resultados.

Em suma, fica evidente que os protocolos de diferenciação são capazes de gerar CTHs/CPHs com características ainda muito primitivas e com baixa capacidade funcional de reconstituição hematopoética *in vivo*. A produção de CTHs maduras a partir de CTEhs com grande potencial funcional *in vivo* ocorrerá somente em sistemas de diferenciação que promovam o desenvolvimento de elementos estromais importantes para a interação CTH-nicho. A compreensão da interação das CTHs com os elementos do nicho hematopoético poderá levar ao entendimento dos mecanismos que determinam a hematopoese definitiva e, assim, aumentar o potencial de enxertamento das CTHs obtidas de CTEhs, que poderão ser utilizadas futuramente no tratamento de doenças hematológicas.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que o sistema de diferenciação desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa permite o desenvolvimento de populações de CTPHs com características imunofenotípicas descritas na literatura como peculiares de CTHs maduras que possuem potencial clonogênico *in vitro* semelhante às células mononucleares isoladas do sangue de cordão umbilical e apresenta elementos representativos do nicho hematopoético medular. Porém, essas células apresentam limitado potencial de reconstituição hematopoética *in vivo* quando transplantadas via retroorbital em camundongos NSG. Não obstante, estudos adicionais sobre a via de administração e a dose de células são necessários para alcançarmos conclusões mais apuradas.

O protocolo de diferenciação apresenta grande reprodutibilidade e consistência na obtenção de CTHs/CPHs positivas para os marcadores CD45, CD43, CD31 e CD34 mesmo com o uso de diferentes cepas de MEFs como células alimentadoras e diferentes linhagens de células embrionárias. Além de ser possível a obtenção de todas as células das linhagens eritroide e mielóide em diferentes estágios de maturação.

Ainda, nós evidenciamos a localização *in situ* das células hematopoéticas $CD45^+$ nas estruturas de diferenciação, e os primórdios do surgimento de células $CD34^+$ e $CD31^+$, produzidas a partir de estruturas capilares-*like* constituídas por células que expressam inicialmente o marcador CD34, e que passam a coexpressar o marcador CD31 posteriormente, concomitante com o aparecimento das primeiras células arredondadas $CD34^+$, putativas primeiras células hematopoéticas diferenciadas a partir de CTEhs.

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abkowitz, J. L., A. E. Robinson, *et al.* Mobilization of hematopoietic stem cells during homeostasis and after cytokine exposure. Blood, v.102, n.4, Aug 15, p.1249-53. 2003.

Adams, G. B., R. P. Martin, *et al.* Therapeutic targeting of a stem cell niche. Nat Biotechnol, v.25, n.2, Feb, p.238-43. 2007.

Adams, G. B. e D. T. Scadden. The hematopoietic stem cell in its place. Nat Immunol, v.7, n.4, Apr, p.333-7. 2006.

Alberts, B., A., Johnson, *et al.* Molecular Biology of the Cell. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.

Amabile, G., R. S. Welner, *et al. In vivo* generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. Blood., v.121, n.8, Feb 21, p.1255-64, 2013.

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

Andrade J, Ge S, Symbatyan G, Rosol MS, Olch AJ, Crooks GM. Effects of sublethal irradiation on patterns of engraftment after murine bone marrow transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. May;17(5):608-19, 2011.

André MC, Erbacher A, Gille C, Schmauke V, Goecke B, Hohberger A, Mang P, Wilhelm A, Mueller I, Herr W, Lang P, Handgretinger R, Hartwig UF. Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2R gamma(null) mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells. J Immunol. Sep 1;185(5):2710-20, 2010

Antas VI, Al-Drees MA, Prudence AJ, Sugiyama D, Fraser ST. Hemogenic endothelium: a vessel for blood production. Int J Biochem Cell Biol. 45(3):692-5, 2013.

Arai, F., A. Hirao, *et al.* Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell, v.118, n.2, Jul 23, p.149-61. 2004.

Bianco, P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. Blood, v.117, n.20, May 19, p.5281-8. 2011.

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

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

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

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

Carlesso N, Cardoso AA. Stem cell regulatory niches and their role in normal and malignant hematopoiesis. Curr Opin Hematol. Jul;17(4):281-6, 2010.

