**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular**

Lucas Ferioli Catelli

**GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS
(hiPSCs) A PARTIR DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE INDIVÍDUOS
COM FENÓTIPO DE INTERESSE PARA TRANSFUSÕES
SANGUÍNEAS**

**Ribeirão Preto
2016**

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular**

**GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS
(hiPSCs) A PARTIR DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE INDIVÍDUOS
COM FENÓTIPO DE INTERESSE PARA TRANSFUSÕES
SANGUÍNEAS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco
e Terapia Celular para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Células-Tronco e Terapia
Celular

Orientado: Lucas Ferioli Catelli

Orientadora: Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

**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).**

**Ribeirão Preto
2016**

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

Catelli, Lucas Ferioli

Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSCs) a partir de células somáticas de indivíduos com fenótipo de interesse para transfusões sanguíneas. Ribeirão Preto 2016.

85p. : il. ; 30 cm.

Dissertação de mestrado, apresentada à faculdade de medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Células-Tronco e Terapia Celular.

Orientadora: Kashima, Simone

1. hiPSCs.
2. Diferenciação hematopoética.
3. Imunohematologia.
4. Antígenos eritrocitários

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Lucas Ferioli Catelli

Título do trabalho: Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSCs) a partir de células somáticas de indivíduos com fenótipo de interesse para transfusões sanguíneas

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Células-Tronco e Terapia Celular

Orientadora: Simone Kashima Haddad

Aprovado em: 28 de novembro de 2016

Banca examinadora

Profa. Dra.: Simone Kashima Haddad

Instituição: FUNDHERP

Assinatura: _____

Prof. Dr.: Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues

Instituição: FMRP – USP

Assinatura: _____

Profa. Dra.: Lilian Maria de Castilho

Instituição: UNICAMP

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Obrigado família! Principalmente vocês, Pai e mãe, que sempre acreditaram em mim, me apoiaram em tudo que tive vontade de fazer, se fizeram sempre presentes e dispostos a me fazer crescer. São para mim as pessoas mais sábias que existem, mais amorosas e pacientes. À minha irmã, Luisa, também agradeço pelo apoio e carinho. Amo muito vocês!

Aos meus melhores amigos, que sempre considerei meus irmãos: Troni, Reco e Diogo. Agradeço a vocês pelo companheirismo e amizade!

Quanto ao meu desenvolvimento acadêmico e profissional, devo muito a todos no Hemocentro de Ribeirão Preto. Agradeço especialmente à Profa. Kelen por abrir as portas para mim nesta instituição, e à minha orientadora, Profa. Simone. Eu agradeço Si, por acreditar e confiar em mim. Sinto que cresci muito sob sua orientação. Agradeço também ao Dr. Dimas, pelas oportunidades e por fazer do Hemocentro de Ribeirão Preto uma instituição exemplar, na pesquisa e na rotina.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de mestrado que me foi concedida, e que possibilitou minha estadia nesta cidade.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, por tudo o que me ensinaram (sobre ciência, ou sobre a vida), por tornarem muitos dos dias neste mestrado mais leves e também pela paciência: Fernanda, Aline, Eva, Isa, Slav, Alex, Péricles, Juliana, Katia, Suelen, Yann, Roma, Thalita e Dai.

À Tathi, Aline, Everton e Luiza faço um agradecimento especial, pois foram as pessoas que me ensinaram a gerar e a manipular células pluripotentes. Meu trabalho não seria possível sem vocês. Agradeço à Isa pela ajuda fundamental na manipulação dos camundongos.

Este trabalho só foi possível graças a estrutura e aos profissionais do laboratório de terapia celular, liderado pela Dra. Maristela, sou muito grato a vocês.

Agradeço à Patricia e à Camila do laboratório de citometria, pela paciência, sugestões, ensinamentos e dedicação na análise das minhas amostras. Agradeço também à Dani e à Josi pela ajuda com os experimentos de imunocitoquímica e imunohistoquímica.

À Profa. Lilian e a Mayra, da Unicamp pela ajuda com a genotipagem das hiPSCs. À profa. Andreia, da faculdade da farmácia da USP de Ribeirão preto, pela ajuda com a técnica de imunohistoquímica.

Agradeço muito às médicas do hemocentro, Dra. Flávia e Dra. Maria, por ajudar a encontrar os doadores com fenótipo raro, e por me ajudarem a entender os fundamentos da imunohematologia. E à assistente social Inês, responsável por entrar em contato com os doadores.

A Carmem e Dalvinha, pela disposição em ajudar e por serem tão prestativas. Às secretárias do programa de pós-graduação, Adriana e Raquel, pela paciência, pela ajuda, e principalmente pela elucidação dos complexos trâmites burocráticos que envolvem um mestrado.

Agradeço a todas as pessoas que estudam ou trabalham no Hemocentro de Ribeirão Preto, todos, de alguma forma contribuíram para este trabalho. Para mim é um privilégio trabalhar nesta instituição! Muito obrigado a todos!

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar. Mas o
mar seria menor se lhe faltasse uma gota”**

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

CATELLI, L.F. **Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSCs) a partir de células somáticas de indivíduos com fenótipo de interesse para transfusões sanguíneas.** 2016. 85f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A demanda por transfusões sanguíneas tem aumentado no Brasil e o número de doações de sangue permanecem insuficientes. Há escassez de componentes de sangue para transfusão, principalmente de concentrados de células vermelhas do sangue. As células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) possuem um grande potencial para se tornar uma fonte de CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE, pois podem se diferenciar em qualquer tipo celular, incluindo CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE de fenótipo específico. O objetivo deste trabalho é a geração de hiPSCs para partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de candidatos a doação de sangue que possuem fenótipo eritrocitário de baixa imunogenicidade, bem como a diferenciação eritroide das hiPSCs geradas. As amostras de sangue periférico (PB) de 11 indivíduos foram coletadas e caracterizadas quanto ao genótipo para os seguintes antígenos eritrocitários: Sistema Rh (RHCE*01/RHCE*02/RHCE*03/RHCE*04/RHCE*05), Kell (KEL*01/KEL*02), Duffy (FY*01/FY*02 and FY*02N.01), Kidd (JK*01/JK*02) e MNS (GYPB*03/GYPB*04). Outros antígenos de grupos sanguíneos distintos foram determinados por meio de fenotipagem. Duas amostras (PBMCs PB02 e PB12) foram selecionadas para a reprogramação devido ausência de múltiplos antígenos eritrocitários e, portanto, considerados de baixa imunogenicidade. Os PBMCs foram enriquecidos em eritroblastos e em seguida, as células foram transfectadas com os vetores episomais pEB-C5 e pEB-Tg e então, co-cultivados sobre fibroblastos de embriões murinos (MEFs) até o surgimento de colônias semelhantes a hiPSCs (hiPSC PB02 e hiPSC PB12). Estas colônias foram transferidas para condições de cultivo próprias e posteriormente caracterizadas quanto à sua pluripotência. A expressão dos genes de pluripotência OCT4, SOX2 e NANOG demonstrou níveis de expressão maior em comparação às linhagens não pluripotentes. As análises de imunofenotipagem por citometria de fluxo revelaram que em torno de 86% das células expressaram Nanog, 88% Oct4 e 88% Sox2. Os níveis de expressão de genes de pluripotência e marcadores foram consistentes com o estado indiferenciado encontrado em células pluripotentes conhecidas. A análise funcional para avaliação da pluripotência foi realizado pela injeção das hiPSCs em camundongos imunodeficientes, demonstrando a formação de teratoma nas linhagens geradas. A metodologia para diferenciação hematopoética das hiPSCs geradas a partir dos corpos embrioides estão em progresso. O potencial de diferenciação foi confirmado durante a padronização deste processo, utilizando ensaio de formação de colônias em metilcelulose. Uma média de 10,5 colônias de precursores eritroide foram obtidas a partir de 50×10^3 hiPSC PB02 em diferenciação e uma colônia mista (mieloide e linfoide) a partir de 15×10^3 hiPSC PB12 foram obtidas. Neste trabalho foi possível gerar duas linhagens de hiPSCs com fenótipos de antígenos eritrocitários de interesse que podem ser mantidas em cultura por um longo período (26 passagens) e demonstram um potencial de diferenciação hematopoética.

Palavras-chave: antígenos eritrocitários, células-tronco pluripotentes induzidas, diferenciação hematopoética.

ABSTRACT

CATELLI, L.F. **Generation of induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from somatic cells of individuals with interesting phenotypes for blood transfusion.** 2016. 85f. Thesis (Master). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

The demand for blood transfusion has increased in Brazil and the number of blood donations remains insufficient. Therefore, there is a shortage of blood components for transfusion, mainly concentrates of red blood cells (RBCs). Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) have great potential to become a source of RBCs, because they can differentiate into every cellular type, including RBCs of a particular phenotype. The objective of this work was to generate hiPSC from mononuclear cells of peripheral blood (PBMCs) from blood donors who presented low immunogenic phenotype for transfusion, and erythroid differentiation of the generated hiPSCs. Peripheral blood samples from 11 individuals were collected and characterized for the following erythrocyte antigens: Rh system (*RHCE*01/RHCE*02/RHCE*03/RHCE*04/RHCE*05*), Kell (*KEL*01/KEL*02*), Duffy (*FY*01/FY*02* and *FY*02N.01*), Kidd (*JK*01/JK*02*), MNS (*GYPB*03/GYPB*04*). Additionally, other antigens of different blood groups were determined by phenotyping. The samples PBMC PB02 and PBMC PB12 were chosen for iPS generation due to their multiple negative erythrocyte antigens. They were isolated, expanded into erythroblasts, and transfected using the reprogramming episomal vectors PEB-C5 and PEB-Tg. This population was co-cultured on mouse embryonic fibroblasts (MEFs) until the appearance of hiPSC *like* colonies (hiPSC PB02 and hiPSC PB12). These colonies were transferred to human embryonic stem cells (hESCs) culture conditions and characterized regarding their pluripotency. The expression of *OCT4*, *SOX2* and *NANOG* pluripotency genes demonstrated that the expression of both lineages was higher in comparison with non-pluripotent lineages. Immunophenotyping performed by flow cytometry revealed that 86% of cells expressed Nanog, 88% Oct4 and 88% Sox2. Expression levels of pluripotency genes and markers were consistent with undifferentiated state found in known pluripotent cells. Functional analysis for pluripotency was achieved by the hiPSC injection in immunodeficient mice showing that both hiPSC cell lines were able to induce teratoma tumor. The hematopoietic differentiation potential was confirmed using methylcellulose assay, with an average of 10.5 erythroid colonies from 50×10^3 single cells and a mixed colonies of myeloid and lymphoid cells) and finally a colony composed of white cells from 15×10^3 PB12 hiPSC. In conclusion, it was possible to generate a hiPSC from a red blood cell phenotype that are negative for multiple antigens, and this cell line can be maintained for a long period in culture (26 passages) and show potential for hematopoietic differentiation.

Keywords: Erythrocyte antigens, Induced Pluripotent Stem Cells, Hematopoietic differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Resumo do processo de geração de hiPSCs	35
Figura 2. Genotipagem do sistema Kell.....	43
Figura 3. Perfil de expressão de marcadores hematopoéticos durante a expansão das PBMCs	46
Figura 4. Reprogramação da amostra PB02	47
Figura 5. Reprogramação da amostra PB12	48
Figura 6. Colônias de hESCs em cultura.....	49
Figura 7. Análise da expressão de genes relacionados à pluripotência para caracterização da hiPSC PB02.....	51
Figura 8. Análise da expressão de genes relacionados à pluripotência para caracterização da hiPSC PB12.....	51
Figura 9. Caracterização imunocitoquímica da hiPSC PB02 P19 por microscopia de fluorescência	53
Figura 10. Formação de teratomas pela hiPSC PB02 P12.....	54
Figura 11. Caracterização por imunohistoquímica de um dos teratomas formados pela hiPSC PB02 P12	55
Figura 12. Mapas de intensidade de expressão gênica da hiPSC PB12 P9 (em cultura e CEs de sete dias)	56
Figura 13. Tabela de pontuação (<i>scores</i>) das hiPSCs PB12 P9 quanto a capacidade de autorrenovação e diferenciação (em cultura e em CE com 7 dias)	57
Figura 14. Adaptação das colônias de hiPSCs ao repique enzimático	58
Figura 15. Diferenciação hematopoética (protocolo 1)	59
Figura 16. Análise da expressão dos genes CD34 e SOX2 após o primeiro estágio da diferenciação hematopoética (protocolo 2)	60
Figura 17. Diferenciação hematopoética (protocolo 2)	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sondas utilizadas nas reações de PCR em tempo real e respectivos genes alvo	30
Tabela 2. Anticorpos utilizados nos experimentos de imunofenotipagem	39
Tabela 3. Tipagem ABO e genotipagem eritrocitária de voluntários doadores de amostras de células somáticas.....	44
Tabela 4. PAE das amostras escolhidas para reprogramação, PB02 e PB12	45
Tabela 5. Dedução do fenótipo das hiPSCs PB02 e PB12	50
Tabela 6. Imunofenotipagem da hiPSC PB02 e de linhagens de células embrionárias para marcadores de pluripotência.....	52
Tabela 7. Imunofenotipagem das hiPSC PB12 tratadas com acutase por 4 passagens, para marcadores de pluripotência.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA: Albumina sérica bovina

cDNA: DNA complementar

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA: Comitê de Ética na Utilização de Animais

CIBio/FUNDHERP: Comissão interna de biossegurança da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

CT: Células-tronco

DMEM: do inglês, *Dulbecco's modified eagle medium*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Deoxinucleotídeos trifosfatos

ESCM: do inglês *embryonic stem cell medium*, ou meio de cultura para células embrionárias.

hiPSCs: do inglês *human induced pluripotent stem cells*, ou células tronco pluripotentes induzidas humanas

IHC: Imunohistoquímica

KOSR: do inglês *Knockout serum replacement* ou substituto de soro

LB: Luria Bertani

LRC: do inglês *leuco reduction chamber*, ou câmara de leucorredução

M: Molar

MEF: do inglês *mouse embryonic fibroblasts*, ou fibroblastos de embriões murinos

MNC: Células mononucleares

OSKM: Sigla que representa o conjunto de genes OCT4, SOX2, KLF4 e C-MYC

PAE: Perfil antigênico eritrocitário

PB: Sangue periférico

PBMC: do inglês *peripheral blood mononuclear cells*, ou células mononucleares de sangue periférico

PBS: Tampão fosfato salino

PCR: Reação em cadeia da polimerase

qPCR: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RFLP: Polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição

RNA: Ácido ribonucleico.

rpm: Rotações por minuto

RT-PCR: Reação de transcrição reversa por reação em cadeia da polimerase

SBS: Software Sistema de Banco de Sangue

TBE: Tris/borato/EDTA

TCLE: Termo de consentimento livre e esclarecido

NOTA SOBRE A NOMENCLATURA DE GENES E PROTEÍNAS

Os genes humanos foram escritos em letras maiúsculas e em itálico (por exemplo: *OCT4*) e as proteínas apenas utilizando letras maiúsculas (por exemplo: OCT4). As regras aceitas para a escrita dos genes e proteínas foram descritas por Splendore (SPLENDORE, 2005).

A nomenclatura dos genes e proteínas relacionados aos antígenos eritrocitários estão de acordo com a *International Society of Blood Transfusion* (ISBT). Um exemplo de sua utilização, para a presença a do antígeno Jk^a e ausência do antígeno Jk^b do sistema Kidd está descrita na tabela abaixo:

Exemplo de notações dos antígenos eritrocitários encontradas neste trabalho.

	Tradicional	ISBT
Antígeno	Jk ^a	JK1
Fenótipo	Jk(a+b-)	JK:1, -2
Genótipo	Jk ^a /Jk ^a	JK*01/JK*01
Gene	<i>JK^a</i>	JK*01

Adaptado de: (CASTILHO; PELLEGRINO; REID, 2015)

SUMÁRIO

1 Introdução	15
1.1 Transfusões sanguíneas.....	15
1.1.1 Histórico das transfusões e dos grupos sanguíneos	15
1.1.2 Antígenos eritrocitários e aloimunização	16
1.1.3 Concentrado de hemácias como produto terapêutico	17
1.2 Células-tronco, células-tronco pluripotentes e indução da pluripotência	19
1.2.1 Utilização das hiPSCs na pesquisa e terapia celular.....	21
1.3 Células-tronco pluripotentes e hematopoese	21
1.3.1 Viabilidade <i>in vivo</i> das células vermelhas do sangue geradas <i>ex vivo</i>	23
1.3.2 Geração de células vermelhas do sangue <i>ex vivo</i> a partir de hiPSCs com fenótipos de interesse	24
2 Justificativa	26
3 Objetivo	27
3.1 Metas a serem alcançadas	27
4 Material e Métodos.....	28
4.1 Obtenção do material biológico.....	28
4.1.1 Aspectos Éticos	28
4.1.2 Isolamento e armazenamento das PBMCs	28
4.2 Extração de ácidos nucleicos.....	29
4.2.1 Extração e quantificação de DNA e RNA totais.....	29
4.3 Reação de Transcrição reversa (RT-PCR).....	29
4.4 Expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR).....	30
4.5 reação em cadeia da polimerase (PCR)	31
4.6 detecção de polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)	31
4.7 Técnicas sorologia (tipagem ABO e fenotipagem)	31
4.8 Experimentos pré-reprogramação celular	32
4.8.1 Cultivo de bactérias e extração de DNA plasmidial	32
4.8.2 Produção e cultivo de fibroblastos de embriões murinos (MEFs)	32
4.9 Reprogramação celular.....	33
4.9.1 Expansão das PBMCs e transfecção	33
4.9.2 Descongelamento de MEFs	33
4.9.3 Inativação de MEFs	34

4.9.4 Cultivo das células transfectadas sobre MEFs e surgimento das hiPSC	34
4.10 Mudança para condições de cultivo de células-tronco pluripotentes (células-tronco pluripotentes)	35
4.11 Cultivo de células-tronco pluripotentes (células-tronco pluripotentes)	35
4.11.1 Preparo de Geltrex®	35
4.11.2 Repique das colônias iniciais e repiques para expansão da cultura	36
4.11.3 Criopreservação das células pluripotentes	36
4.11.4 Descongelamento de células-tronco pluripotentes	37
4.12 Caracterização das hiPSCs geradas	37
4.12.1 Genotipagem de alta eficiência utilizando o HEA BeadChip™	37
4.12.2 Análises imunofenotípicas por citometria de fluxo	38
4.12.3 Análise imunocitoquímica por fluorescência	39
4.12.4 Ensaio de formação de teratomas	40
4.12.5 Análise histológica do teratoma por imunohistoquímica	40
4.12.6 Análise quantitativa da pluripotência e do potencial de diferenciação	41
4.13 Diferenciação hematopoética	41
4.13.1 Adaptação celular para a diferenciação hematopoética	41
4.13.2 Primeiro estágio de diferenciação hematopoética - Protocolo 1	41
4.13.3 Primeiro estágio de diferenciação hematopoética - Protocolo 2	42
4.13.4 Ensaio de células formadoras de colônias em metilcelulose	42
5 Resultados	43
5.1 Escolha das amostras para reprogramação celular	43
5.1.1 Genotipagem eritrocitária	43
5.1.2 Fenotipagem eritrocitária	44
5.2 Geração e estabelecimento das linhagens de hiPSCs	45
5.2.1 Propagação e extração do DNA plasmidial (vetores pEB-C5 e pEB-Tg)	45
5.2.2 Expansão e enriquecimento da população de progenitores mieloides	45
5.2.3 Reprogramação da amostra PB02	46
5.2.4 Reprogramação da amostra PB12	47
5.3 Caracterização da hiPSCs geradas	49
5.3.1 Genotipagem de alta eficiência utilizando o HEA BeadChip™	49
5.3.2 Expressão gênica por qPCR	50
5.3.3 Análise imunofenotípica por citometria de fluxo	52
5.3.4 Imunocitoquímica por microscopia de fluorescência	52
5.3.5 Caracterização funcional das hiPSC PB02	53
5.3.6 Análise histológica do teratoma formado pela hiPSC PB02 P12	54

5.3.7 Análise quantitativa da pluripotência e do potencial de diferenciação da hiPSC PB12 P9	55
5.4 Diferenciação hematopoética.....	58
5.4.1 Pré-diferenciação hiPSC PB02 P19 e hiPSC PB12 P26	58
5.4.2 Primeiro estágio de diferenciação e ensaio de células formadoras de colônias (CFC) em meio Methocult™ (Protocolo 1)	59
5.4.3 Diferenciação hematopoética (Protocolo 2).....	60
6 Discussão.....	62
7 Conclusão	74
8 Referências Bibliográficas	75
9 Anexos.....	83
9.1 Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP):.....	83
9.2 Aprovação do projeto de pesquisa comissão interna de biossegurança da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio/FUNDHERP):	84
9.3 Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/FUNDHERP)	85

1 Introdução

1.1 Transfusões sanguíneas

1.1.1 Histórico das transfusões e dos grupos sanguíneos

Os primeiros registros sobre transfusões de sangue realizados entre animais datam em meados do século XVII, quando foi descrito com sucesso este procedimento entre dois cães, entre duas ovelhas e também entre um cão e uma ovelha (LOWER, 1666). Um ano depois, Jean Baptiste Denis utilizou o sangue de animais, neste caso de cordeiros, para as primeiras transfusões em humanos (HAJDU, 2003). Embora a maior parcela das transfusões realizadas por ele tenha sido bem-sucedida, muitos de seus pacientes morreram após receber sangue destes animais repetidamente. Outros experimentos semelhantes realizados em diversos locais da Europa mostraram o mesmo resultado, e, portanto, a prática transfusional e seu estudo caíram em descrédito, sendo até mesmo considerada ilegal na França por muitos anos (HAJDU, 2003; STOWELL et al., 2012).

Os estudos envolvendo as transfusões sanguíneas, sobretudo entre seres humanos, foram retomados somente no início do século XIX, sendo realizados por médicos que buscavam oferecer alívio aos pacientes com sintomas relacionados à fraqueza, inanição, dispepsia ou hemorragias. Nesta época, havia grande convicção de que a simples transferência de sangue aos seus pacientes, ajudaria a salvar suas vidas e a substituição de um sangue dito alterado por sangue considerado saudável poderia curar algumas doenças (BLUNDELL, 1818; MADGE, 1874). Estes procedimentos, muitas vezes realizados como último recurso, apresentavam desfechos variados, podendo resultar na recuperação do paciente (PRICHARD, 1843), no agravamento do quadro clínico ou até mesmo em óbito (MADGE, 1874).

No início do século seguinte, foi observado a partir de experimentos de aglutinação, que o soro (possuindo anticorpos) de um indivíduo era capaz de fazer com que as CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE, ou hemácias (possuindo antígenos) do sangue de pessoas diferentes aglutinassem, formando precipitados. As aglutinações ocorreram devido à interação antígeno-anticorpo e repetiam-se revelando um padrão, mas não ocorreram quando o soro e as células testadas pertenciam à mesma pessoa. Estas observações permitiram a distinção do sangue presente no organismo de diferentes seres humanos saudáveis, e sua classificação em grupos pertencentes a um sistema sanguíneo, atualmente conhecido como ABO. Até então, o

sangue como um todo era considerado idêntico entre todos os seres humanos e as reações de aglutinação eram atribuídas exclusivamente à presença de enfermidades associadas ao sangue. O real motivo da variação do resultado final destes procedimentos foi posteriormente elucidado, sendo atribuído à presença ou ausência de antígenos e anticorpos no sangue de cada indivíduo e a sua capacidade de aglutinação (LANDSTEINER, 1901).

A adoção de testes de compatibilidade baseados na reação de aglutinação tornou-se indispensável ao longo do tempo, sendo recomendada a transfusão somente caso não fosse observada aglutinação entre o soro do receptor e as células do doador. Entretanto, reações indesejáveis e até mesmo fatais ocorriam após determinados tratamentos, principalmente quando o paciente era transfundido com o mesmo sangue mais de uma vez. Nestes casos, notou-se que o paciente produzia novos anticorpos, provavelmente devido à exposição a antígenos presentes nas células vermelhas do sangue transfundidas que ainda não haviam sido identificados (LEE, 1917).

Casos clínicos adversos, principalmente os relatos de doença hemolítica do feto e do recém-nascido, contribuíram imensamente para a descoberta e classificação de novos antígenos (COCHRANE; MALONE; DUNSFORD, 1950). Os sistemas Rh (LANDSTEINER; WIENER, 1940), Kell (COOMBS; MOURANT; RACE, 1946), Kidd (ALLEN; DIAMOND; NIEDZIELA, 1951) e Duffy (BAKER et al., 1956) são exemplos de sistemas com grande importância clínica cujos antígenos foram descobertos desta maneira. De acordo com a sociedade Internacional de Transfusão Sanguínea (ISBT), atualmente são conhecidos 36 sistemas de grupos sanguíneos e 326 antígenos eritrocitários (ISBT - INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION, 2016a). As diferentes combinações destes antígenos encontradas na superfície das hemácias de cada indivíduo, e contra os quais são produzidos anticorpos no plasma do paciente, podem ser chamadas de perfil antigênico eritrocitário (PAE).

1.1.2 Antígenos eritrocitários e aloimunização

Os antígenos eritrocitários são estruturas proteicas ou compostas por carboidratos presentes na superfície da membrana das hemácias. Apesar de possuírem grande importância fisiológica para a célula, como funções estruturais, de transporte, enzimáticas e de receptores, eles são mais conhecidos por sua capacidade de induzir respostas imunes indesejáveis nos pacientes que recebem transfusões de sangue (BONIFÁCIO; NOVARETTI, 2009; MARSH, 1990).

Cada antígeno possui determinado grau de imunogenicidade, e, portanto, devem ser respeitados para evitar complicações como, por exemplo, a aloimunização, isto é, a formação de novos anticorpos devido à exposição a antígenos não próprios (BAIOCHI; NARDOZZA, 2009). Outra preocupação dos profissionais da saúde antes e depois da realização de uma transfusão são as reações hemolíticas agudas e tardias causadas pela ativação do sistema complemento e consequente hemólise no paciente (BELLONE; HILLYER, 2013; DASARARAJU; MARQUES, 2015; STOWELL et al., 2012)

Por este motivo, de modo a se evitar a aloimunização eritrocitária na prática transfusional, deve se considerar a presença de antígenos imunogênicos nas células do doador antes de uma transfusão, principalmente os antígenos de alto significado clínico pertencentes aos sistemas sanguíneos: ABO, Rh, Kell, Duffy, Kidd, MNS e Diego. Dentre estes, os anticorpos mais comumente encontrados decorrentes de episódios de aloimunização são os que reagem com os antígenos do sistema Kell e Rh (ALVES et al., 2012). De acordo com um estudo realizado em 2008 pela Universidade de Leiden (Países Baixos), é possível realizar transfusões sanguíneas levando em conta a compatibilidade dos antígenos Rh (C, E, c, e) e Kell (K), o que teoricamente reduziria a formação de novos anticorpos (imunização) em 70%. Se além destes antígenos, fossem incluídos Duffy (Fy^a), Kidd (Jk^a) e MNS (S), a redução seria de 90% (SCHONEWILLE, 2008). No entanto, em algumas situações de emergência, principalmente traumas, não são realizados os testes imuno-hematológicos completos necessários para verificação da compatibilidade fenotípica dos grupos sanguíneos. As transfusões podem ser realizadas em caráter emergencial para suprir as necessidades imediatas de transporte de oxigênio dos pacientes, aumentando as chances de ocorrência de aloimunização após o processo (MULAY et al., 2013)

O grupo mais susceptível à ocorrência de aloimunização é o de pacientes que necessitam de múltiplas transfusões sanguíneas. Estas podem induzir a formação de novos anticorpos nos pacientes devido à exposição aos antígenos eritrocitários pela prática transfusional recorrente, visto que há uma evidente correlação entre o número de transfusões realizadas e a aloimunização (ALVES et al., 2012). Como consequência do maior número de anticorpos em sua circulação, há uma restrição cada vez maior na disponibilidade de sangue compatível para realização da transfusão sanguínea (BAIOCHI; NARDOZZA, 2009).

1.1.3 Concentrado de hemácias como produto terapêutico

Atualmente o concentrado de hemácia é um dos hemocomponentes mais transfundidos em pacientes. Não havendo substituto para o sangue, muitos pacientes

dependem desta única fonte para a manutenção da saúde e sobrevivência. Este é o caso de muitos indivíduos que devido a algum acidente ou trauma perderam considerável volume de sangue, e de pacientes que necessitam de reposição contínua de sangue e seus componentes celulares por sofrerem determinada deficiência na produção de suas próprias células sanguíneas (CHRISTÓFARO; CARVALHO; SALES, 2013; LONG; KOYFMAN, 2016)

Os pacientes portadores de síndrome mielodisplásica, possuem um quadro de anemia crônica devido a uma alteração na produção de células hematopoéticas, principalmente as que compõem a linhagem mieloide. Em muitos casos, a transfusão sanguínea é a única opção de tratamento disponível à estes pacientes (FENAUX; ADÈS, 2014). Uma grande parte dos pacientes portadores de anemia falciforme também dependem de transfusões de sangue para o aumento de sua sobrevida (CHOU; FASANO, 2016). Esta prática, visa o restabelecimento da capacidade de oxigenação dos tecidos do paciente, prejudicada pela alta taxa de hemácias falcizadas em sua circulação sanguínea (SMITH-WHITLEY; THOMPSON, 2012). Outras patologias capazes de causar anemias severas e dependência de transfusões sanguíneas são as formas graves de talassemia, principalmente a β -talassemia do tipo major. Os sintomas desta doença são consequência de uma eritropoese, o processo de formação de eritrócitos, ou seja, hemácias, ineficiente causada pela síntese de moléculas instáveis de hemoglobina, levando à destruição das hemácias (BORDBAR et al., 2014; SANKARAN; NATHAN, 2010). Neste caso, a prática mais utilizada para contornar a deficiência de oxigenação dos tecidos é a transfusão de sangue, que gera um aumento em décadas na sobrevida destes pacientes (BAYANZAY; ALZOEBIE, 2016).

Uma das grandes preocupações para os pacientes que dependem da prática transfusional é que a provisão de sangue disponível para transfusão está sujeita a alta variabilidade, havendo alternância de períodos de suficiência e de escassez. De um modo geral, em nosso país, o cenário é de carência crônica de elementos do sangue para transfusão, com pequena adesão da população às campanhas e pequena retenção de doadores. Realidade possivelmente associada à falta de informação, o que causa preconceitos ou medos relacionados à doação de sangue, podendo afastar as pessoas desta prática (CHRISTÓFARO, CARVALHO e SALES, 2013).

Entre os anos de 2010 e 2014, a taxa de participação da população brasileira na doação de sangue foi de 1,9%, o que corresponde a aproximadamente 3,6 milhões de doações (SIMÕES; GENOVEZ, 2014). Segundo o Ministério da Saúde, baseando-se em diretrizes da Organização Mundial da Saúde (OMS), o número ideal seria de 3% (PORTAL BRASIL, 2013). Há ainda uma tendência globalizada de envelhecimento populacional em longo prazo, o que pode significar uma considerável diminuição na população doadora, e como consequência, uma escassez de sangue e de concentrados de hemácias ainda mais evidente (BRASIL, 2015).

Existem casos em que concentrados de hemácias raras ou de difícil obtenção são economizados para serem utilizados em eventualidades de pacientes com necessidades mais urgentes, ou simplesmente não há doadores disponíveis com o fenótipo necessário (CHRISTÓFARO; CARVALHO; SALES, 2013).

Outra preocupação relevante na área transfusional é a possibilidade de transmissão de agentes causadores de doenças infectocontagiosas durante as transfusões. No entanto, isso ocorre com baixíssima frequência devido a uma considerável melhoria na triagem dos doadores, utilização de testes sorológicos mais sensíveis e implementação de teste molecular para garantir uma maior segurança transfusional (MACHADO; LEVI, 2012).

Todos esses aspectos tornam o gerenciamento de bancos de sangue uma tarefa árdua e complexa, revelando a necessidade de obtenção de hemácias a partir de fontes mais estáveis e seguras, de modo que essa atividade seja desempenhada com maior especificidade, menores riscos de múltipla imunização e de transmissão de agentes patogênicos.

1.2 Células-tronco, células-tronco pluripotentes e indução da pluripotência

As células-tronco (CTs) são células capazes tanto de se proliferar e se manter indiferenciadas pelo processo de autorrenovação quanto de se diferenciar e tornar-se uma célula especializada. A variedade de células que podem ser originadas a partir da diferenciação de uma célula-tronco, ou plasticidade, respeita uma determinada hierarquia. As células totipotentes podem originar todas as células do organismo humano inclusive anexos embrionários, as pluripotentes podem originar células de quaisquer dos três tecidos embrionários (com exceção dos anexos embrionários) e as multipotentes originar apenas células de um dos tecidos embrionários (Endoderme, ectoderme ou mesoderme) (MUZES; SIPOS, 2016).

As células-tronco embrionárias humanas (hESC) são as células pluripotentes encontradas naturalmente no organismo humano após a fecundação, mais especificamente constituindo a massa interna do blastocisto durante a embriogênese (THOMSON, 1998). Estas células têm sido empregadas largamente em estudos de diferenciação e de aplicação na medicina regenerativa, entretanto, sua obtenção está associada inevitavelmente à destruição do blastocisto, estrutura considerada um embrião humano viável. Deste modo, os estudos envolvendo estas células sofrem principalmente com controvérsias éticas (SEKI; FUKUDA, 2015; TEOH; CHEONG, 2012).

Felizmente, o estado pluripotente pode ser adquirido por uma célula a partir de alterações na expressão gênica por meio de técnicas de reprogramação celular, de modo que passam a expressar genes e produzir proteínas relacionadas à pluripotência de forma artificial. Este é o caso das células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

A técnica de geração de iPS foi desenvolvida por Kazutoshi Takahashi e Shinya Yamanaka em 2006. Em seus experimentos, eles avaliaram o potencial de reprogramação de células somáticas murinas utilizando uma variedade de fatores de transcrição, importantes na manutenção da pluripotência de ESCs. Eles relatam que a melhor combinação foi a dos fatores de transcrição Oct3/4 (*octamer 3/4*), Sox2 (*SRY box-containing gene 2*), e Klf4 (*Kruppel-like factor 4*) c-Myc, em conjunto conhecidos como OSKM, os quais foram capazes de gerar iPS com maior eficiência, capacidade de manutenção em cultura no estado indiferenciado e com morfologia ideal, ou seja, idêntica a encontrada em células embrionárias. A introdução dos genes responsáveis pela expressão destas proteínas no DNA celular foi realizada por meio de transdução lentiviral (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). O sucesso da geração das primeiras iPSCs com células murinas abriu caminho para que fossem desenvolvidas iPSCs a partir de células humanas (hiPSCs), objetivo alcançado pouco tempo depois pelo mesmo grupo de pesquisa, com a utilização dos mesmos fatores acima descritos (TAKAHASHI et al., 2007). As células hiPSCs apresentaram características de hESCs no que diz respeito à morfologia, proliferação, expressão gênica, marcadores de superfície, atividade das telomerasas, diferenciação *in vitro* e formação de teratomas em camundongos imunodeficientes (TAKAHASHI et al., 2007).