Calvi, L. M., G. B. Adams, *et al.* Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. Nature, v.425, n.6960, Oct 23, p.841-6. 2003.

Cardier, J. E. e E. Barbera-Guillem. Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. Hepatology, v.26, n.1, Jul, p.165-75. 1997.

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

Chadwick, K., L. Wang, *et al.* Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Blood 102(3): 906-15, 2003.

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

Chen, Y., R. Jacamo, *et al.* Human extramedullary bone marrow in mice: a novel in vivo model of genetically controlled hematopoietic microenvironment. Blood, v.119, n.21, Apr 5, p.4971-80, 2012.

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

Choi, KD; Vodyanik, MA; Slukvin, II. Generation of mature human myelomonocytic cells through expansion and differentiation of pluripotent stem cell-derived lin-CD34+CD43+CD45+ progenitors. J. Clin. Invest. September; 119(9):2818-29, 2009a.

Choi, KD; Yu, J; Smuga-Otto, K; Salvagiotto, G; Rehrauer, W; Vodyanik, M *et al*. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. Stem Cells. January 8; 27:559-67, 2009b.

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

Coskun, S. and Hirschi, K.K. Establishment and regulation of the HSC niche: Roles of osteoblastic and vascular compartments. Birth Defects Res. C Embryo Today. 90: 229–242, 2010.

Costa, E.B.O. Caracterização das células-tronco/progenitoras hematopoéticas de células-tronco embrionárias humanas in vitro em sistema de cocultivo com fibroblastos de embriões murinos. *Dissertação de Mestrado*:1-138, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2012.

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

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

Davis, S., T. H. Aldrich, *et al.* Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. Cell, v.87, n.7, Dec 27, p.1161-9, 1996.

De Bruyn, P. P., P. C. Breen, *et al.* The microcirculation of the bone marrow. Anat Rec, v.168, n.1, Sep, p.5568, 1970.

Dexter TM, Lajtha LT. Proliferation of haematopoietic stem cells *in vitro*. British Journal of Haematology. 28: 525-30, 1974.

Dexter TM, Allen TD, Lajtha LT. Conditions controlling the proliferation of haematopoietic stem cells *in vitro*. J. Cell Physiol. 91: 335-44, 1977.

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

Driessen, R. L., H. M. Johnston, *et al.* Membrane-bound stem cell factor is a key regulator in the initial lodgment of stem cells within the endosteal marrow region. Exp Hematol, v.31, n.12, Dec, p.128491, 2003.

Ehninger, A. e Trumpp, A. The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in. JEM, vol. 208(3): 421-428, 2011.

Evans, M. J. & Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature. 292, 154–156, 1981.

Fehling, HJ; Lacaud, G; Kubo, A; Kennedy, M; Robertson, S; Keller, G; Kouskoff, V. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. Development. Sep; 130(17):4217-27, 2003.

Fliedner, T. M. The role of blood stem cells in hematopoietic cell renewal. Stem Cells, v.16, n.6, p.361-74, 1998.

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

Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhyan, *et al.* Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. Transplantation, v.17, n.4, Apr, p.331-40, 1974.

Gatti, R. A., H. D., Allen, *et al.* Immunological reconstitution of sex-linked lymphopenic immunological deficiency. Lancet, 77: 1366, 1968.

Goldman JM, Catovsky D & Hows J *et al.*. Cryopreserved peripheral blood cells functioning as autografts in patients with chronic granulocytic leukaemia in transformation. BMJ 1: 1310−1313, 1979.

Goodell, M. A., K., Brose, *et al.* Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. J Exp Med, v.183, n.4, Apr 1, p.1797-806, 1996.

Goodell, M. A., M., Rosenzweig, *et al.* Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. Nat Med, v.3, n.12, Dec, p.1337-45, 1997.

Goodman JW e Hodgson GS. Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. Blood 19: 702−714, 1962.

Goossens S, Janzen V, Bartunkova S, Yokomizo T, Drogat B, Crisan M, Haigh K, Seuntjens E, Umans L, Riedt T, Bogaert P, Haenebalcke L, Berx G, Dzierzak E, Huylebroeck D, Haigh JJ. The EMT regulator Zeb2/Sip1 is essential for murine embryonic hematopoietic stem/progenitor cell differentiation and mobilization. Blood. 117(21): 5620-30, 2011.