Recentemente outro grupo de pesquisa descreveu um protocolo que permite a indução da pluripotência sem integração dos genes reprogramadores no genoma celular. Isso é possível por meio da utilização de vetores episomais que codificam para fatores de transcrição, os quais são internalizados pela célula por meio de transfecção em uma técnica de eletroporação. Utilizando o plasmídeo pEB-C5, Dowey e colaboradores (2013), foram capazes de induzir à pluripotência uma população de células enriquecida a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Este enriquecimento causa o aumento da densidade de células mielóides durante a expansão celular, principalmente de eritroblastos, células que apresentam expressão de glicoforina A (CD235a) e de CD71 (receptor de transferrina) e podem ser detectadas pela expressão destes marcadores (LORAND-METZE, 2006). Esta técnica de reprogramação oferece vantagens sobre o método de transdução lentiviral, como, por exemplo, a não utilização de vírus e a ausência de integração de material genético exógeno ao genoma da célula a ser reprogramada. Estas vantagens fazem das iPSCs geradas por plasmídeos episomais, células com maior estabilidade genômica, o que aumenta a sua adequação à possíveis terapias regenerativas (DOWEY et al., 2013). As iPSCs

podem ainda ser congeladas para uso futuro, enquanto mantem suas propriedades, sua morfologia e cariótipo (SEIFINEJAD et al., 2010).

1.2.1 Utilização das hiPSCs na pesquisa e terapia celular

As células somáticas de um organismo que carregam as origens genéticas de alguma patologia, como por exemplo, uma mutação, sendo passível de expansão *in vitro* podem ser reprogramadas e originar linhagens afetadas de iPSC. As células pluripotentes podem ser induzidas a originar células maduras destes tecidos para estudo (SOLDNER; JAENISCH, 2012). Esta abordagem constitui uma ferramenta útil na elucidação de mecanismos de patologias como por exemplo a doença de Parkinson (FERNÁNDEZ-SANTIAGO et al., 2015), a β -talassemia (FAN et al., 2012), a doença falciforme (HUANG et al., 2015) e hemofilia A (WU et al., 2016). As células diferenciadas a partir de hiPSCs também podem ser usadas como plataforma de testes para novas drogas (AVIOR; SAGI; BENVENISTY, 2016) ou para correções pontuais do genoma visando a terapia celular em diferentes patologias (CAMARASA; GÁLVEZ, 2016; NIU et al., 2016).

Além da pesquisa básica e estudos sobre os mecanismos celulares e moleculares que levam a doenças, há potencial, mesmo que incipiente, de produção de células diferenciadas a partir de hiPSCs que venham a desempenhar algum papel em terapias regenerativas. Este tipo de terapia consiste na reposição de células de determinado tecido que foram destruídas ou que deixaram de realizar suas funções adequadamente, gerando um quadro clínico desfavorável ao paciente. Um exemplo é a destruição das células pancreáticas produtoras de insulina na diabetes tipo 1, por ação de anticorpos próprios, causando deficiência grave de insulina. A regeneração destas células *in vivo*, com o consequente restabelecimento da produção da insulina é uma das alternativas estudadas atualmente.

A reposição de hemácias à pacientes que sofreram hemorragias ou que possuem anomalias em suas próprias células ou em sua produção, se encaixa como uma possível terapia celular. Neste sentido, considera-se a produção de hemácias a partir da diferenciação de hiPSCs um processo com grande potencial para tornar-se uma fonte de hemácias para transfusão no futuro, além de uma ferramenta útil na elucidação dos mecanismos envolvidos na hematopoese e eritropoese (KIM, 2014; TEOH; CHEONG, 2012).

1.3 células-tronco pluripotentes e hematopoese

A hematopoese é o processo responsável pela geração e reposição de todas as células do sangue no organismo, dependente de uma população de CTs capaz de realizar auto-renovação, assim como a diferenciação em todos os tipos celulares que compõem o sangue (ORKIN, 2000). Na medula óssea do organismo humano adulto acontece o processo denominado de eritropoese, o qual origina os reticulócitos, os quais finalizam sua maturação tornando-se hemácias anucleadas e bicôncavas ao adentrarem à corrente sanguínea (EYMARD et al., 2014; PALIS, 2008)

É possível mimetizar *in vitro* o complexo processo da eritropoese humana, responsável pela geração das células vermelhas do sangue, de maneira a se obter em laboratório hemácias funcionais a partir da indução da diferenciação hematopoética em hESCs. A funcionalidade de células vermelhas do sangue produzidas desta maneira já foi constatada por meio da avaliação da capacidade de carreamento de oxigênio ou pela avaliação da interação das hemoglobinas com o monóxido de carbono (LAPILLONNE et al., 2010b; LU et al., 2008b; MA et al., 2008).

Os protocolos de diferenciação hematopoética em sua maioria são realizados mediante co-cultivo das células pluripotentes juntamente às linhagens celulares estromais, como as OP9 (CHOI et al., 2010; DIAS et al., 2011b) ou por meio da indução desta diferenciação em corpos embrioides (CEs) intermediada por citocinas específicas. Este último método se fundamenta em duas fases ou estágios. A primeira consiste na formação dos CEs e seu comprometimento com o tecido mesodérmico e a segunda, na indução do corpo embrioide à formação dos progenitores hematopoéticos e maturação destas células até a obtenção das hemácias. De um modo geral são utilizadas as citocinas SCF, BMP4, VEGF e bFGF na primeira fase, e TPO e EPO são adicionadas às células em diferenciação durante a segunda fase (DORN et al., 2015; LAPILLONNE et al., 2010b; NG et al., 2008)

Entretanto, nenhum sistema de diferenciação *in vitro* foi capaz de gerar hemácias contendo hemoglobinas adultas. As células vermelhas do sangue geradas *in vitro*, normalmente, seja por diferenciação de ESCs ou hiPSC possuem majoritariamente hemoglobinas fetais em sua composição (CHANG et al., 2010; CHOI et al., 2010; DORN et al., 2015; KOBARI et al., 2012; LAPILLONNE et al., 2010b; OCHI et al., 2014). As células vermelhas do sangue expressando majoritariamente hemoglobina fetal possuem uma eficiência menor no transporte de oxigênio do que as que expressam hemoglobinas adultas. Ainda assim, a transfusão de hemácias contendo estas características não deve ser desprezada, uma vez que indivíduos que mantêm a expressão de hemoglobina fetal na vida adulta não são anêmicos (MIGLIACCIO, 2013). Além disso, o aumento na proporção de células que expressam estas hemoglobinas tem sido considerado uma alternativa de tratamento para doenças como a β -talassemia e a anemia falciforme (LETTRE; BAUER, 2016; LOWREY, 2016).

1.3.1 Viabilidade *in vivo* das hemácias geradas *ex vivo*

Até o momento não existem relatos de hemácias geradas *in vitro* a partir de hiPSCs que tenham sido utilizadas em ensaios de transfusão. Entretanto, a prova de princípio de que este processo é seguro e viável foi descrito por Giarratana e colaboradores (2011), com a diferenciação de células-tronco hematopoéticas (CTHs) CD34⁺ em hemácias funcionais. No referido estudo, foram obtidas CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE anucleadas, principalmente reticulócitos, contendo hemoglobinas com capacidade de carreamento de oxigênio muito semelhante à de hemoglobinas fetais de hemácias naturais. Estas células foram transfundidas em camundongos e em humanos, para determinação de sua viabilidade *in vivo*. As células foram capazes de atingir seu estágio final de maturação (diminuição do diâmetro e aquisição de morfologia bicôncava) quando transfundidas em camundongos. Os reticulócitos também foram marcados com o composto ⁵¹Cr e então transfundidos no organismo humano. A marcação permitiu a determinação do tempo de meia-vida das células *in vivo*, o qual é muito semelhante ao das células naturais do indivíduo (GIARRATANA et al., 2011).

Outro aspecto importante avaliado por este estudo foi a manutenção do perfil eritrocitário ao final do processo de diferenciação, mostrando a manutenção da expressão de antígenos eritrocitários. A única exceção foi a ausência dos antígenos do sistema Lewis ao final da diferenciação, o que era esperado, uma vez que estes são formados por adsorção de moléculas de glicolipídios do plasma nas hemácias (GIARRATANA et al., 2011). Além de serem morfolologicamente e funcionalmente similares às hemácias naturais, quando atingem o estado de enucleação, as CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE geradas *in vitro* deixam de possuir núcleo e consequentemente material genético. Dessa forma, tornam-se seguras do ponto de vista genômico, minimizando a possibilidade de ocorrer mutação e geração de tumores no organismo receptor, uma vez que seriam transfundidas somente as células sem núcleo e sem material genético propenso a mutações (EBIHARA; MA; TSUJI, 2012).

1.3.2 Geração de hemácias *ex vivo* a partir de hiPSCs com fenótipos eritrocitários específicos

As hiPSCs são uma ferramenta que possibilita a reprogramação de células com genótipos ou fenótipos específicos de modo que as células diferenciadas posteriormente apresentem características de interesse. As CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE geradas a partir de hiPSCs de doadores de sangue com fenótipos caracterizados pela ausência de múltiplos antígenos os quais poderiam auxiliar em períodos nos quais os estoques de concentrados de hemácias sejam insuficientes nos bancos de sangue (EBIHARA; MA; TSUJI, 2012). Uma linhagem de hiPSCs foi gerada por Seifinejad e colaboradores (2010) a partir de um doador de sangue com fenótipo Bombay, ou seja, não possuidor de antígenos do sistema ABO em suas hemácias. Isso significa que hemácias geradas com estas características seriam compatíveis com qualquer paciente em relação ao sistema ABO. Além disso, os pacientes que possuem esta característica rara e que encontram grandes dificuldades para receber sangue compatível, uma vez que possuem anticorpos para todos os antígenos do sistema ABO, poderiam se beneficiar destas células (SEIFINEJAD et al., 2010). As células vermelhas do sangue com fenótipo Bombay seriam muito úteis nestes casos, entretanto, para a geração destas hiPSCs não foram considerados os antígenos de outros sistemas sanguíneos também capazes de induzir a aloimunização eritrocitária nestes pacientes. Neste sentido, hemácias possuindo o menor número possível de antígenos podem ser idealizadas.

Porém, levando-se em consideração a fisiologia das hemácias, não é possível vislumbrar a existência ou a produção de uma hemácia “universal”, ou seja, que não possua antígeno algum em sua superfície. A ausência de antígenos de constituição proteica nestas células está associada à deformidades e diminuição de sobrevivência *in vivo*, algo não observado em antígenos constituídos majoritariamente por carboidratos (MARSH, 1990). Um exemplo disto é a ausência total (fenótipo nulo) de antígenos do sistema Rh na superfície das hemácias, como os pertencentes ao sistema Rh, que pode trazer consequências graves a esta célula. Proteínas que compõem o sistema Rh atuam na membrana das hemácias, preservando sua estrutura, estando o fenótipo Rh nulo associado a desordens da membrana e anemias (CAMBOT et al., 2013). Outros exemplos de funções destes antígenos são: o transporte de ureia para controle de osmolaridade por proteínas do sistema Kidd (OLIVÈS et al., 1995); a atividade enzimática de antígenos do sistema Kell sobre endotelinas, com o papel na regulação nos tónus de vasos sanguíneos; a utilização dos antígenos do sistema Colton como mediadores do transporte de água para controle osmótico; a atribuição dos antígenos do sistema Duffy como receptores de quimiocinas e citocinas, além de constituírem receptores de agentes infecciosos como os parasitas causadores da malária (*Plasmodium sp*). Estas e

outras atribuições das moléculas que compõem os antígenos eritrocitários foram revisadas por Bonifácio e Novaretti em 2009 e Castilho, Pellegrino e Reid em 2015, revelando sua importância para a homeostase das CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE.

Mesmo que a geração de hemácias “universais” atualmente seja impraticável, teoricamente seria possível a geração de uma variedade de hemácias, cada qual com uma combinação de antígenos compondo seu PAE, a partir de diferentes linhagens de hiPSCs, que se complementariam no que diz respeito aos antígenos dos sistemas sanguíneos e às demandas locais de transfusão sanguínea. Deste modo, pode-se planejar e desenvolver com base nas necessidades de uma região ou país, algumas linhagens de hiPSCs que possam ser utilizadas para suprir uma parcela das transfusões, complementando os estoques de CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE coletadas normalmente por meio de doações. Neste sentido, seria desejável considerar principalmente os fenótipos caracterizados pela ausência de antígenos clinicamente importantes em uma transfusão como Rh (D, C, E, c, e), Kell (K), Duffy (Fy^a, Fy^b), Kidd (Jk^a, Jk^b) e MNS (S, s) ou até mesmo de fenótipos raros (PEYRARD et al., 2011).

Um estudo francês indica que para suprir as necessidades desse país seriam necessários 24 clones diferentes de iPSC, caso todos sejam de fato diferenciados em hemácias funcionais, para gerenciar todos os pacientes aloimunizados, com qualquer combinação destes antígenos. A geração de linhagens de hiPSC diferentes, e consequentemente de hemácias diferentes, poderia ser utilizada também para transfusão de portadores de sangue com fenótipo raro, para pacientes aloimunizados e na prevenção de novas aloimunizações em pacientes que recebem transfusões regulares (PEYRARD et al., 2011).

2 Justificativa

As hiPSCs possuem um potencial inovador e são consideradas como possuidoras de uma capacidade ilimitada de diferenciação e também de autorrenovação. Assim, tornam-se potenciais candidatas como fonte de hemácias para produção de reagentes de interesse em fenotipagem eritrocitária como também para fins terapêuticos no futuro.

Uma nova alternativa para obtenção de hemácias torna-se necessária, uma vez que a coleta de sangue de doações voluntárias não atinge os níveis mínimos recomendados pela OMS. Consequentemente, o estoque de sangue é baixo e o esforço para realizar transfusões compatíveis é muito grande, o que pode levar a reações de aloimunização eritrocitária em pacientes politransfundidos.

Deste modo, a produção de hemácias maduras funcionais e com fenótipos específicos a partir da diferenciação das hiPSCs seria de grande utilidade tanto para o estudo da reprogramação celular e diferenciação eritroide, quanto aplicada ao desenvolvimento de métodos para aumento de escala na produção destas células. As hemácias obtidas a partir das hiPSCs atenderiam a demanda de produção de painéis de hemácias personalizadas para detecção de anticorpos e ao estudo dos mecanismos fisiopatológicos da eritropoese. Somado a estas aplicações, o desenvolvimento biotecnológico adquirido nesta proposta, contribuirá para a produção de hemácias *ex vivo*, de modo a criar protocolos factíveis para que no futuro possam atender a demanda dos serviços transfusionais. Dessa forma, a produção de hemácias em larga escala pode representar uma solução para a variabilidade nos estoques destas células ou, pelo menos, a diminuição da dependência de doações para a obtenção destes elementos.

3 Objetivo

Obter células da série eritroide a partir da diferenciação de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSC) provenientes de células somáticas de indivíduos possuidores de fenótipo antigênico eritrocitário múltiplo negativo.

3.1 Metas a serem alcançadas

- Estabelecer linhagens celulares de hiPSCs a partir da reprogramação de PBMCs de indivíduos possuidores de fenótipos raros ou pouco imunogênicos;
- Caracterizar as iPS quanto à pluripotência;
- Verificar o potencial de diferenciação hematopoética das iPS geradas.

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção do material biológico

4.1.1 Aspectos Éticos

Todos os participantes desta pesquisa foram esclarecidos sobre a conduta para a coleta de sangue periférico (PB, do inglês *peripheral blood*). A proposta deste projeto foi submetida para apreciação ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP), à Comissão Interna de Biossegurança da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio/FUNDHERP) e ao Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/FUNDHERP). Os documentos de aprovação estão no item Anexos.

4.1.2 Isolamento e armazenamento das PBMCs

Foram coletados 20 a 25 mL de PB de seis voluntários escolhidos aleatoriamente, com genótipo determinado após a coleta e um doador de sangue com fenótipo eritrocitário conhecido, convidado a participar da pesquisa; e 10 mL de PB de cinco doadores de plaquetas aleatórios e a partir das câmaras de leucorredução (LRC, do inglês *leuco reduction chamber*), os quais tiveram seu genótipo determinado após a coleta. Estas câmaras são consideradas resíduos do processo automatizado de aférese plaquetária.

O isolamento das PBMC foi realizado por método baseado no princípio de diferença de densidade entre os componentes do sangue, adicionados de Ficoll-Paque™ Plus (GE Healthcare, Reino Unido). As PBMC foram coletadas, centrifugadas a 300 x g por 10 minutos à temperatura ambiente e quantificadas.

Alíquotas de 1×10^7 células foram congeladas com meio de congelamento composto por soro fetal bovino (SFB) inativado (GE Healthcare, EUA) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, EUA) a -80°C para posterior utilização. Alíquotas de 1×10^6 células também foram preparadas e congeladas, sem meio de congelamento a -20°C para extração de DNA ou a -80°C em tampão de lise *RLT lysis buffer* do kit de extração de ácidos nucleicos *RNeasy® Mini kit* (250) (Qiagen, Alemanha) acrescido de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA),

segundo orientações do fabricante, para extração de RNA. As amostras de PBMC coletadas foram denominadas pelas siglas PB01 até PB12, indicando a fonte de obtenção (sigla PB para sangue periférico, do inglês *peripheral blood*) seguido pelo número da amostra (por ordem de coleta).

4.2 Extração de ácidos nucleicos

4.2.1 Extração e quantificação de DNA e RNA totais

A extração do DNA total foi realizada com a utilização do kit *QIAamp® DNA Blood Mini Kit (250)* (Qiagen, Alemanha) e a de RNA total foi realizada com o kit *RNeasy® Mini kit (250)* (Qiagen, Alemanha), ambos seguindo as instruções do fabricante e partindo de um mínimo de 1×10^6 células e máximo de 5×10^6 .

Ao final da extração e eluição do DNA ou RNA em água livre de nucleases (Promega, EUA), estes foram quantificados no espectrofotômetro 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA). O mesmo espectrofotômetro forneceu também os valores das absorbâncias nas razões de comprimentos de onda A260/A280 e A260/A230, os quais foram utilizados para avaliar o grau de pureza das amostras. As amostras foram armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso.

4.3 Reação de Transcrição reversa (RT-PCR)

Foi utilizado o kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, EUA) para as reações de transcrição reversa. Em tubos de microcentrífuga com capacidade para 200 μL , foram adicionados 5,0 μL de tampão 10X, 4 μL de dNTPs Mix (100 mM), 5 μL de *random primers* (10X), 2,5 da enzima transcriptase reversa *multiscribe* (50 U/ μL), 0,15 μL de inibidor de RNase (*RNase Out*) (40 U/ μL), 1 μg de RNA total e volume final de 50 μL , utilizando água livre de nucleases (Promega, EUA). A reação foi misturada suavemente e transferida para o termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, EUA). A reação foi realizada inicialmente à temperatura de 25°C por 10 minutos, seguido por 37°C por 2 horas e por fim resfriamento a 4°C para preservação do material. Ao final do processo, o cDNA produzido foi armazenado em freezer a -20°C .

4.4 Expressão gênica por PCR em tempo real (qPCR)

As reações de qPCR foram realizadas no *7500 Real Time PCR ABI Prism Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA) utilizando sondas *TaqMan®* (Applied Biosystems, EUA) a partir dos cDNAs produzidos pelas reações de transcriptase reversa. As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 poços. Para cada reação foi utilizado 5,0 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (2x), 0,5 µL de sondas *TaqMan®* (20X) específicas para cada gene estudado, 2,0 µL de cDNA diluído 1:5 (v/v) e 2,5 µL de água livre de nucleases (Promega, EUA). Cada reação teve volume final de 10 µL.

O cálculo da expressão gênica teve como base o Ct (do inglês, *cycle threshold*), indicador do ciclo, durante a amplificação do cDNA, em que foi detectado aumento logarítmico na quantidade do gene analisado para cada amostra. Para a comparação da expressão de uma amostra com base na expressão de um calibrador, foi utilizado o cálculo por meio da fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo atribuído o valor igual a 1,0 para a amostra calibradora. Para a expressão em unidades relativas de expressão (URE) foi utilizada a fórmula $10000/2^{\Delta Ct}$.

Tabela 1. Sondas utilizadas nas reações de PCR em tempo real e respectivos genes alvo

Sonda/Gene	Característica
<i>POU5F1/OCT4</i>	Pluripotência
<i>NANOG</i>	Pluripotência
<i>SOX2</i>	Pluripotência
<i>CD34</i>	Progenitor hematopoético
<i>GYPB*03/GYPB*04 (Sistema MNS)</i>	Antígenos de sistemas sanguíneos
<i>FY*02N.01 (GATA)</i>	Antígenos de sistemas sanguíneos
<i>FY*01/FY*02 (Sistema Duffy)</i>	Antígenos de sistemas sanguíneos
<i>JK*01/JK*02 (Sistema Kidd)</i>	Antígenos de sistemas sanguíneos
<i>RHCE*02/RHCE*04 (Sistema RhEe)</i>	Antígenos de sistemas sanguíneos
<i>RHCE*03/RHCE*05 (Sistema RhCc)</i>	Antígenos de sistemas sanguíneos
<i>FBXL12</i>	Endógeno
<i>HPRT1</i>	Endógeno
<i>RNF7</i>	Endógeno

4.5 reação em cadeia da polimerase (PCR)

As reações de PCR para genotipagem foram realizadas no termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, EUA). Para a amplificação de cada amostra de DNA foram utilizados 2,5 µL de tampão 10X, 0,75 µL de MgCl₂ (100 mM), 2 µL de dNTPs (1,25 mM), 0,3 µL de enzima Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1 µL de *primer Kell Reverse* (2,5 pMol), 1 µL de *primer Kell Forward* (2,5 pMol), 100 a 300 ng/µL do DNA e água livre de nucleases (Promega, EUA) até um volume final de 25 µL. O programa de amplificação, de 35 ciclos foi planejado e executado da seguinte maneira: desnaturação à 94°C por 40 segundos, anelamento a 61,5°C por 50 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos.

4.6 detecção de polimorfismos no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

A técnica de RFLP foi realizada a partir da realização de reação de digestão enzimática das amostras de DNA previamente amplificadas pela técnica de PCR. As reações foram realizadas em um aparelho termociclador *GeneAmp® PCR System 9700* (Applied Biosystems, EUA).

Para a genotipagem dos antígenos do sistema Kell, K e celano, o preparo de cada amostra foi realizado da seguinte maneira: 5 µL de tampão NE Buffer 4 1X (Ipswich, EUA), 0,3 µL de enzima BsmI (Thermo Fisher Scientific, EUA) e 5 µL de produto de PCR. As reações ocorreram a 37°C por duas horas. As análises foram realizadas em gel de poliácridamida 16% corado com nitrato de prata.

4.7 Sorologia

A tipagem do grupo ABO assim como a detecção do antígeno D do sistema Rh foi realizada por sorologia pelo método da hemaglutinação, sendo utilizados anticorpos monoclonais anti-A e anti-B (Lorne, Reino Unido) e anti-D (Fresenius, Alemanha) conforme instruções do fabricante. A fenotipagem foi realizada por meio da utilização de cartões ID-System (Biorad, EUA) segundo instruções do fabricante. Todos os procedimentos de sorologia foram realizados no Laboratório de Imunohematologia do Hemocentro de Ribeirão Preto como parte do processo de rotina na identificação de antígenos eritrocitários dos

doadores de sangue cadastrados nesta instituição. Os dados provenientes destes procedimentos são armazenados no banco de dados SBS (Sistema de Banco de Sangue), um software online que armazena dados cadastrais e clínicos dos doadores de sangue do Hemocentro de Ribeirão Preto.

4.8 Experimentos pré-reprogramação celular

4.8.1 Cultivo de bactérias e extração de DNA plasmidial

As bactérias *Escherichia coli* da cepa STBL3 foram utilizadas para a propagação dos genes responsáveis pela indução de pluripotência clonados nos vetores episomais pEB-C5 (número de plasmídeo 28213, Addgene, EUA) e pEB-Tg (número de plasmídeo 28220, Addgene, EUA). A manutenção destas células se deu em placas de Petri contendo meio de cultura LB ágar (Thermo Fisher Scientific, EUA) na presença do antibiótico ampicilina (100 µg/mL) a 37°C. Uma das colônias clonadas com cada um destes plasmídeos foi cultivada em 150 mL de meio LB líquido (Thermo Fisher Scientific, EUA) na presença de antibiótico a 37°C sob agitação de 200 RPM por 16 horas.

Toda a suspensão celular foi centrifugada a 5200 x g por 15 minutos e 4°C, e o precipitado celular resultante foi utilizado para a extração de DNA plasmidial pelo kit *Quiafilter Plasmid Midi and Maxi kits* (Qiagen, Alemanha), segundo as instruções do fabricante. O espectrofotômetro 2000c (Thermo Fisher Scientific, EUA) foi utilizado para a quantificação do DNA plasmidial.

4.8.2 Produção e cultivo de fibroblastos de embriões murinos (MEFs)

Após 12,5 dias do cruzamento entre camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem C57BL/6J, foi possível obter fêmeas prenhes carregando de 5 a 8 fetos. As fêmeas foram sacrificadas com uma dose letal de Tiopental (150 mg/kg) via intraperitoneal, após um minuto de uma injeção de anestésico lidocaína 1% (5 mg/kg). Em ambiente estéril a pele e o peritônio dos animais foram rompidos e o útero contendo os fetos removido.

Cada feto teve seu baço, fígado e cabeça removidos e o restante foi macerado manualmente em porções pequenas o quanto possível, de modo a facilitar a ação da tripsina,

que juntamente com a homogeneização e incubação a 37°C alternados foi responsável pela dissociação das células ali presentes. A tripsina foi inativada utilizando-se o meio de cultura DMEM 10% SFB (meio de cultura para MEF) e as células isoladas por meio de centrifugação a 500 x g por 10 minutos, de modo que o precipitado celular foi homogeneizado em meio de cultura fresco. A suspensão celular resultante foi plaqueada em garrafas de cultura tratadas previamente com gelatina 1% (Stemcell, Canadá). Após expansão da cultura até a primeira ou segunda passagem, estes fibroblastos foram congelados em meio de congelamento composto por SFB e 10% de DMSO para utilização durante o protocolo de reprogramação.

4.9 Reprogramação celular

4.9.1 Expansão das PBMCs e transfecção

As alíquotas de PBMC contendo 1×10^7 células foram descongeladas e então cultivadas e expandidas em meio para enriquecimento de células mononucleares (MNC), o qual é constituído de StemSpan (Stemcell, Canadá) suplementado com as citocinas SCF (0,1 µg/mL), IL-3 (10 ng/mL), IGF-1 (40 ng/mL), EPO (2 U/mL) (Peprotech, EUA) por 14 dias a 37°C e 5% de CO₂. O cultivo nestas condições favorece a expansão de células sanguíneas da linhagem eritroide em detrimento das demais células mononucleares, portanto enriquecendo esta população específica de células. A nucleoporação da população de células enriquecidas foi realizada no sistema *Nucleofector™ 2b device* (Lonza, Suíça) com o plasmídeo episomal pEB-C5, expressando cinco fatores de reprogramação: OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC e LIN28. As células foram nucleoporadas simultaneamente com o plasmídeo episomal pEB-Tg expressando o *SV40 large T antigen* para aumentar a eficiência de reprogramação. As células nucleoporadas foram plaqueadas e cultivadas em meio MNC por 2 dias.

4.9.2 Descongelamento de MEFs

Os descongelamentos foram realizados rapidamente, transferindo as ampolas criogênicas que estavam no contêiner de nitrogênio líquido para o equipamento de banho-maria a 37°C. As células foram coletadas e transferidas para um tubo cônico de 15 mL, ao

qual foram adicionados 9 mL de meio de cultura para MEF. As colônias foram centrifugadas a 200 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi aspirado e descartado e o precipitado celular foi suspenso em meio de cultura fresco. As células foram plaqueadas na densidade de 3×10^6 células em garrafas de cultura de 75 cm² ou 5×10^5 células em placas de 35 mm, ambas revestidas previamente com gelatina 1% (Stemcell, Canada).

4.9.3 Inativação de MEFs

Os MEFs até a terceira passagem utilizados durante o protocolo de reprogramação foram mitoticamente inativados. Para a inativação $5,0 \times 10^5$ destas células foram plaqueadas em poços de 35 mm de placas de cultura com 6 poços em meio de cultura para MEF. No dia seguinte, estas células foram tratadas com mitomicina (10mg/mL) durante três horas, a 37°C. Por fim as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) por três vezes para remover a mitomicina e mantidas em meio de cultura para MEF até o momento de sua utilização.

4.9.4 Cultivo das células transfectadas sobre MEFs e surgimento das hiPSC

Após este período de recuperação, as células foram plaqueadas sobre MEFs, e o meio de cultura utilizado foi o DMEM (Life Technologies, EUA) suplementado com 10% de SFB (GE Healthcare, EUA) (meio MEF) por 24 horas. No dia seguinte o DMEM 10 % foi substituído por meio para células embrionárias (ESCM) composto por DMEM (Life Technologies, EUA), 20% v/v de KOSR (Life Technologies, EUA), 1% v/v de Glutamax (Gibco, EUA), 1% v/v de NEAA (Gibco, EUA), 2-mercaptoetanol (Thermo Fisher Scientific, EUA), 1% v/v de anti-anti (Thermo Fisher Scientific, EUA), bFGF (5 µg/mL) e butirato de sódio (0,25 mM) (Sigma-Aldrich, EUA). Do dia +9 ao dia +14 o meio ESCM é condicionado sobre MEFs inativadas por 24 horas (meio ESCM condicionado), e passa a ser utilizado para as trocas de meio das células em co-cultivo em dias alternados até o momento do primeiro repique e transição para condições de cultivo de células-tronco pluripotentes (CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES). Um resumo do processo de geração de hiPSCs pode ser visualizado na Figura 1.

Figura 1. Resumo do processo de geração de hiPSCs.

4.10 Mudança para condições de cultivo de células-tronco pluripotentes (CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES)

As células transfectadas e em co-cultivo com os MEF, deram origem a aglomerados de células com morfologia semelhante à de células embrionárias, chamadas de *hiPSC-like*. Estas foram transferidas por meio de repique para placas de cultura contendo 6 poços de 35 mm (Corning, EUA) revestidas com a matriz proteica específica para cultivo de CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTESs, Geltrex® (Life Technologies, EUA) e meio de cultura mTeSR™1 (Stem Cell Technologies, EUA). O meio de cultura foi trocado diariamente e suplementado, com exceção de dias de repique, com butirato de sódio (0,25mM), um inibidor da enzima histona deacetilase e promotor da transcrição gênica.

4.11 Cultivo de células-tronco pluripotentes (CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTESs)

4.11.1 Preparo de Geltrex®

O Geltrex® foi utilizado para revestir as placas de cultura nas quais foram cultivadas as CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES. O Geltrex® em alíquotas é armazenado a -20°C em estado sólido e é descongelado no momento do uso tornando-se líquido. Este reagente foi manipulado em gelo e com materiais previamente resfriados evitando a polimerização

precoce do mesmo. O Geltrex® foi diluído em meio de cultura DMEM/F12 gelado (100 uL de Geltrex® puro em 9,9 mL de meio diluente) e distribuídos à placa (1 mL/poço de 35 mm) ou armazenados a 4°C por até uma semana. As placas com Geltrex® foram incubadas a 37°C por 1 hora no mínimo antes do uso.

4.11.2 Repique das colônias iniciais e repiques para expansão da cultura

Para a realização dos repiques (também chamados de passagens) as células foram deixadas em contato direto com a solução de EDTA 0,5 mM (Merck, USA) por 2 minutos, a qual foi em seguida removida para a adição de meio de cultura mTeSR (Stemcell, Canadá) e fragmentação das colônias. Os fragmentos em suspensão foram transferidos para novas placas de cultura tratadas com Geltrex®, permitindo a realização de cultura na condição *feeder-free*, ou seja, na ausência ou independentemente de células alimentadoras, neste caso as MEFs. Durante o repique dos aglomerados iniciais, as colônias surgidas sobre as MEFs foram fragmentadas seletivamente, com a ajuda de um microscópio embutido em uma capela de fluxo laminar horizontal e ponteiros de micropipetas.

A partir do momento do estabelecimento das hiPSCs em cultivo *feeder-free*, para todas as passagens subsequentes foram utilizadas pipetas sorológica de 5 mL para fragmentar as colônias, agora de maneira não seletiva com vistas a expansão da cultura. As colônias foram mantidas em Geltrex® por no máximo sete dias, segundo orientações do fabricante, sendo repicadas e transferidas para um novo poço dentro deste período.

4.11.3 Criopreservação das células pluripotentes

A partir da suspensão dos fragmentos de colônia em meio de cultura fresco, como descrito para os repique, também foi realizado o congelamento destas células. Para isso foi acrescentada em igual proporção à suspensão de fragmentos de colônias, uma solução de congelamento composta por soro fetal bovino (SFB) inativado e 20% v/v de DMSO (Sigma-Aldrich, EUA) e também o composto ROCK Inhibitor (Y-27632) na concentração final de 10 µM. A suspensão celular em conjunto com a solução de congelamento foi transferida para uma ampola criogênica *Corning® cryogenic vial* (Corning, EUA) e inserida no dispositivo *Mr. Frosty™ Freezing Container* (Thermo Fisher Scientific, EUA) preenchido com isopropanol (4 °C) o qual permite a diminuição da temperatura próximo à razão de 1°C/minuto até atingir -

80°C. Após 24 horas as células foram transferidas para contêineres de nitrogênio líquido para armazenagem de longo prazo a 196°C.

4.11.4 Descongelamento de CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTESs

Os descongelamentos foram realizados rapidamente, transferindo as ampolas criogênicas que estavam no contêiner de nitrogênio líquido para o equipamento de banho-maria a 37°C. Em seguida foi utilizado meio mTeSRTM1 acrescido de *ROCK Inhibitor* (Y-27632) na concentração final de 10 µM para recolher todo o conteúdo celular e transferir para um tubo cônico de 15 mL. As colônias foram centrifugadas a 200 xg por 4 minutos, o sobrenadante foi aspirado e descartado e o precipitado celular foi suspenso em meio mTeSRTM1 acrescido de *ROCK Inhibitor* (Y-27632) na concentração final de 10 µM. As colônias foram plaqueadas em placas de cultura previamente tratadas com Geltrex®.