Gluckman E, Broxmeyer H.A, Auerbach A.D, Friedman H.S, Douglas G.W, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N Engl J Med. 321:1174–1178, 1989.

Green H, Easley K, Iuchi, S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 100:15625–15630, 2003.

Guerrouahen, B. S, Al-hijji, I, & Tabrizi, A. R. Osteoblastic and vascular endothelial niches, their control on normal hematopoietic stem cells, and their consequences on the development of leukemia. Stem Cells Int., 2011.

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

Hirschi, k. k. Hemogenic endothelium during development and beyond. Blood. May 24; 119(21): 4823–4827, 2012.

Johnson, G. R. e M. A. Moore. Role of stem cell migration in initiation of mouse foetal liver haemopoiesis. Nature, v.258, n.5537, Dec 25, p.726-8, 1975.

Kaigler, D., P. H. Krebsbach, *et al.* Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential. FASEB J, v.19, n.6, Apr, p.665-7, 2005.

Kaufman, D. S. Toward clinical therapies using hematopoietic cells derived from human pluripotent stem cells. Blood, v.114, n.17, Oct 22, p.3513-23, 2009.

Kaufman, D. S., E. T. Hanson, *et al.* Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.19, Sep 11, p.10716-21, 2001.

Kaufman, D. S. e J. A. Thomson. Human ES cells--haematopoiesis and transplantation strategies. J Anat, v.200, n.3, Mar, p.243-8, 2002.

Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Invest 108:407– 414, 2001.

Kennedy, M., S. L. D'souza, *et al.* Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. Blood, v.109, n.7, Apr 1, p.2679-87. 2007.

Kennedy M, Awong G, Sturgeon CM, Ditadi A, LaMotte-Mohs R, Zúñiga-Pflücker JC, Keller G. T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. Cell Rep. Dec 27;2(6):1722-35, 2012.

Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors. Cell. 109: 29–37, 2002.

Kiel, M. J., O. H. Yilmaz, *et al.* SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell, v.121, n.7, Jul 1, p.1109-21, 2005.

Kim DK, Fujiki Y, Fukushima T, Ema H, Shibuya A, Nakauchi H. Comparison of hematopoietic activities of human bone marrow and umbilical cord blood CD34 positive and negative cells. Stem Cells. 17(5):286-94, 1999.

Kortesidis, A., A. Zannettino, *et al.* Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. Blood, v.105, n.10, May 15, p.3793-801, 2005.

Kunisaki, Y. e P. S. Frenette. The secrets of the bone marrow niche: Enigmatic niche brings challenge for HSC expansion. Nat Med, v.18, n.6, Jun, p.864-5, 2012.

Lapidot, T., A. Dar, *et al.* How do stem cells find their way home? Blood, v.106, n.6, Sep 15, p.1901-10, 2005.

Ledran, M. H., A., Krassowska, *et al.* Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. Cell Stem Cell, Jul 3; 3(1):85-98, 2008.

Levenberg S, Golub JS, Amit M, ItskovitzEldor J, Langer R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 99: 4391– 4396, 2002.

Lo Celso C, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J *et al.* Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. Nature. 457: 92–96, 2009.

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

Lu, S. J., Q. Feng, *et al.* Recombinant HoxB4 fusion proteins enhance hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. Stem Cells Dev, v.16, n.4, Aug, p.547-59, 2007.

McCredie KB, Hersh EM & Freireich EJ. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. Science. 171: 292−294, 1971.

McDermott SP, Eppert K, Lechman ER, Doedens M, Dick JE. Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. Blood. Jul 15;116(2):193-200, 2010.

Melichar, H., Li, O., Ross, J., Haber, H., Cado, D., Nolla, H., Robey, E.A., Winoto, A. Comparative study of hematopoietic differentiation between human embryonic stem cell lines. PLoS One. 6(5):e19854, 2011.

Mendez-Ferrer, S., T. V. Michurina, *et al.* Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature, v.466, n.7308, Aug 12, p.829-34, 2010.