4.12 Caracterização das hiPSCs geradas

4.12.1 Genotipagem de alta eficiência utilizando o HEA BeadChipTM

Cerca de 200 ng de DNA total extraído das linhagens de hiPSC PB02 e PB12 foi utilizado para a realização de uma PCR multiplex 1X tampão de PCR (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 3.5 mM MgCl₂, 200 µmol de cada dNTP HEA eMAP PCR Mix) e 5,0 U de Hot Start *Taq* DNA polimerase, e um total de 25 µL de volume final. O programa de amplificação, de 35 ciclos, foi planejado e executado da seguinte maneira: desnaturação à 94°C por 20 segundos, anelamento a 62,0°C por 20 segundos e extensão a 72°C por 20 segundos. A solução *ExoSAPIT* foi adicionada no produto de PCR amplificado para remoção de excesso de *primers* e dNTP. Após a limpeza do produto de PCR, este foi tratado com 0,5 U de exonuclease λ em uma incubação a 37°C por 25 minutos seguida de outra a 75° por 10 minutos, com o objetivo de se obter fitas simples de DNA. Uma alíquota do produto de PCR composto por DNA em fita simples é adicionada à uma solução contendo 3U da enzima *Thermo sequenase*, 1X tampão da enzima e 1 µmol de cada dNTP (dCÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES marcada com *beads* - moléculas magnéticas que emitem fluorescência). Em cada *BeadChip*TM, é adicionado um volume de 15 µl desta mistura. A hibridização do DNA

às sondas presentes nas lâminas contendo os chips é realizada em uma incubação a 53°C por 15 minutos. A extensão das fitas de DNA é então realizada por meio da ação da enzima *thermo sequenase*, a qual adiciona dNTPs capazes de emitir fluorescência à cada nova fita de DNA formada. A aquisição das imagens, análise dos dados e interpretação dos resultados é realizado de maneira automática pelo sistema *Array Imaging System (AIS) 400* (BioArray Solutions, EUA). Este sistema identifica cada lâmina por um código de barras e as informações da mesma são captadas pelo microscópio de fluorescência acoplado a uma câmera fotográfica, e por fim são interpretados pelo software *Web-Based Human Erythrocyte antigen and Hemoglobinopathy Analysis (wHEA™)* (BioArray Solutions, EUA). Esta análise foi realizada pelo Laboratório de Pesquisa em Biologia Molecular de Grupos Sanguíneos, da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), coordenado pela Profa. Dra. Lilian Castilho.

4.12.2 Análises imunofenotípicas por citometria de fluxo

A marcação intracelular foi realizada a partir da desagregação das colônias de células pluripotentes pela ação da enzima *StemPro® Accutase Cell Dissociation Reagent* (Life Technologies, EUA) para que as células ficassem individualizadas. Para cada experimento utilizando até quatro anticorpos diferentes foram marcadas 1×10^5 células suspensas em solução de PBS. Foi adicionado 1000 µL de tampão de lise celular em cada tubo contendo a suspensão de células. Após lavagem (adição de PBS 1x e centrifugação por 3 minutos e 300 x g) das células foi adicionada 300 µL de solução de permeabilização para cada amostra. Após lavagem, os anticorpos monoclonais (Becton Dickinson, EUA) e o isotipo controle foram adicionados aos respectivos tubos e incubados por 15 minutos no escuro. Após nova lavagem, o precipitado celular formado foi homogeneizado em 200 µL PBS 1x para análise no citômetro *FACSCalibur™* (Becton Dickinson, EUA).

Para a realização da marcação de antígenos na membrana celular 1×10^5 células foram utilizadas para a análise de um máximo de quatro anticorpos simultaneamente. As amostras foram incubadas por 15 minutos em ambiente escuro, lavadas com PBS e posteriormente homogeneizadas com 200 µL de PBS para aferimento no citômetro *FACSCalibur™* (Becton Dickinson, EUA).

Tabela 2. Anticorpos utilizados nos experimentos de imunofenotipagem.

Nome do antígeno/clone	Localização do antígeno	Característica do marcador
CD3 (UCHT1)	Membrana celular	Hematopoético
CD4 (RPA-T4)	Membrana celular	Hematopoético
CD8 (RPA-T8)	Membrana celular	Hematopoético
CD14 (M5E2)	Membrana celular	Hematopoético
CD34 (8G12)	Membrana celular	Hematopoético
CD45 (2D1)	Membrana celular	Hematopoético
CD71 (M-A7126)	Membrana celular	Hematopoético
CD235a (GA-R2(MIR2))	Membrana celular	Hematopoético
OCT4 (40/OCT-3)	Intracelular	Pluripotência
SOX2 (245610)	Intracelular	Pluripotência
NANOG (N31-355)	Intracelular	Pluripotência
TRA-1-60 (TRA-1-60)	Membrana celular	Pluripotência
SSEA4 (MC813-70)	Membrana celular	Pluripotência

4.12.3 Análise imunocitoquímica por fluorescência

O preparo do material para análise se deu inicialmente pelo repique de colônias pluripotentes sobre lamínulas de vidro de 13 mm estéreis (GoldLab, Brasil), tratadas previamente com Geltrex®. Após 24 horas, as colônias foram fixadas com paraformaldeído 4% (Merck, EUA) em solução PBS por 20 minutos. Posteriormente as células foram incubadas por 1 hora com solução de Triton-X a 0,3% para permeabilização. As células foram bloqueadas por 1 hora em albumina de soro bovino (BSA) na concentração de 5% e 2% de soro de cabra em solução de PBS. Cada uma das lamínulas foi incubada com o respectivo anticorpo primário, anti-Oct4 (Cat#561555), anti-Sox2 (Cat#561469) e anti-Nanog (Cat#560109) (Becton Dickinson, EUA) por duas horas. Os anticorpos primários foram removidos por lavagem e então as lamínulas foram incubadas com 2 mg/mL do anticorpo secundário Alexa 488 anti-mouse (Cat# A-21202 Thermo Fisher Scientific, EUA). As amostras foram tratadas com DAPI (Vysis, EUA) para a marcação dos núcleos das células. Após a secagem de cerca de 24 horas, seguiu-se a análise no microscópio.

As células foram visualizadas utilizando microscopia confocal de escaneamento a laser LSM 710 (Carl Zeiss, Alemanha) com lentes objetivas de até 20x de aumento e objetivas de 63x em óleo de imersão. Um laser de argônio de 488 nm foi utilizado para excitar os anticorpos secundários e a emissão foi medida a 525 nm. A visualização do espalhamento da

luz para o comprimento de onda específico foi gravada no modo *multitracking* usando canais de detecção distintos. A análise das imagens foi realizada usando o software ZEN2008 (Carl Zeiss, Alemanha). O controle e imagens de imunofluorescência geradas foram capturadas usando configurações idênticas.

4.12.4 Ensaio de formação de teratomas

Para este ensaio, foi realizada a dissociação celular utilizando a enzima *Accutase*TM por 5 minutos a 37°C para cada poço contendo células. Foram ressuspensas aproximadamente 2×10^6 células em uma mistura de 90 µL de *Matrigel*TM *High Concentration* (Corning, EUA) e 210 µL de solução de PBS para cada injeção. No total foram realizadas três injeções, uma em cada animal imunosuprimido. Foram utilizados quatro camundongos (NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJ), machos e com 8 semanas de idade, provenientes do biotério geral da USP de Ribeirão Preto, sendo que três deles receberam as células e um deles apenas solução PBS.

A cirurgia para remoção dos teratomas foi realizada com o animal sob efeito do anestésico isoflurano, em uma câmara adequada e depois com a ajuda de um dispositivo que se adapta ao focinho. Em ambos os casos a oxigenação se manteve a 2L de oxigênio por minuto e 2 a 3 % de isoflurano. Os pelos ao redor do local da incisão foram raspados e a região foi limpa com solução contendo iodo e depois com etanol 70%. A incisão no local de crescimento dos teratomas foi realizada com a ajuda de uma tesoura cirúrgica, e então foram retirados e armazenados em etanol 70%, assim mantidos até o momento da realização do processamento histológico das amostras.

4.12.5 Análise histológica do teratoma por imunohistoquímica

Os teratomas extraídos dos camundongos foram incluídos em parafina e os blocos resultantes foram processados em micrótomo rotativo (Leica, Alemanha), o qual gerou cortes de (5 µm) de espessura. Foram preparados três cortes sobre cada lâmina de vidro de microscopia para análise pela técnica de imunohistoquímica (IHC), utilizando o kit *Universal LSAB2 System-HRP* (Dako, EUA). Os anticorpos utilizados foram Alpha-1-fetoproteína (Dako, EUA), nestina (ABCam, Reino Unido); α-SMA (Sigma-Aldrich, EUA).

4.12.6 Análise quantitativa da pluripotência e do potencial de diferenciação

Foram analisadas células hiPSC PB12 mantidas em cultura de modo habitual em colônias e em suspensão no formato de corpos embrioides com sete dias de formação. Esta análise se deu pela utilização do kit *TaqMan® hPSC Scorecard™ Panel*, que consiste em uma plataforma própria para análise por qPCR pronta para uso, contendo um painel de 94 genes, 9 relacionados à manutenção da pluripotência, 74 de diferenciação linhagem específica (endoderme, ectoderme e mesoderme) e 10 de endógenos e controles. Este kit foi utilizado segundo as instruções do fabricante no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System*, e os dados obtidos a partir das reações de qPCR foram analisados pelo *software online hPSC Scorecard™ Analysis software*. Os resultados foram descritos em um relatório final disponibilizado pelo *software* de análise em formato pdf.

4.13 Diferenciação hematopoética

4.13.1 Adaptação celular para a diferenciação hematopoética

Antes do início da diferenciação foi necessário adaptar as hiPSCs em cultura ao repique enzimático, de modo que as propriedades de formação de colônias e formações de corpos embrioides fossem mantidas mesmo após a individualização celular. Para isso, a cada repique foi utilizada a *StemPro® Accutase Cell Dissociation Reagent* (Life Technologies, EUA) para individualizar as células que foram plaqueadas numa densidade celular de 1×10^5 células por poço (placas de cultura de 6 poços) em 3 mL de meio de cultura mTSeR (Stemcell, Canadá) suplementado com 3 μ L/mL de *Rock inhibitor* (Y27632 - Stemcell, Canadá). A avaliação desta adaptação se deu pela observação da morfologia das colônias após adaptação e também a capacidade de formação de corpos embrioides.

4.13.2 Primeiro estágio de diferenciação hematopoética - Protocolo 1

Antes do início da diferenciação foi necessário adaptar as células hiPSC PB02 em cultura ao repique enzimático. Para isso, a cada repique foi utilizada a *StemPro® Accutase*

Cell Dissociation Reagent (Life Technologies, EUA) para individualizar as células que foram plaqueadas numa densidade celular de 1×10^5 células por poço (placas de cultura de 6 poços) em 3 mL de meio de cultura mTSeR (Stemcell, Canadá) suplementado com $3 \mu\text{L/mL}$ de *Rock inhibitor* (Y27632 - Stemcell, Canadá).

Com as hiPSCs já adaptadas foi iniciado o protocolo de diferenciação, de modo que 3×10^3 células iPS PB02 individualizadas foram transferidas para cada um dos 60 poços centrais (os 36 poços das bordas foram preenchidos com solução PBS para evitar o ressecamento dos poços centrais) de uma placa de cultura de 96 poços *round bottom* (Corning, EUA). As células estavam em meio de diferenciação *Stemdiff* (Stemcell, Canadá) suplementado com as citocinas recombinantes humanas para a indução do primeiro estágio da diferenciação (mesoderme hematopoética): VEGF (40 ng/mL), SCF (40 ng/mL), BMP4 (40 ng/mL) e b-FGF (10 ng/mL) (todas da Peprotech, EUA). A placa foi submetida à centrifugação e incubada a 37°C e 5% de CO_2 para a formação de corpos embrioides (dia 0).

4.13.3 Primeiro estágio de diferenciação hematopoética - Protocolo 2

Este protocolo consiste em uma atualização do Protocolo 1 com algumas modificações pontuais, como a utilização de 5×10^3 células iniciais para a formação de cada corpo embrioide e a adição da citocina TPO (10 ng/mL) (Peprotech, EUA) no dia +11 de experimento.

4.13.4 Ensaio de células formadoras de colônias em metilcelulose

As células provenientes dos dois protocolos de diferenciação hematopoética foram utilizadas para a realização de experimentos de células formadoras de colônias (CFC), no qual foi empregado o meio de cultura semi-sólido rico em citocinas hematopoéticas Methocult™ (Stemcell, Canadá). Foram utilizadas células dos corpos embrioides (hiPSC PB02), dissociados pela ação da enzima *StemPro® Accutase Cell Dissociation Reagent* (Life Technologies, EUA) e também células que se encontravam dispersas no sobrenadante, e que proliferavam ao redor dos corpos embrioides.

5 Resultados

5.1 Escolha das amostras para reprogramação celular

5.1.1 Genotipagem eritrocitária

A genotipagem foi realizada a partir do DNA total extraído das PBMCs correspondentes às amostras PB01 a PB11, por meio de técnicas moleculares previamente descritas. Foi realizada também uma reação de PCR-RFLP (do inglês, *restriction fragment length polymorphism*) para análise dos antígenos do sistema Kell, K e celano, para as amostras PB01 a PB06 (Figura 2). Segundo esta figura, K está ausente nas amostras analisadas.

Figura 2. Genotipagem do sistema Kell. No gel de poliacrilamida, os números nas colunas representam a amostra de PB analisada e M representa o marcador de peso molecular (1kb). Bandas de 157 bp indicam a presença do antígeno de alta frequência k (celano). A presença do antígeno K (Kel) seria indicada por bandas com tamanho de 100 bp.

Para o processo de genotipagem, foram considerados antígenos eritrocitários de grande importância clínica, devido a sua elevada capacidade de indução de aloimunização durante as transfusões de sangue, os quais são apresentados a seguir: Rh (E,e,C,c); Kell (K e celano (k)); MNS (S,s); Kidd (Jk^a,Jk^b) e Duffy (Fy^a,Fy^b). Os resultados estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Tipagem ABO e genotipagem eritrocitária de voluntários doadores de amostras de células somáticas. Origem das amostras: do 1 ao 6, punção venosa; do 7 ao 11, câmara de leucorredução (LRS).

ID/Sistema sanguíneo	ABO e RhD	Rh (E,e,C,c)	Kell (K, k)	MNS (S,s)	Kidd (Jk ^a ,Jk ^b)	Duffy (Fy ^a ,Fy ^b)	Duffy (GATA)
PB 01	O+	eeCC	K0,k	ss	Jkb	Fya/Fyb	Selvagem
PB 02	O-	eecc	K0,k	ss	Jkb	Fya/Fyb	Selvagem
PB 03	O+	eeCc	K0,k	ss	Jkb	Fyb	Selvagem
PB 04	A+	EEcc	K0,k	Ss	Jka/Jkb	Fya	Selvagem
PB 05	A+	eeCc	K0,k	Ss	Jka/Jkb	Fyb	Selvagem
PB 06	O+	EeCc	K0,k	Ss	Jkb	Fya/Fyb	Selvagem
PB 07	B+	ee**	*	ss	Jkb	Fya	Selvagem
PB 08	A+	ee**	*	ss	Jka	Fyb	Selvagem
PB 09	O+	**CC	*	Ss	Jka/Jkb	Fya	Selvagem
PB 10	O-	eecc	*	ss	Jka/Jkb	Fya	Selvagem
PB 11	O+	Eecc	*	ss	Jka/Jkb	Fyb	Selvagem

Legenda: (+/-) presença ou ausência do antígeno D do sistema Rh; (K0) antígeno K do sistema Kell está ausente; (k) presença do antígeno celano; (*) indeterminado.

Considerando estes resultados, a amostra PB02 foi escolhida para a continuidade dos experimentos não só por possuir um PAE com baixa imunogenicidade, mas também devido a maior facilidade em se obter amostras de PB, em comparação às de LRC. Apesar de coletadas e genotipadas, as amostras obtidas das LRCs não foram utilizadas. Amostras advindas das LRCs são mais difíceis de se obter, por se tratar de um método mais invasivo, o que restringiria a possibilidade de obtenção das amostras no futuro. Este método de obtenção de PBMCs, portanto, foi descartado.

5.1.2 Fenotipagem eritrocitária

Com o objetivo de otimizar a coleta de amostras, foram realizadas pesquisas sobre o PAE dos doadores antes da coleta das mesmas. O perfil desejado de uma amostra foi estipulado e submetido a buscas no banco de dados SBS, o qual é composto por resultados de fenotipagem de amostras coletadas dos doadores rotineiramente no laboratório de sorologia do Hemocentro de Ribeirão Preto. O cruzamento dos dados revelou uma lista de doadores disponíveis com o PAE estipulado, e estes foram convidados a participar desta pesquisa. A amostra PB12 foi obtida desta maneira.

O SBS foi utilizado também com o objetivo de complementar as informações disponíveis acerca da amostra genotipada PB02, uma vez que haviam disponíveis

informações mais completas sobre o PAE deste doador neste sistema. O perfil fenotípico destas amostras está descrito na Tabela 4.

Tabela 4. PAE das amostras escolhidas para reprogramação: PB02 e PB12.

Amostra	PAE
PB12	O (ABO); C0, E0, c+, e+, cw0 (Rh); K0, kpa0 (Kell); S0, s+ (MNS); Jka+, Jkb0 (Kidd); Fya0, Fyb0 (Duffy); Dia0 (Diego); Lea0, Leb0 (Lewis).
PB02	O (ABO); C0, E0, c+, e+ (Rh); K0, kpa+ (Kell); M+, N+, S0, s+ (MNS); Jka0, Jkb+ (Kidd); Fya+, Fyb+ (Duffy); Lea+, Leb0 (Lewis).

Legendas: +/-: presença ou ausência respectivamente do antígeno indicado; O sistema sanguíneo ao qual pertencem os antígenos está indicado entre parênteses.

O sistema SBS facilitou a busca por doadores com fenótipos de interesse para a coleta de amostras, uma vez que permitiu encontrar doadores com o fenótipo desejado mais facilmente e forneceu dados mais completos sobre o PAE de cada amostra coletada.

5.2 Geração e estabelecimento das linhagens de hiPSCs

5.2.1 Propagação e extração do DNA plasmidial (vetores pEB-C5 e pEB-Tg)

Os genes codificadores dos fatores de transcrição responsáveis pela reprogramação celular (OSKM + Lin28) clonados no plasmídeo pEB-C5, foram propagados em cultivo de células bacterianas da cepa STBL3, assim como o plasmídeo pEB-Tg. Ambos os plasmídeos foram obtidos por meio de extração de DNA plasmidial e então quantificados.

5.2.2 Expansão e enriquecimento da população de progenitores mieloides

Antes da transfecção das amostras PB02 e PB12, a população celular de cada uma delas foi expandida em cultura sob a influência de citocinas específicas. Este tratamento objetivou o aumento na proporção de células progenitoras da linhagem mieloide e diminuição da linfóide, ou seja, um enriquecimento populacional celular. Por meio de imunofenotipagem em citometria de fluxo foi possível acompanhar a mudança na expressão de marcadores de superfície

característicos de determinados tipos celulares, refletindo as alterações populacionais. Este acompanhamento foi realizado apenas para a amostra PB12, uma vez que não haviam células da PB02 suficientes no momento de sua reprogramação, e sua utilização inviabilizaria a continuidade da expansão desta amostra e consequentemente sua reprogramação. O gráfico ilustrado na Figura 3 mostra a diferença obtida no perfil de expressão de marcadores pelas células em cultura no início da expansão (dia +3) e no seu final (dia +12).

Figura 3. Perfil de expressão de marcadores hematopoéticos durante a expansão das PBMCs. A expressão de marcadores hematopoéticos foi avaliada no dia +3 (preto) e no dia +12 (cinza) de expansão celular em cultura. As barras indicam a porcentagem de células expressando cada marcador.

A população celular predominante no início da expansão era composta por linfócitos T CD3, CD4 e linfócitos B marcados pelo CD19, e uma proporção muito menor de células expressando marcadores característicos de linhagens mieloides, como o CD71 e CD235a. Este perfil se inverte ao final do período de expansão, quando a população presente expressa majoritariamente CD71 e CD235, característicos de eritroblastos, mas também de células mieloides maduras, como os reticulócitos e as hemácias.

5.2.3 Reprogramação da amostra PB02

A reprogramação das $1,2 \times 10^7$ células da amostra PB02 (Figura 4A), após expansão sob efeito de citocinas e transfecção dos plasmídeos episomais pEB-C5 e pEB-Tg, originou 4 agregados celulares com características morfológicas semelhantes às de colônias de células

pluripotentes, uma delas mostrada na Figura 4B. As quatro colônias de células foram repicadas ao mesmo tempo, por este motivo misturadas, e então plaqueadas em um mesmo poço de uma placa de cultura, em condições próprias para expansão.

As colônias iniciais, logo após o primeiro repique, apresentaram regiões centrais escurecidas, de tonalidade amarelada (Figura 4C). Entretanto, isto não impediu o crescimento das porções periféricas (com tonalidade normal, aparentemente em estado indiferenciado), as quais foram selecionadas criteriosamente, pois foram consideradas as mais promissoras. O critério utilizado foi essencialmente baseado na morfologia da colônia e na tonalidade por ela apresentada, sendo preferidas aquelas que se mostraram visualmente como típicas hESCs. Foi observada uma ligeira recuperação e manutenção da tonalidade após poucos dias de cultivo, favorecida pelos repiques seletivos. A expansão da cultura (Figura 4D) permitiu o estabelecimento, ou seja, manutenção em estado indiferenciado da linhagem hiPSC PB02 *like* (do inglês, semelhante a hiPSCs, parecida com hiPSCs), chamada desta forma pois ainda seria caracterizada como uma verdadeira hiPSC.

Figura 4. Reprogramação da amostra PB02. (A) População celular resultante da expansão dos PBMCs da amostra PB02, imediatamente antes da transfecção; (B) Surgimento de agregado de células sobre MEFs (células de perfil alongado e morfologia fibroblastoide ao redor do referido agregado celular); (C) Agregados celulares aderidos na ausência de células alimentadoras (MEFs) após primeiro repique, que cresceram e se fundiram; (D) Expansão dos agregados celulares na ausência de células alimentadoras.

5.2.4 Reprogramação da amostra PB12

A reprogramação da amostra PB12 foi iniciada a partir de $1,4 \times 10^6$ células nucleoporadas (Figura 5A) e após 14 dias de co-cultivo sobre MEFs observou-se o surgimento de apenas um agregado celular (Figura 5B). A cultura desta célula foi iniciada e expandida a partir desta única colônia, garantindo a homogeneidade genética desta cultura durante as passagens subsequentes. Não foram observadas em nenhum momento regiões escurecidas ou com tonalidade amarelada após a primeira passagem (Figura 5C), mantendo-se com morfologia similar à de hESCs (Figura 6A e B) mesmo após alguns dias de expansão da cultura (Figura 5D).

Figura 5. Reprogramação da amostra PB12. (A) População celular resultante da expansão dos PBMCs da amostra PB12, imediatamente antes da transfecção; (B) Surgimento de agregado de células sobre MEFs (células de perfil alongado e morfologia fibroblastoide ao redor do referido agregado celular); (C) Agregados celulares aderidos na ausência de células alimentadoras (MEFs) após primeiro repique; (D) Expansão dos agregados celulares na ausência de células alimentadoras.

Foi observado que ambas amostras reprogramadas deram origem a colônias de células com morfologia similares às hESCs expandidas em cultura, ou seja, reduzido tamanho celular, núcleo grande em relação ao citoplasma, crescimento em colônias homogêneas e com bordas bem definidas de cor clara. (Figura 6A e B).

Figura 6. Colônias de hESCs em cultura. (A) hESC H1 P51. Barra de referência de 500 µm **(B)** hESC H9 P28. Barra de referência de 200 µm.

5.3 Caracterização da hiPSCs geradas

5.3.1 Genotipagem de alta eficiência utilizando o HEA BeadChip™

As hiPSCs PB02 P12 e PB12 P23 tiveram seu PAE determinado de maneira extensa por meio da genotipagem de alta-capacidade proporcionada por esta técnica. Os resultados ilustrados na Tabela 5 revelam o fenótipo deduzido destas células a partir da determinação do genótipo pela leitura da fluorescência e cálculos realizados pelo software wHEA™. O PAE das duas linhagens se manteve, portanto, após a reprogramação das amostras de PBMCs e a expansão em cultura das hiPSCs. Além disso, de posse destas informações, foi possível dar início ao estabelecimento de um banco de hiPSCs com PAE conhecido e de interesse para transfusões sanguíneas, a partir da criopreservação destas células.

Tabela 5. Dedução do fenótipo das hiPSCs PB02 P12 e PB12 P23

Sistema sanguíneo	Antígeno	hiPSC PB02	hiPSC PB12
Rh	c	+	+
	C	0	0
	e	+	+
	E	0	0
Kell	K	0	0
	k (celano)	+	+
	Kpa	+	0
	Kpb	+	+
	Jsa	0	0
	Jsb	+	+
Kidd	Jka	0	+
	Jkb	+	0
Duffy	Fya	+	0
	Fyb	+	0
MNS	M	0	0
	N	+	+
	S	0	0
	s	+	+
Lutheran	Lua	0	0
	Lub	+	+
Diego	Dia	0	0
	Dib	+	+
Colton	Coa	+	+
	Cob	+	0
Dombrock	Doa	0	0
	Dob	+	+
	Joa	+	+
	Hy	+	+
Landsteiner-Wiener	LWa	+	+
	LWb	0	0
Scianna	Sc1	+	+
	Sc2	0	0
Hemoglobin S	Hbs	0	0

Legenda: (+/0) presença ou ausência respectivamente do antígeno indicado.

5.3.2 Expressão gênica por qPCR

A expressão dos genes de pluripotência NANOG, OCT4 e SOX2 foi analisada por meio de qPCR, para as linhagens hiPSC PB02 P16 (Figura 7) e hiPSC PB12 P9 (Figura 8). Em

ambos os casos as PBMCs dos respectivos doadores não transfectadas assim como hESCs H1 P50 foram utilizadas para comparação dos níveis de expressão dos genes de pluripotência. As reações de expressão partiram de cDNAs transcritos a partir de 1µg de RNA de cada um dos tipos celulares. Com base na reação de amplificação por PCR em tempo real destes cDNAs e nos respectivos CTs (do inglês, *cycle threshold*), a expressão gênica foi calculada em relação à expressão da amostra calibradora, pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Na análise dos três genes de pluripotência, as amostras calibradoras utilizadas foram as respectivas PBMCs (PB02 e PB12), a elas sendo atribuído o valor de expressão igual a 1,0.

Figura 7. Análise da expressão de genes relacionados à pluripotência para caracterização da hiPSC PB02 P16. A expressão dos genes OCT4, SOX2 e NANOG foi avaliada em conjunto para cada um dos tipos celulares, PBMC PB12, hiPSC PB12 e H1 P50. As barras indicam os níveis de expressão de cada um dos genes ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) em relação à expressão destes pelas células PBMC PB02 P16 (valor igual a 1,0) utilizadas como calibradoras.

Figura 8. Análise da expressão de genes relacionados à pluripotência para caracterização da hiPSC PB12 P9. A expressão dos genes OCT4, SOX2 e NANOG foi avaliada em conjunto para cada um dos tipos celulares, PBMC PB12, hiPSC PB12 P9 e H1

P50. As barras indicam os níveis de expressão de cada um dos genes ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) em relação à expressão destes pelas células PBMC PB12 (valor igual a 1,0) utilizadas como calibradoras.

5.3.3 Análise imunofenotípica por citometria de fluxo

As hiPSC iPS PB02 e hiPSC PB12 foram cultivadas respectivamente por 7 e 9 passagens até a dissociação celular enzimática. As células individualizadas resultantes foram submetidas à avaliação da expressão de marcadores de pluripotência e hematopoéticos por meio de citometria de fluxo, e comparadas com as células embrionárias Br1 (LaNCE-USP/SP) e H9 (WA09) (Wicell, EUA). Os resultados estão resumidos na Tabela 4.

Tabela 6. Imunofenotipagem das hiPSC geradas e de linhagens de células embrionárias para marcadores de pluripotência. A porcentagem de células expressando os respectivos marcadores é apresentada.

%	SOX2	OCT4	NANOG	SSEA4	TRA 1-60
iPS PB02	88,81	89,94	86,54	72,53	14,65
hiPSC PB12	94,62	88,44	90,40	-	-
Br1	90,74	38,94	81,60	70,43	22,41
H9	73,13	65,33	62,66	68,37	12,54

Legenda: O símbolo “-” indica a não realização da análise.

Todas as células analisadas apresentaram elevado percentual (número de células > 80%) de células positivas para marcadores de pluripotência SOX2, OCT4, NANOG e SSEA4, com exceção do TRA1-60, que de modo geral apresentou baixo percentual (número de células < 30%) em todas elas.

5.3.4 Imunocitoquímica por microscopia de fluorescência

A análise imunocitoquímica para a detecção de fatores de transcrição no interior das células hiPSC PB02 P19 foi realizada. Os fatores de transcrição relacionados à pluripotência Oct4, Sox2 e Nanog foram detectados pelos anticorpos primários, os quais foram utilizados como substrato para a ligação dos anticorpos secundários conjugados com o fluoróforo A488. As três proteínas estão presentes nas células analisadas (Figura 9), uma característica própria de células pluripotentes.

Figura 9. Caracterização imunocitoquímica da hiPSC PB02 P 19 por microscopia de fluorescência: As linhas indicam as proteínas analisadas e o controle negativo. As colunas indicam a respectiva análise de cada proteína: (esquerda) apenas marcação nuclear por DAPI (azul), (centro) anticorpo secundário A488 (verde), e (direita) visualização sobreposta da marcação com DAPI e anticorpo A488.

5.3.5 Caracterização funcional das hiPSC PB02

A caracterização funcional envolveu os ensaios de formação de teratomas em camundongos imunossuprimidos. Após nove semanas, foi observado o surgimento de uma massa tecidual no local de aplicação da injeção nos três animais que receberam as células hiPSC PB02 P12 (figuras 10A, 10B e 10C). Os teratomas formados apresentaram um tamanho de 12,84 mm, 10,07 mm e 24,16 mm de diâmetro. Após a remoção cirúrgica (figura 10D), os teratomas foram armazenados em recipiente contendo etanol 70%. Eles foram a seguir submetidos a uma análise histológica para detecção de tecidos de origem

endodérmica, mesodérmica e ectodérmica em seu interior de modo a evidenciar o potencial de diferenciação das células injetadas, e consequentemente sua pluripotência.

Figura 10. Formação de teratomas pela hiPSC PB02 P12. (A), (B) e (C) correspondem às fotografias tiradas dos animais que foram injetados com células iPS PB02 P12. Cada uma das fotografias corresponde a um animal diferente, e o tamanho de cada um dos teratomas está indicado nas respectivas imagens (em mm). Em (D) estão visíveis os três teratomas extraídos cirurgicamente.

5.3.6 Análise histológica do teratoma formado pela hiPSC PB02 P12

Os teratomas extraídos dos camundongos foram incluídos em parafina e os blocos resultantes foram processados em micrótomo rotativo, o qual gerou cortes de (5 μ m) de espessura. Foram preparados três cortes sobre cada lâmina de vidro de microscopia para análise pela técnica de imunohistoquímica (IHC), utilizando o kit Universal LSAB2 System-HRP (Dako, Sta. Clara, CA, EUA). Os anticorpos utilizados foram: (A) Alpha-1-fetoprotein (mesoderme); (B) Nestin (ectoderme); (C) α -SMA (endoderme). Como mostrado na figura 11, foram observadas estruturas pertencentes a cada um dos três folhetos embrionários no teratoma analisado.

Figura 11. Caracterização por imunohistoquímica de um dos teratomas formados pela hiPSC PB02 P19. (A) cartilagem pertencente à mesoderme; (B) melanócitos pertencentes à ectoderme; (C) células da mucosa intestinal pertencentes à endoderme.

5.3.7 Análise quantitativa da pluripotência e do potencial de diferenciação da hiPSC PB12 P9

Esta análise foi realizada por meio do emprego de cDNA, sintetizado a partir do RNA das células hiPSC PB12 P9 indiferenciadas em cultura e também de CE formados a partir destas células, após sete dias de diferenciação espontânea. As análises realizadas pelo *software* online *hPSC Scorecard™ Analysis Software* envolveram a produção de um mapa de expressão (*expression plot*) e uma tabela de pontos (*scores table*), ambas baseadas na comparação das células em análise com um banco de dados de células pluripotentes, principalmente hESCs. As células que compõem o banco de dados de referência (BDR) são: H9 ESC P28, iPS BS3C P35, iPS18C P29, HUES9 P28, HUES13 P56, HUES28 P28, HUES44 P25, HUES48 P21, HUES49 P21, HUES53 P24, HUES63 P46, HUES64 P30 e HUES65 P29.

Os mapas de expressão, também conhecidos como *heat maps* (mapas de calor), indicam a diferença de expressão de determinados genes com base em seu nível de expressão em relação aos valores contidos no BDR. A Figura 12 apresenta um resumo dos resultados fornecidos pelo *software* de análise e foi retirada diretamente do relatório final do experimento.

De maneira geral, os genes característicos de diferenciação linhagem específica (folhetos embrionários) estão pouco expressos nas células que foram mantidas em cultura, enquanto são predominantemente mais expressos nas células que compuseram os CEs testados. Os genes relacionados a autorrenovação, segundo a Figura 12, estavam mais expressos durante a cultura da hiPSC PB12 P9 em aderência, tornando-se claramente menos expressos após a formação dos CE.

Figura 12. Mapas de intensidade de expressão gênica da hiPSC PB12 P9 (em cultura e CEs de sete dias). Os genes deste mapa estão classificados em 5 grandes grupos: (i) *self-renewal* (autorrenovação); (ii) *mesendoderm* (mesendoderme); (iii) *ectoderm* (ectoderme); (iv) *mesoderm* (mesoderme) e (v) *endoderm* (endoderme). A escala de intensidade varia entre genes positivamente (vermelho) e negativamente (azul) regulados, e a intensidade das cores revelam a multiplicidade destes valores, os quais variam entre 100 e 0,01 vezes mais ou menos regulados respectivamente. Genes que possuem intensidade de expressão próximos ao padrão de referência estão representadas em branco.

Os resultados da expressão gênica também foram apresentados em forma de pontuação (*score*), cujo valor é calculado automaticamente pelo *software* de análise *online* para cada grupo de genes estudado, em comparação com o BDR. Valores negativos representam menor expressão, valores próximos a zero indicam expressão similar às células do BDR e valores positivos significam maior expressão. A Tabela 5 mostra os valores da pontuação da hiPSC PB12 para quatro grupos de genes: os relacionados à autorrenovação, à ectoderme, à mesoderme e à endoderme.

Figura 13. Tabela de pontuação (scores) das hiPSC PB12 P9 quanto a capacidade de autorrenovação e diferenciação (em cultura e em CE com sete dias). Legenda: *Self-renewal* (autorrenovação); *ectoderm* (ectoderme); *mesoderm* (mesoderme) e *endoderm* (endoderme). A pontuação é atribuída tendo como base uma comparação estatística do perfil de expressão gênica entre a amostra estudada e o padrão de referência. A proximidade da pontuação ao zero indica maior similaridade com as células do padrão de referência; valores > 0 (vermelho) indicam que há maior expressão do respectivo grupo de genes (pluripotência ou linhagem específica) do que a referência; valores < 0 indicam menor expressão gênica (azul) no grupo de genes comparativamente à referência.

Segundo os resultados mostrados na figura 13, há grande semelhança entre as hiPSC PB12 P9 expandidas em cultura e as células pluripotentes que compõem o BDR, quanto a expressão de genes de autorrenovação, ectoderme e mesoderme. Os valores atribuídos à endoderme foram classificados como estando abaixo dos valores de referência. Este valor demonstrou aumento, de -1,83 para -0,87 após diferenciação em corpo embriode, o que indica diferenciação destas células. A diminuição da pontuação para a autorrenovação (*self-renewal*) também é um indicativo de que estas células se diferenciaram, se comprometendo com a expressão de genes característicos dos três folhetos embrionários.