Menendez, P., L. Wang, L. Li, K. Chadwick, and M. Bhatia. Retroviral transduction of hematopoietic cells derived from human embryonic stem cell-derived CD45negPFV hemogenic precursors. Mol. Ther. 10:1109–1120, 2004.

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

Munoz J, Shah N, Rezvani K, Hosing C, Bollard CM, Oran B, Olson A, Popat U, Molldrem J, McNiece IK, Shpall EJ. Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future. Stem Cells Transl Med. Dec;3(12):1435-43, 2014.

Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 103:19812–19817, 2006.

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

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

Noll, J. E, Williams, S. A, Purton, L. E, & Zannettino, A. C. Tug of war in the haematopoietic stem cell niche: do myeloma plasma cells compete for the HSC niche? Blood Cancer J. e91, 2012.

Nur-E-Kamal A, Ahmed I, *et al.* Three-dimensional nanofibrillar surfaces promote self-renewal in mouse embryonic stem cells. Stem Cells. 24(2):426-33, 2006.

Oberlin, E., Tavian, M., Blazsek, I., Péault, B. Blood-forming potential of vascular endothelium in the human embryo. Development. Sep;129(17):4147-57, 2002.

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

Panepucci, R. A.; Calado, R. T. ; Rocha, V. ; Proto-Siqueira, R. ; Silva, W. A. ; Zago, M. A. . Higher Expression of Transcription Targets and Components of the Nuclear Factor- B Pathway Is a Distinctive Feature of Umbilical Cord Blood CD34+ Precursors. Stem Cells (Dayton), 14, v. 25, n.1, p. 189-196, 2007.

Papayannopoulou, T. e D. T. Scadden. Stem-cell ecology and stem cells in motion. Blood, v.111, n.8, Apr 15, p.3923-30, 2008.

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

Peled, A., V. Grabovsky, *et al.* The chemokine SDF-1 stimulates integrin-mediated arrest of CD34(+) cells on vascular endothelium under shear flow. J Clin Invest, v.104, n.9, Nov, p.1199-211, 1999.

Pick M, Azzola L, Mossman A, Stanley EG, et al. Differentiation of human embryonic stem cells in serum free medium reveals distinct roles for BMP-4, VEGF, SCF and FGF2 in hematopoiesis. Stem Cells. 25(9):2206, 2007.

Postovit LM, Seftor EA, *et al.* A three-dimensional model to study the epigenetic effects induced by the microenvironment of human embryonic stem cells. Stem Cells. 24(3):501-5, 2006.

Raaijmakers, M. H. e D. T. Scadden. Evolving concepts on the microenvironmental niche for hematopoietic stem cells. Curr Opin Hematol, v.15, n.4, Jul, p.301-6, 2008.

Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. 2Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. Cell Transplant. 12:1–11, 2003.

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

Ribatti, D. Hemangioblast does exist. Leuk Res. 32(6):850-4, 2008.

Richman CM, Weiner RS & Yankee RA. Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man. Blood. 47: 1031−1039, 1976.

Sacchetti, B., A. Funari, *et al.* Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. Cell, v.131, n.2, Oct 19, p.324-36, 2007.

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

Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. Blood Cells, v.4, n.1-2, p.7-25, 1978.

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

Sharma, M. B., Limaye, L. S., Kale, V. P.. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. Haematologica, 97: 651–660, 2012.

Shi, S. e S. Gronthos. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. J Bone Miner Res, v.18, n.4, Apr, p.696-704, 2003.

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

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

Sipkins DA, Wei X, Wu JW, Runnels JM, Cote D, Means TK et al. In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. Nature. 435: 969–973, 2005

Socinksi MA, Cannistra SA & Elias A *et al.*. Granulocyte-macrophage colony stimulating factor expands the circulating haemopoietic progenitor cell compartment in man. Lancet. 1: 1194−1198, 1988.

Sottile V, Thomson A, McWhir J. In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. Cloning Stem Cells. 5:149 –155, 2003.

Spradling, A., D. Drummond-Barbosa, *et al.* Stem cells find their niche. Nature, v.414, n.6859, Nov 1, p.98104, 2001.

Staal FJ, Clevers HC. Wnt signalling and haematopoiesis: A Wnt-Wnt situation. Nat Rev Immunol. 5:21–30, 2005.

Stier, S., Y. Ko, *et al.* Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. J Exp Med, v.201, n.11, Jun 6, p.1781-9, 2005.

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

Sturgeon, C. M., A., Ditadi *et al.* Defining the path to hematopoietic stem cells. Nat Biotechnol., v.31, n.5, May, p.416-8, 2013.

Sugiyama, T., H. Kohara, *et al.* Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. Immunity, v.25, n.6, Dec, p.977-88, 2006.

Taichman, R. S., M. J. Reilly, *et al.* The Hematopoietic Microenvironment: Osteoblasts and The Hematopoietic Microenvironment. Hematology, v.4, n.5, p.421-426, 2000.

Tavassoli, M. e W. H. Crosby. Transplantation of marrow to extramedullary sites. Science, v.161, n.3836, Jul 5, p.54-6, 1968.

Tavian, M., C. Robin, *et al.* The human embryo, but not its yolk sac, generates lympho-myeloid stem cells: mapping multipotent hematopoietic cell fate in intraembryonic mesoderm. Immunity 15(3): 48795, 2001.

Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. Semin Hematol. 36 (Suppl 7): 95−103, 1999.

Thomas ED, Lochte HL, Jr, Lu WC e Ferrebee JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. N Engl J Med. 257: 491−496, 1957.

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

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

Till, J.E.; McCulloch, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiation Research 14 (2): 213–22, 1961.

Timmermans, F; Velghe, I; Vanwalleghem, L; Smedt, M; Coppernolle, SY; Taghon, T *et al.* Generation of T Cells from Human Embryonic Stem Cell-Derived Hematopoietic Zones. J. Immunol., 182: 6879–88, 2009.

van Rood, J.J. e Oudshoorn, M. Eleven million donors in Bone Marrow Donors Worldwide! Time for reassessment?, Bone Marrow Transplantation 41, 1-9, 2008.

Visnjic, D., Z. Kalajzic, *et al.* Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. Blood, v.103, n.9, May 1, p.3258-64, 2004.

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

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

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

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

Wang, X., H. Hisha, *et al.* Characterization of mesenchymal stem cells isolated from mouse fetal bone marrow. Stem Cells, v.24, n.3, Mar, p.482-93, 2006.

Watt, F. M. e B. L. Hogan. Out of Eden: stem cells and their niches. Science, v.287, n.5457, Feb 25, p.142730, 2000.

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

Wilson, A. e A. Trumpp. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol, v.6, n.2, Feb, p.93-106, 2006.

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

Yamazaki, S., H. Ema, *et al.* Nonmyelinating Schwann cells maintain hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche. Cell, v.147, n.5, Nov 23, p.1146-58, 2012.

Yokomizo, T; Takahashi, S; Mochizuki, N; Kuroha, T; Ema, M; Wakamatsu, A; Shimizu, R; Ohneda, O; Osato, M; Okada, H; Komori, T; Ogawa, M; Nishikawa, S; Ito, Y; Yamamoto, M. Characterization of GATA-1(+) hemangioblastic cells in the mouse embryo. Embo J. 26(1):184-96, 2007.

Yin, T. e L. Li. The stem cell niches in bone. J Clin Invest, v.116, n.5, May, p.1195-201, 2006.

Zago, M. A. e Covas, D. T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo: Atheneu, 2006.

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

Zhan X, Dravid G, Ye Z *et al.* Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells in vitro. Lancet. 364:163–171, 2004.

Zhang, J., C. Niu, *et al.* Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature, v.425, n.6960, Oct 23, p.836-41, 2003.

Zhang, P; Li, J; Tan, Z; Wang, C; Liu, T; Chen, L; Yong, J; Jiang, W; Sun, X; Du, L; Ding, M; Deng, H. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. Blood, Nov; 111:1933-1941, 2008.