5.4 Diferenciação hematopoética

5.4.1 Pré-diferenciação hiPSC PB02 P19 e hiPSC PB12 P26

As diferentes fases do processo de pré-diferenciação estão resumidos na Figura 14. As colônias de hiPSCs foram individualizadas (Figura 14A) e aderiram à matriz Geltrex® em poucas horas (Figura 14B). Foi observado crescimento de colônias de células com morfologia similar à de hESCs (Figuras 14 C, D e E), demonstrando a adaptação destas células ao repique enzimático. As colônias de hiPSC PB02 tratadas enzimaticamente sofreram algumas mudanças morfológicas, apresentando um padrão de cavidades em seu interior (Figura 14F). Entretanto, foi observado que as células mantiveram a alta expressão de genes de pluripotência (tabela 7) e por este motivo o protocolo continuou sendo executado apesar da mudança morfológica observada. O processo de adaptação consistiu na realização de repique enzimático por pelo menos três vezes, de maneira a avaliar as características morfológicas e capacidade de proliferação das células após sucessivos repiques.

Figura 14. Adaptação das colônias de hiPSCs ao repique enzimático. (A) hiPSC PB12 P26 individualizadas pela ação da enzima acutase. hiPSC PB12 P26 aderidas no dia +1 **(B)**, no dia +3 **(C)** e dia +4 após individualização **(D)**. **(E)** hiPSC PB02 P19 em expansão no dia +2 e dia +5 após repique enzimático **(F)**.

Tabela 7. Imunofenotipagem das hiPSC PB02 P19 tratadas com acutase por 4 passagens, para marcadores de pluripotência. A porcentagem de células de cada linhagem expressando cada marcador é apresentada.

%	SOX2	OCT4	NANOG
iPS PB12	99,03	82,18	99,29

5.4.2 Primeiro estágio de diferenciação e ensaio de células formadoras de colônias (CFC) em meio Methocult™ (Protocolo 1)

Inicialmente, três mil células hiPSC PB02 individualizadas foram transferidas para cada um dos 60 poços centrais (os 36 poços das bordas foram preenchidos com solução PBS para evitar o ressecamento dos poços centrais) de uma placa de 96 poços com fundo em forma de “U”. A placa foi submetida à centrifugação e incubada a 37°C e 5% de CO₂ para a formação de corpos embrioides a partir das hiPSCs PB02 (hiPSC PB02 CE) ilustrados na Figura 15A. No dia seguinte ao início do experimento foi observada a formação de corpos embrioides em todos os 60 poços da placa de cultura. Após 10 dias de indução da mesoderme hematopoética, 24 dos corpos embrioides foram dissociados enzimaticamente com *StemPro® Accutase Cell Dissociation Reagent* (Life Technologies, Grand Island, NY, EUA) e as células resultantes utilizadas para um ensaio de detecção e identificação de progenitores hematopoéticos (células formadoras de colônias (CFC)), utilizando o meio de cultura Methocult™ (Stemcell, Vancouver, Canadá). Este meio de cultura semi-sólido é suplementado com citocinas que favorecem o desenvolvimento das células da linhagem mielóide. Foram realizados dois ensaios, a partir de 50x10³ células em duplicata, sendo encontradas em média 10,5 B/CFU-Es, com coloração avermelhada indicando hemoglobinação (figura 15B) (colônias de células progenitoras da linhagem eritroide) por ensaio. O surgimento destas colônias após 10 dias de experimento demonstra que a hiPSC PB02 possui potencial de diferenciação hematopoética.

Figura 15. Diferenciação hematopoética (protocolo 1). (A) Corpo embrióide no dia +3 após início da indução da mesoderme hematopoética. Células ao redor do CE neste estágio são consideradas inviáveis e que não participaram da formação do mesmo. (B) Uma colônia de progenitores hematopoéticos hemoglobinizados (B/CFU-E) no dia +10 do início do ensaio de CFC. Barras de referência correspondem a 100 μm.

5.4.3 Diferenciação hematopoética (Protocolo 2)

As principais diferenças deste protocolo em relação ao protocolo 1 de diferenciação hematopoética dizem respeito ao número inicial de células plaqueadas para a formação dos corpos embrioides, sendo utilizadas cinco mil células por poço da placa de cultura, e a utilização da citocina TPO (10 ng/mL) na última troca de meio do experimento.

Foram formados os corpos embrioides como esperado (Figuras 17A e B) sendo também observada a proliferação de pequenos aglomerados de células ao redor dos mesmos (Figura 17C) com 14 dias de diferenciação. No dia +14 de diferenciação os corpos embrioides (D+14 CE) e as células dispersas em grumos no sobrenadante (D+14 Sob.) foram coletadas separadamente para análise da expressão gênica e avaliação da expressão dos genes SOX2 e CD34 (Figura 16). De acordo com o gráfico ilustrado nesta figura, é observada a expressão de CD34, indicando a presença de células diferenciadas, uma vez que este gene é característico de células progenitoras hematopoéticas. Entretanto, pode ser observada uma expressão muito maior do gene SOX2, em ambos os tipos celulares estudados, mais evidente nas células do sobrenadante que nas dos CE. As células dos CE mostram, com base no perfil de expressão gênica ilustrado, uma maior diferenciação que as células do sobrenadante, pois apresentam menor expressão de SOX2 e maior de CD34, comparativamente.

Figura 16. Análise da expressão dos genes CD34 e SOX2 após o primeiro estágio da diferenciação hematopoética (protocolo 2). Os tipos celulares analisados após 14 dias de diferenciação são: as células dispersas em grumos no sobrenadante (D+14 Sob.) e os corpos embrioides (D+14 CE).

Somente as células que não faziam parte dos corpos embrioides foram utilizadas para a realização do ensaio de detecção de células formadoras de colônias (CFC) em meio Methocult™. Neste experimento foram utilizadas 15000 células em cada um dos quatro ensaios realizados em duplicatas, foi encontrada apenas uma unidade formadora de colônia mista, aparentemente contendo progenitores mieloides (células escuras, indicando hemoglobinizacão) e linfoides (células claras) (Figura 17D).

Figura 17. Diferenciação hematopoética (protocolo 2). (A) Corpo embriode do início da indução da mesoderme hematopoética. (B) Corpo embrióide no dia +1. (C) Corpo embrióide no dia +14, com células proliferando ao seu redor. (F) Uma colônia mista, contendo aparentemente progenitores mieloides (células escuras, indicando hemoglobinizacão) e linfoides (células claras) no dia +20, durante ensaio de CFC. Barras de referência de A, B, C, D e F correspondem a 200 µm.

6 Discussão

Ao longo dos anos, as transfusões sanguíneas tornaram-se mais seguras graças ao desenvolvimento de técnicas sorológicas e de biologia molecular, as quais permitem hoje realizar os procedimentos de transfusões com alto grau de compatibilidade. As técnicas aplicadas em laboratórios de imunohematologia, como a genotipagem eritrocitária e fenotipagem são ferramentas importantes para a determinação precisa dos antígenos presentes na membrana das hemácias e também dos anticorpos presentes no plasma de pacientes e doadores. Como consequência, é possível realizar transfusões com menor incidência de reações adversas como a aloimunização e as reações hemolíticas, sendo os principais beneficiados os pacientes que necessitam de transfusões sanguíneas crônicas.

O conhecimento preciso do perfil antigênico eritrocitário (PAE), além de permitir maior segurança durante as transfusões destes pacientes, permitiu a descoberta de fenótipos raros ou mesmo constituídos por combinações pouco usuais de antígenos. Atualmente o conceito de fenótipo raro é bastante abrangente e variável, de modo que a ausência ou presença de um determinado antígeno pode ser raro em um país e comum em outro. De modo geral, são aqueles que ocorrem numa frequência igual ou menor a 1/1000. Estão incluídos nesta classificação aqueles que envolvem a ausência de um antígeno de alta frequência, ou seja, o indivíduo possui um anticorpo para um determinado antígeno que este presente na maioria da população. Também são considerados raros os fenótipos que possuem uma combinação de múltiplos antígenos comuns negativos, cujas hemácias são compatíveis com um grande número de indivíduos. Estes indivíduos em muitos casos são considerados como excelentes doadores de sangue, porém, é difícil encontrar hemácias com perfil antigênico compatível quando eles necessitam de transfusões, devido à presença em sua circulação sanguínea de anticorpos contra antígenos de alta frequência ou comuns (ISBT - INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION, 2016b; MENY; FLICKINGER; MARCUCCI, 2013; NANCE, 2009; SILVY et al., 2015).

Durante a realização deste trabalho foram identificados indivíduos possuidores de fenótipos múltiplos negativos para antígenos eritrocitários entre os doadores de sangue cadastrados no hemocentro de Ribeirão Preto. A partir dos resultados de fenotipagem e genotipagem cadastrados no banco de dados SBS, foram pesquisados doadores com PAE pouco frequente, caracterizados pela ausência de múltiplos antígenos eritrocitários e, portanto, considerados de baixa imunogenicidade. Após uma seleção cuidadosa, escolhemos duas amostras para dar seguimento a este trabalho (PB02 e PB12), as quais apresentam perfis de antígenos eritrocitários interessante para transfusões sanguíneas e possuem baixa representatividade em nossa população, principalmente o PAE da amostra PB12, encontrado

em apenas 15 indivíduos em um total de 87.700 indivíduos cadastrados até a data de janeiro/2016, ou seja, menos de 0,02% do total.

Para a escolha dos perfis de antígenos eritrocitários foram considerados trabalhos que indicam como clinicamente mais significantes os antígenos Rh (E,e,C,c); Kell (K); MNS (S,s); Kidd (Jk^a,Jk^b) e Duffy (Fy^a,Fy^b) (CASTILHO, 2008; PEYRARD et al., 2011). Por este motivo, doadores múltiplos negativos para estes antígenos foram considerados ideais para a execução deste projeto. Entre as amostras coletadas e posteriormente genotipadas, as duas consideradas menos imunogênicas são muito semelhantes, a PB02 e PB10, diferindo apenas no antígeno Jka, presente na PB02 e ausente na PB10 e o antígeno Fyb, presente na PB02 e ausente na PB10. Levando-se em conta a aptidão dos antígenos em induzir aloimunização, sendo descrita como sendo mais imunogênico o antígeno D, seguido por K, E, c, Fya, Jka e S (PEYRARD et al., 2011; SCHONEWILLE; VAN DE WATERING; BRAND, 2006), e como foi decidido a escolha de apenas uma amostra genotipada para a continuidade do trabalho, optou-se pela amostra PB02 por não apresentar o antígeno Jka. As demais amostras caracterizadas por genotipagem, PB01 a PB11 (com exceção da PB02), não foram utilizadas para nenhum experimento, uma vez que apresentam PAE mais imunogênico que a PB02. A escolha das amostras por meio dos resultados de genotipagem também foi abandonada, uma vez que foi encontrada uma maneira mais eficaz para esta seleção, a fenotipagem.

A amostra PB12 foi escolhida posteriormente, desta vez com base em resultados de sorologia por meio de fenotipagem. Desta forma, foi possível obter uma amostra com PAE ainda menos imunogênico que a PB02, pois este tipo de caracterização permite conhecer maior número de antígenos em uma amostra do que a genotipagem. A PB12, então, foi escolhida anteriormente à coleta de PBMCs por meio de uma busca no banco de dados SBS (Sistema de Banco de Sangue). Para isso foi definido um fenótipo, múltiplo negativo para o maior número possível de antígenos, sendo relacionados pelo sistema apenas os possíveis doadores com estas características. Este tipo de fenotipagem considera um maior número de antígenos eritrocitários, de modo que seus resultados são mais completos que os de genotipagem para a determinação do PAE. Por este motivo, além da seleção da amostra PB12 para continuidade deste trabalho, os dados disponíveis no sistema SBS foram utilizados também para complementar as informações sobre o PAE da amostra PB02.

Entre os antígenos ausentes nas hemácias do indivíduo correspondente a amostra PB12 está o Fyb do sistema Duffy, o qual, porém está presente nos resultados de genotipagem das células hiPSC PB12 de acordo com os resultados da plataforma *HEA BeadChip*. Esta divergência é explicada por um polimorfismo em um único nucleotídeo (SNP) no gene *GATA*, no promotor *DARC*, a qual é responsável por silenciar a expressão deste gene nas hemácias, mas não nos demais tecidos do seu corpo. Esta mutação é associada a resistência à malária em populações africanas e seus descendentes, que historicamente

habitam estas áreas endêmicas ou de lá emigraram, uma vez que as formas merozoítas dos protozoários *Plasmodium sp* se utilizam das proteínas do sistema Duffy para infectar as hemácias. (TOURNAMILLE et al., 1995; WEPPELMANN et al., 2013; YAZDANBAKHSI et al., 2000). Este achado é um dos exemplos que demonstram a importância da complementação entre a genotipagem e a fenotipagem na definição do PAE de uma amostra ou de um paciente.

Foram geradas duas hiPSCs neste trabalho, a partir da reprogramação das amostras PB02 e PB12, com fenótipos determinados, múltiplos negativos para antígenos eritrocitários. Até o momento, com exceção do presente estudo, não havia sido descrita a geração de hiPSCs exclusivamente para a manutenção de um perfil eritrocitário específico que considerasse múltiplos sistemas sanguíneos. Apesar da geração de hiPSCs ser uma tecnologia relativamente conhecida para estudos de diferenciação hematopoética, poucos trabalhos publicados exploraram a questão da escolha do genótipo ideal ou da combinação do perfil eritrocitário antigênico que seria útil para a prática transfusional. No trabalho de Seifinejad e colaboradores em 2010, foi demonstrado o desenvolvimento de uma linhagem de hiPSC a partir de fibroblastos de indivíduos com fenótipo Bombay, ou seja, incapazes de expressar os antígenos A, B e H do sistema ABO em suas hemácias. Este fenótipo é caracterizado por mutações nos genes *FUT1* e *FUT2*, fucosiltransferases fundamentais na constituição dos antígenos do sistema ABO (SEIFINEJAD et al., 2010). O mesmo grupo de pesquisa, recentemente mostrou a diferenciação destas células e obtenção de células eritroides contendo majoritariamente hemoglobina fetal (GANJI et al., 2015). A compatibilidade do sistema ABO consiste em um grande avanço da pesquisa na área de hematologia, principalmente pelos benefícios que pode proporcionar à pequena população de indivíduos portadores deste fenótipo, os quais não podem receber transfusões que não sejam de outros indivíduos Bombay. Lu e colaboradores também foram capazes de gerar CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE a partir de células pluripotentes, neste caso hESCs, com fenótipo O RhD-, contendo majoritariamente hemoglobinas fetais (LU et al., 2008a). Ambos os trabalhos descritos acima, propuseram células chamadas de “doadoras universais”, uma vez que são compatíveis com qualquer paciente considerando os sistemas ABO e o antígeno D do sistema Rh. Entretanto, em casos de transfusão crônica, devido à alta capacidade de aloimunização de antígenos de outros sistemas, o ideal seria considerar a maior quantidade possível de sistemas sanguíneos, como foi feito no presente trabalho.

Giarratana e colaboradores em 2011, verificaram que a expressão de antígenos eritrocitários se mantém após a diferenciação hematopoética. Entretanto, no referido estudo, foram diferenciadas células-tronco hematopoéticas (hCTH) multipotentes e não células pluripotentes. Além disso, as células escolhidas para diferenciação não foram selecionadas com base no PAE da amostra, de modo que o foco do experimento específico dentro deste

estudo foi apenas a verificação da expressão dos mesmos, e não a produção de hemácias a partir de um fenótipo específico (GIARRATANA et al., 2011).

A causa da escassez deste tipo de trabalho talvez resida no fato de não haver atualmente um protocolo efetivo e reprodutível para o processo de diferenciação hematopoética, de modo que sua padronização constitui um desafio maior atualmente do que a definição de fenótipo ideal e obtenção destas amostras. Os maiores desafios estão no chamado “switching” (mudança) das globinas, ou seja, na elucidação dos mecanismos responsáveis pela maturação das globinas fetais em adultas e no aumento da escala e custos deste processo como um todo (DIAS et al., 2011a; LAPILLONNE et al., 2010a; OCHI et al., 2014; TRAKARNSANGA et al., 2014). Visando a aplicação em protocolos de diferenciação totalmente estabelecidos no futuro, a produção de hiPSCs com fenótipos definidos e a criação de bancos destas células nos quais sejam armazenadas linhagens com perfis antigênicos complementares e mesmo raros serão muito úteis (PEYRARD et al., 2011).

Além disso, a produção de hemácias a partir de células pluripotentes, como as hiPSCs faria com que o produto transfusional fosse mais seguro e livre de agentes infecciosos, os quais consistem em motivo de preocupação constante durante as transfusões sanguíneas, fazendo com que os testes normalmente utilizados para garantir a segurança das amostras não fossem necessários (EBIHARA; MA; TSUJI, 2012; MACHADO; LEVI, 2012).

Outro ponto relevante deste trabalho é a possibilidade de encontrar e expandir um perfil eritrocitário antigênico pouco comum, visto que a carga genética antigênica das hemácias pode variar consideravelmente entre as diferentes regiões de um país, entre países e até mesmo entre distintos grupos étnicos. Neste sentido, a diversidade étnica que compõe a população brasileira permite que sejam encontrados perfis eritrocitários antigênicos incomuns, cujas amostras representam um material valioso para futuros estudos (CASTILHO, 2016).

O principal motivo para a escolha das hiPSCs para a realização deste estudo, portanto, é a possibilidade de sua manutenção a longo prazo por meio de ciclos alternados de congelamento, descongelamento e expansão da cultura de modo a perpetuar a linhagem escolhida juntamente ao PAE de interesse.