ANEXOS

ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS

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

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 24 de setembro de 2015

Ofício nº 3415/2015
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"ESTUDO DO NICHO HEMATOPOÉTICO E DAS PROPRIEDADES FUNCIONAIS DAS CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS OBTIDAS DE CÉLULAS-TRONCO EMBRIONÁRIAS HUMANAS",** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 415ª Reunião Ordinária realizada em 21/09/2015 e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** de acordo com o Processo HCRP nº 6669/2015.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

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

Atenciosamente,

Marcia Villanova

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

Ilustríssimos Senhores
EVERTON DE BRITO OLIVEIRA COSTA
PROF.DR. DIMAS TADEU COVAS(Orientador)
Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16)3602-2228/cep@hcrp.usp.br
www.hcrp.usp.br

ANEXO II – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA MATER

mater

CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE
DA MULHER DE RIBEIRÃO PRETO

COMISSÃO DE PESQUISA DO CENTRO DE REFERÊNCIA DA SAÚDE DA MULHER DE RIBEIRÃO PRETO - MATER

Ref.: Projeto de Pesquisa: Estudo do nicho hematopoético e das propriedades funcionais das células-tronco hematopoéticas obtidas de células-tronco embrionárias humanas.

Nº 004/2015

Everton de Brito Oliveira Costa

Prezado Pesquisador (a)

Informamos que o seu projeto foi avaliado pela Comissão de Pesquisa Clinica do CRSM-Mater no dia 21/08/2015 e considerado **aprovado** para realização nessa instituição.

Lembramos que essa aprovação pressupõe o cumprimento das seguintes necessidades:

1- Apresentação do parecer do CEP antes do início da abordagem de potenciais sujeitos para o estudo
2- Apresentação de relatórios parciais (Anexo 3), semestralmente, indicando o andamento da pesquisa.
3- Apresentação de relatório final de pesquisa (Anexo 3) que deverá ser acompanhado de um resumo estruturado da mesma (uma lauda, contendo introdução, métodos, resultados e conclusões) para a documentação do projeto de pesquisa junto ao CRSM-Mater
4- Todos os procedimentos relacionados ao projeto de pesquisa que não estejam dentro da rotina do serviço deverão ser realizados pela equipe do projeto, não se utilizando de funcionários da instituição.

Atenciosamente,

DRª. ANA MÁRCIA SPANÓ NAKANO

Presidente da Comissão de Pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher

Av. Wanderley Taffo, nº 330 – Quintino Facci II - CEP 14070-250 – Ribeirão Preto – SP
Fone: (16) 3962-8200 - Fax: (16) 3962-8213

ANEXO III – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação **nº 148/2015**, sobre o projeto intitulado *"Células Hematopoéticas Derivadas De Células Embrionárias Humanas Na Recuperação Da Linhagem Medular Em Camundongos"*, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Dimas Tadeu Covas** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 29 de fevereiro de 2016.

We certify that the protocol ***nº* 148/2015,** entitled ***"Hematopoietic Cells Derived From Human Embryonic Cells In Recovery Of Bone Marrow In Mice"***, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *02/29/2016.*

Ribeirão Preto, 29 de fevereiro de 2016.

Prof. Dr. Fernando Silva Carneiro
Vice-Presidente, em exercício, da
CEUA – FMRP – USP

ANEXO IV – APROVAÇÃO CTNBio

Fundação
Hemocentro RP

Ribeirão Preto, 28 de abril de 2015.

O projeto de pesquisa intitulado "Estudo do nicho hematopoético e das propriedades funcionais das células-tronco hematopoéticas obtidas de células-tronco embrionárias humanas", em nome de Everton de Brito Oliveira Costa, orientada pelo Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, foi avaliado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2015.003-01**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório final da pesquisa.

Simone Kashima Haddad
Presidente da CIBio
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

ANEXO V – TESTE PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMA OUTUBRO/2014

	CENTRO REGIONAL DE HEMOTERAPIA DO HCFMRP - USP	
	BIOLOGIA MOLECULAR	
	RESULTADO DE ANÁLISE DE *MYCOPLASMA* SPP.	P.: 01/01

Solicitante: Laboratório de Biologia Celular

Exame solicitado: Detecção de *Mycoplasma* spp. no produto enviado.

Executante: Laboratório de Biologia Molecular – Hemocentro RP

ID Bio. Mol.	Nome da Célula	Responsável	Data da Coleta	Razão: B/A	Resultado
155	HESC H1 P35	Everton	15/10/2014	0,41	Negativo
156	HESC H9 Feeder Free P32	Everton	15/10/2014	0,53	Negativo
157	HESC HUES 3 P33	Everton	15/10/2014	0,53	Negativo

Método Utilizado: Teste comercial *MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit* – Lonza (Quimioluminescência).

Valores de Referência (Razão B/A): < 0,9: Negativo
0,9 – 1,2: Inconclusivo (quarentena da célula e nova coleta em 48h para re-teste)
> 1,2: Positivo

Data de Emissão do Laudo: 20/10/14

Aline Cicarina Romagnoli
Executor Responsável
Aline C. Romagnoli
Assistente de Laboratório
CRBM 13672

Data de Retirada do Laudo: 27/01/15

Everton de Brito Oliveira Costa
Responsável pela Retirada do Laudo

ANEXO VI – TESTE PARA DETECÇÃO DE MICOPLASMA NOVEMBRO/2014

	CENTRO REGIONAL DE HEMOTERAPIA DO HCFMRP - USP	
	BIOLOGIA MOLECULAR	
	RESULTADO DE ANÁLISE DE *MYCOPLASMA* SPP.	P.: 01/01

Solicitante: Laboratório de Biologia Celular

Exame solicitado: Detecção de *Mycoplasma* spp. no produto enviado.

Executante: Laboratório de Biologia Molecular – Hemocentro RP

ID Bio. Mol.	Nome da Célula	Responsável	Data da Coleta	Razão: B/A	Resultado
197	H9 Feeder Free Cultivada P36	Everton	18/11/2014	0,42	Negativo
198	H1	Everton	18/11/2014	0,34	Negativo

Método Utilizado: Teste comercial *MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kit* – Lonza (Quimioluminescência).

Valores de Referência (Razão B/A): < 0,9: Negativo
0,9 – 1,2: Inconclusivo (quarentena da célula e nova coleta em 48h para re-teste)
> 1,2: Positivo

Data de Emissão do Laudo: 27/11/14

Aline Cristina Romagnoli
Executor Responsável
Aline C. Romagnoli
Assistente de Laboratório
CRBM 13672

Data de Retirada do Laudo: 27/01/15

Everton de Brito Oliveira Costa
Responsável pela Retirada do Laudo

ANEXO VII – RESULTADOS DE IMUNOFENOTIPAGEM DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS COM SUPLEMENTAÇÃO COM CITOCINAS

EXPERIMENTOS SOBRE MEF COM CITOCINAS																				
	SOBRENADANTE																COLÔNIAS			
	D+19			D+24						D+31							D+19	D+24		
	Exp1	Exp4	Média	Exp1	Exp6	Exp7	Exp8	Exp9	Média	Exp1	Exp4	Exp5	Exp8	Exp9	Exp10	Média	Exp 1	Exp1	Exp6	Média
CD45	66%	39%	**52,50%**	65%	47%	53%	85%	93%	**68,6%**	92%	93%	64%	92%	91%	78%	**85%**	4%	14%	58%	**36%**
CD43		22%	**22%**	32%	39%	31%	52%	91%	**49,0%**	87%	91%	63%	90%	88%	94%	**85,50%**	4%	7%	42%	**24,50%**
CD31		68%	**68%**	20%		70%	88%	93%	**67,8%**	80%	91%	70%	91%	91%	95%	**86,30%**	3%	4%	58%	**21,70%**
CD34	6%	2%	**4%**	6%		12%	5%	8%	**7,8%**	3%	5%	3%	2%	5%	3%	**3,50%**	2%	7%	4%	**5,50%**
CD71	30%	40%	**35%**	56%		48%	35%	82%	**55,2%**	77%	74%	79%	85%	84%	78%	**80%**	27%	13%		**13%**
235a	10%	4%	**7%**	20%		6%			**13,0%**	9%	6%	9%	3%	2%	5%	**5,70%**	5%	24%		**24%**
CXCR4		11%	**11%**	5%		12%	5%	7%	**7,2%**				25%	11%		**18%**		13%		**13%**
CD117				0%		3%		0%	**1,0%**	5%			11%	2%		**6%**		1%		**1%**
AC133				8%		12%	1%	7%	**7,0%**	7%			8%	3%		**6%**	9%	24%	18%	**21%**
KDR				2%			3%	7%	**4,0%**	5%			3%	4%		**4%**	9%	12%	18%	**15%**
CD11b					69%		43%	92%	**68,0%**	76%			86%	84%		**80,50%**			58%	**58%**
CD38		18%	**18%**	32%		14%	0%	16%	**15,5%**	53%			30%	26%	5%	**28,50%**		13%		**13%**
CD14				18%	34%					17%								13%		**13%**
CD15				5%			13%	20%	**16,5%**	49%			25%	24%		**32,70%**		3%		**3%**
CD16				6%			9%	10%	**9,5%**	29%			15%	17%		**20,30%**		2%		**2%**
CD19				0%						3%			3%	3%		**3%**		1%		**1%**
CD20				0%						2%			3%	3%		**2,70%**		2%		**2%**
CD3				3%	0%		4%	5%	**4,5%**	0%			12%	3%		**5,00%**		2%		**2%**
CD4				3%	0%		35%	24%	**29,5%**	0%			21%	20%		**13,70%**		2%		**2%**
CD8				1%	0%		5%	9%	**6,3%**	3%			24%	7%		**11,30%**		2%		**2%**
CD42b				1%			5%	1%	**3,0%**				1%	0%		**0,50%**		0%		**0%**
CD61				1%			3%	0%	**1,5%**				3%	0%		**1,50%**		3%		**3%**

Exp = Experimento.

ANEXO VIII – RESULTADOS DE IMUNOFENOTIPAGEM DOS EXPERIMENTOS REALIZADOS SEM SUPLEMENTAÇÃO COM CITOCINAS

EXPERIMENTOS SOBRE MEF SEM CITOCINAS									
SOBRENADANTE								COLÔNIA	
	D+16		D+24			D+31		D+16	
	Exp4		Exp1	Exp2	Média	Exp11		Exp 4	
CD45	33%		34%	36%	35%	61%		5%	
CD43	2%		2%		2%	2%		3%	
CD31	18%		20%		20%	54%		7%	
CD34			2%		2%	2%		10%	
CD71			0%		0%	30%			
235a			0%		0%	1%			
CXCR4			30%	29%	29%	43%			
CD117			20%		20%	1%			
AC133	2%		0%		0%	0%		15%	
KDR	1%		0%		0%			8%	
CD11b			0%		0%	53%			
CD38			0%		0%	1%			
CD14			0%		0%				
CD15			0%		0%				
CD16			0%		0%				
CD19			0%		0%	0%			
CD20			0%		0%	1%			
CD3			27%		27%	0%			
CD4			32%		32%	0%			
CD8			0%		0%	0%			
CD42b			0%		0%	0%			
CD61			0%		0%	2%			

Exp = Experimento.

ANEXO IX – AUTORIZAÇÃO PARA USO DA FIGURA 1

AUTHORIZATION

I authorize through this document the reproduction of the Figure 3 published in the article "Wilson, A. and A. Trumpp. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol, v.6, n.2, Feb, p.93-106, 2006" by EVERTON DE BRITO OLIVEIRA COSTA, PhD student from Medical School of University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, in his PhD thesis.

Prof. Dr. Andreas Trumpp
Head of Division of Stem Cells and Cancer, A010
German Cancer Research Center (DKFZ)
Im Neuenheimer Feld 280
D-69120 Heidelberg

Prof. Dr. Andreas Trumpp

Division for Stem Cells and Cancer

German Cancer Research Center (DKFZ)

ANEXO X – AUTORIZAÇÃO PARA USO DA FIGURA 2

AUTHORIZATION

I authorize through this document the reproduction of the Figure 2 published in the article "Yin, T. and L. Li. The stem cell niches in bone. J Clin Invest, v.116, n.5, May, p.1195-201, 2006" by EVERTON DE BRITO OLIVEIRA COSTA, PhD student from Medical School of University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, in his PhD thesis.

Linheng Li, PhD

Investigator, Stowers Institute for Medical Research

Professor of Pathology and Laboratory Medicine

The University of Kansas