As hESCs também possuem esta capacidade de autorrenovação, entretanto, existem algumas restrições quanto ao seu uso, como por exemplo, o número limitado de linhagens derivadas de blastocistos disponíveis e além disso, a ausência descrição do perfil eritrocitário antigênico destas hESCs, uma vez que não foram derivadas com este fim específico. Desta forma, mesmo com a realização de genotipagem nas linhagens existentes, e a derivação seletiva de novas linhagens priorizando a obtenção de fenótipos específicos ou raros, ainda assim, seria constituído um banco de células limitado em variedade (LAPILLONNE et al., 2010a). Neste sentido, a escolha de fenótipos seria impraticável, uma vez que não é possível

prever estas características em amostras aptas e disponíveis para geração de hESCs. Além disso, o planejamento de fecundações com este fim seria inviável e levaria ao agravamento das questões éticas já existentes.

Neste trabalho, utilizamos uma abordagem visando à obtenção de hemácias a partir de hiPSC diferenciadas. As hiPSC foram geradas a partir da reprogramação de uma população celular enriquecida obtida após a expansão de PBMCs de PB, uma fonte muito acessível e pouco invasiva, em condições de cultura específicas. Os tipos celulares obtidos após a expansão, entretanto, não foram caracterizados com exatidão, embora tenha sido constatado um efetivo enriquecimento populacional celular mieloide. Este enriquecimento foi avaliado por meio da expressão de marcadores de membrana celular, com objetivo de distinguir entre células mieloides e linfoides. Apesar da predominância das primeiras, foi verificada a presença de uma pequena proporção de células linfoides, as quais constituem elementos indesejados durante o processo de transfecção. É desejável a diminuição desta população o quanto possível diminuindo a probabilidade de se reprogramar linfócitos T e B, os quais, devido à realização de recombinações V(D)J, podem originar hiPSCs portadoras de recombinações (alterações genéticas) indesejáveis. A porcentagem de células expressando cada um dos marcadores CD3, CD4 (linfócitos T) e CD19 (linfócitos B) ao final do período de expansão foi menor que 4%, valor dentro do esperado segundo o protocolo de Dowe e colaboradores (2012). Para marcadores de células mieloides, por sua vez, variou de aproximadamente 1% no início a mais de 80%, superior aos valores indicados no artigo base utilizado para este protocolo (1% a 52%) (DOWEY et al., 2012; SU et al., 2013).

Para a reprogramação da população enriquecida de células mieloides foram utilizados plasmídeos episomais (pEB-C5 e pEB-Tg), ou seja, vetores não integrativos. Os plasmídeos episomais oferecem grandes vantagens, pois eliminam o risco de alterações permanentes no genoma celular e diferem dos plasmídeos integrativos, que podem ser incorporados aleatoriamente no genoma celular (SU et al., 2013; YU et al., 2009). No caso do presente estudo, a utilização destes vetores foi fundamental devido a necessidade da manutenção do genótipo dos doadores escolhidos após prolongados períodos em cultura. Assim, uma vez estabelecidas as hiPSC PB02 e PB12, as mesmas foram mantidas em cultura por 26 e 27 passagens respectivamente, e, no entanto, as suas características genótípicas referentes aos antígenos eritrocitários foram mantidas inalteradas, o que foi demonstrado pelo resultado do experimento de genotipagem destas células, pela técnica do HEA Beadchip™.

A utilização dos vetores episomais para a reprogramação de PBMCs já havia sido realizada por outros grupos de pesquisa, sendo relatada em geral uma baixa eficiência de reprogramação. A partir de 1×10^6 células transfectadas com os plasmídeos pEB-C5 e pEB-Tg, Dowe obteve uma média de 6,0 colônias iniciais. O estudo de Chou e colaboradores em 2011, apresentou uma média de 9,0 colônias, enquanto que, no presente estudo, com a

reprogramação de 1×10^6 células foram obtidas 4 e 1 colônias para hiPSC PB02 e PB12 respectivamente. A obtenção de maiores números de colônias iniciais após a reprogramação foi associada à escolha de outras fontes de coleta de amostra, como o sangue de cordão umbilical. Os grupos de pesquisa de Doweiy e Chou revelaram um aumento de 20 a 50 vezes mais colônias iniciais surgidas após as reprogramações ao utilizar SP oriundo de cordão umbilical. Embora esta fonte seja mais rica em células mielóides, sua obtenção está limitada a apenas uma coleta, sendo menos acessível (CHOU et al., 2011; DOWEY et al., 2012).

A reprogramação celular resultou no aparecimento de colônias, as quais foram repicadas seletivamente para início do cultivo em condições próprias para células pluripotentes. O isolamento da população celular que compõe cada colônia caracteriza um clone da referida hiPSC e esta prática garante a homogeneidade da cultura. Entretanto, apenas a hiPSC PB12 foi cultivada a partir de uma única população celular, enquanto que a cultura de hiPSC PB02 foi originada de uma mistura das quatro colônias iniciais. As consequências do cultivo de hiPSCs heterogêneas puderam ser observadas nas alterações morfológicas a nível de colônia e no aparecimento e de sinais de diferenciações espontâneas, frequentemente verificadas durante a expansão da hiPSC PB02 e ausentes na hiPSC PB12 (dados não mostrados).

Para serem consideradas hiPSCs verdadeiras, estas células devem ser avaliadas e apresentar determinadas características relacionadas à pluripotência, relacionadas à autorrenovação e a capacidade de diferenciação, comparáveis às hESCs. A capacidade de autorrenovação foi verificada por meio da observação das características morfológicas em cultura, a expressão de genes de pluripotência e a presença dos fatores de transcrição relacionados à pluripotência. As hiPSCs PB02 e PB12, nas mesmas condições de cultivo de células hESCs, se mostraram similares a elas e a outras linhagens de hiPSCs descritas na literatura em aspectos como morfologia, expressão dos genes de pluripotência *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*, expressão intracelular destes marcadores e a formação de corpos embrioides (CARPENTER et al., 2004; DOWEY et al., 2012; TAKAHASHI et al., 2007; XU, 2006).

De acordo com a literatura, a caracterização funcional, ou seja, a capacidade de diferenciação destas células, mais rigorosa para definição da pluripotência de hiPSCs, consiste no ensaio de formação de teratomas. Neste ensaio, as células pluripotentes são injetadas em camundongos imunodeficientes para que seja induzida *in vivo* a formação de uma estrutura em forma de cisto chamada teratoma. Os teratomas formados devem ser compostos por células originadas a partir de cada um dos três folhetos embrionários, endoderme, mesoderme e ectoderme (MÜLLER et al., 2010). Neste trabalho, as duas linhagens de hiPSCs geradas foram injetadas por via subcutânea em camundongos imunodeficientes, entretanto, após 9 semanas foi observada a formação do teratoma da linhagem hiPSC PB02 somente, injetadas em camundongos SCID. As células hiPSC PB12

foram injetadas em camundongos do tipo NUDE, cujas características podem ter influenciado no tempo de formação do teratoma, o que explicaria a ausência da formação de teratoma em um período maior do que 14 semanas, ou seja, até o término da escrita desta dissertação. A utilização de linhagens diferentes de camundongos foi motivada pela disponibilidade destes animais no momento da obtenção de número suficiente de células para a execução do experimento.

Apesar de camundongos NUDE serem também imunodeficientes, sabe-se que existem células citotóxicas, principalmente *natural killer* (NK) do sistema imune inato, no organismo destes animais. Estas células, podem reagir de modo inespecífico com as células injetadas dificultando o desenvolvimento do teratoma (BELIZÁRIO, 2009; BUDZYNSKI; RADZIKOWSKI, 1994). Esta observação é fortalecida por relatos de Ye e colaboradores que sugerem a escolha específica de uma linhagem de camundongo com níveis reduzidos de células NKs para o teste de formação de teratomas a partir de hiPSCs (YU et al., 2009). Kuroda e colaboradores, em revisão do ano de 2013, afirmam que os camundongos da linhagem SCID possuem grandes deficiências imunológicas, uma vez que são deficientes em linfócitos T, linfócitos B e células NK, enquanto que os do tipo NUDE são deficientes apenas em linfócitos T. As linhagens de camundongos com maiores deficiências imunológicas são consideradas as mais sensíveis para utilização na detecção de resíduos de células com potencial tumorigênico derivadas de células pluripotentes, além de permitirem maior eficiência na enxertia de células e tecidos humanos (KURODA; YASUDA; SATO, 2013). Deste modo, a utilização de camundongos SCID para a formação de teratomas é a mais indicada, em comparação aos camundongos NUDE.

Uma outra opção para comprovar a pluripotência de hiPSCs é a substituição do tradicional ensaio de formação de teratoma por um método molecular de alta eficiência. Trata-se do *TaqMan® hPSC Scorecard™*, um kit próprio para utilização em termocicladores de qPCR que compreende 94 marcadores pré-definidos de pluripotência e dos três folhetos embrionários (células diferenciadas). Neste ensaio, podem ser analisados o potencial de autorrenovação de hiPSCs em cultura ou ainda, o potencial de diferenciação destas células por meio de sua utilização para a formação de corpos embrioides em uma diferenciação espontânea por 7 dias. O arquivo produzido com a expressão gênica é analisado por um software específico que compara os valores de Cts obtidos de cada um dos marcadores com um painel de referência interno, ou banco de dados de referência (BDR), composto por 11 hESCs e 2 hiPSCs. Uma pontuação é fornecida de acordo com a quantificação da correlação dos genes expressos, entre a célula testada e o BDR. Neste projeto, com o objetivo de consolidar a hiPSC PB12 como entidade pluripotente, a mesma foi submetida a caracterização por esta ferramenta, tanto no estado de colônias em cultura, quanto no estado de CE. Os resultados obtidos são característicos de células indiferenciadas, uma vez que são

atribuídas pontuações próximas aos valores do BDR para a autorrenovação, ectoderme e mesoderme, além de valores baixos para a endoderme.

A análise dos CEs deixados para diferenciar espontaneamente por sete dias, o período mínimo segundo o fabricante do kit *hPSC Scorecard*, ao contrário, indica ocorrência de diferenciação celular. A diminuição da pontuação relacionada a autorrenovação, juntamente com o aumento da pontuação dos três folhetos embrionários fortalecem os indícios de que as células estão deixando de ser células indiferenciadas. Os resultados revelam uma menor diferenciação relacionada à endoderme, em comparação à ectoderme e mesoderme, abrindo espaço para dúvidas quanto à capacidade de diferenciação destas células nos três folhetos embrionários e, portanto, quanto a comprovação da pluripotência. Entretanto, foi observada uma tendência de aumento da pontuação de todos os folhetos embrionários, inclusive da endoderme, e neste caso específico, a regulação positiva da expressão de alguns genes que se encontravam silenciados quando cultura. Este aumento, observado com a diferenciação espontânea em um período de sete dias, sugere que a diferenciação destas células por um período maior de tempo seja suficiente para que apresentem com maior intensidade a diferenciação neste tecido.

Apesar de a substituição do ensaio de formação de teratoma por este método ainda ser polêmica, sua utilização para caracterização de hiPSCs geradas ganharão em rapidez, reprodutibilidade e precisão. Neste sentido, Goh e colaboradores relataram a validação da pluripotência de hiPSCs geradas a partir de fibroblastos reprogramados utilizando técnicas distintas, por meio da comparação com os métodos tradicionais, incluindo a formação do teratoma em camundongos, e a utilização do *TaqMan® hPSC Scorecard™* (GOH et al., 2013). A caracterização das hiPSCs, comprovando suas características pluripotentes, como realizado neste trabalho, consiste em pré-requisito indispensável para a tentativa de diferenciação destas células.

Os protocolos descritos que viabilizam a diferenciação hematopoética foram fundamentados no uso de células-tronco hematopoéticas humanas CD34+ (hCTH) obtidas a partir de PB, medula óssea ou sangue de cordão umbilical, para expansão e obtenção de células hematopoéticas maduras. Com exceção do PB, dentre as três a fonte menos abundante em hCTHs, são pouco acessíveis. Além disso, por se tratarem de CTs multipotentes, possuem potencial limitado de manutenção em cultura em comparação às células pluripotentes, pois está comprometida com a diferenciação hematopoética. Sendo assim, a manutenção destas células *in vitro* por longos períodos constitui grande desafio (GRIGORIADIS et al., 2016). Deste modo, para a produção de novas unidades de hemácias, as células progenitoras hematopoéticas CD34+ deveriam ser coletadas repetidamente quando necessário. Para contornar esta limitação, o estudo de Hirose e colaboradores

sugeriram a imortalização das hCTHs, porém, neste caso, as hCTHs foram obtidas a partir da diferenciação hematopoética de hiPSCs pré-estabelecidas (HIROSE et al., 2013).

O protocolo utilizado para a realização da diferenciação hematopoética neste trabalho é baseado na diferenciação de corpos embrioides formados pelas hiPSCs PB02 e PB12 e foi adaptado de Ng 2008 (NG et al., 2008). O processo de diferenciação como um todo compreende três fases principais: a pré-diferenciação, o primeiro estágio (comprometimento das células do CE para o tecido mesodérmico, caracterizado pela presença de células CD34+) e segundo estágio (obtenção de células mieloides maduras do sangue, ou seja, CD71+/CD235a+ ou anucleadas (DORN et al., 2015; GIARRATANA et al., 2005).

Durante a fase de pré-diferenciação, ambas hiPSCs foram adaptadas ao repique enzimático, ou seja, após cada repique as células individualizadas eram capazes de se reagrupar em colônias que por sua vez voltavam a expandir em número de células. Uma análise de imunofenotipagem foi realizada nas células hiPSC PB02 antes do início da diferenciação com o objetivo de verificar a expressão de genes de pluripotência, garantindo que a alteração morfológica observada com o início do tratamento enzimático não refletia graves mudanças na expressão destes marcadores. O fato de a hiPSC PB02 ter sido formada a partir de quatro colônias iniciais originais e ser heterogênea neste sentido pode ser uma das causas para o aparecimento desta anomalia, uma vez que células de origens diferentes podem apresentar comportamentos distintos frente ao tratamento enzimático. Esta afirmação pode ser sustentada pelo fato de que a hiPSC PB12, originada de uma única colônia, e, portanto, de uma população celular homogênea, apresentou adaptação sem a ocorrência destas modificações.

As células obtidas ao final do primeiro estágio de diferenciação foram coletadas e utilizadas para a realização de ensaio de formação de colônias em metilcelulose. O grupo de pesquisa de Lapillonne em 2010 relatou o surgimento de duas colônias ricas em células progenitoras da linhagem mieloide (B/CFU-E) após a diferenciação hematopoética de hiPSCs geradas a partir de fibroblastos humanos. O protocolo utilizado foi baseado na formação de corpos embrioides e as células dissociadas destas estruturas foram utilizadas no ensaio, sem, contudo, ser informado o número de células iniciais utilizadas. As células descritas nesta dissertação, resultantes da diferenciação hematopoética utilizando o protocolo 1 demonstraram capacidade de diferenciação hematopoética, pois foram capazes de formar em média 10,5 B/CFU-Es. As alterações que originaram o protocolo 2 foram baseadas em atualizações do protocolo precedente que favoreceram a proliferação de células exteriores ao CE durante o primeiro estágio de diferenciação, as quais foram igualmente experimentadas no ensaio de formação de colônias hematopoéticas em metilcelulose. Ao contrário do que se esperava, foram encontradas apenas uma unidade formadora de colônia mista e uma branca entre todos os quatro experimentos em duplicata, cada qual semeado com 15.000 destas

células. Tais células apresentaram expressão do marcador hematopoético CD34+ em ensaio de expressão gênica, justificando esta expectativa, uma vez que células progenitoras são facilmente induzidas à diferenciação por meio de citocinas. Foi observada também a expressão de SOX2, característico de células indiferenciadas, não esperado nesta fase da diferenciação hematopoética.

As células que proliferaram ao redor dos CE foram observadas por Ye e Huang, que utilizaram o mesmo protocolo base para a realização de seus experimentos. Eles relataram a proliferação de pequenas células ao redor dos CE, as quais foram por eles liberadas, co-expressando os marcadores de membrana celular CD34+ e CD45+, característica de células progenitoras hematopoéticas (CPH). Entretanto, ao contrário do que foi encontrado neste presente trabalho, não foi relatada por estes grupos de pesquisa a expressão de marcadores de pluripotência pelas células mencionadas (HUANG et al., 2015; YE et al., 2009). Ye e colaboradores em 2009 descrevem a obtenção de B/CFU-Es mas não revela sua quantidade, apenas a quantidade inicial de células, 50×10^3 (YU et al., 2009). Huang apenas relata a presença destas células e revela a presença das proteínas de membrana, não realizando ensaio de formação de colônias em metilcelulose (HUANG et al., 2015). Este experimento é importante a medida em que demonstra o potencial de diferenciação hematopoética das células estudadas, que uma vez comprovado, permitirão, no futuro, estudos mais específicos de maturação e de aumento de escala.

A determinação do estágio de diferenciação alcançado pelas células, será útil no desenvolvimento e definição de um protocolo reprodutível. Uma vez padronizado, pode ser utilizado para a geração de precursores hematopoéticos a partir da diferenciação de hiPSCs, e estes para o restante da diferenciação até a obtenção de células mieloides maduras.

Os CE gerados por meio da utilização do protocolo 1 apenas, foram utilizados para a realização de um ensaio para o segundo estágio da diferenciação hematopoética. A adesão dos CE em placas de cultura próprias permitiu a formação de estruturas compostas por células diferenciadas, as quais foram dissociadas e avaliadas por técnica de imunofenotipagem para a expressão de marcadores hematopoéticos. Entretanto, esta análise não rendeu os resultados esperados, sendo consideradas insignificantes (dados não mostrados), em número, as células que expressavam estes marcadores.

O escalonamento da produção de hemácias *ex vivo* é possível a partir de células-tronco hematopoéticas CD34+, ou seja, precursores hematopoéticos, sejam elas obtidas a partir de hiPSCs ou mesmo a partir de isolamento a partir de sangue de cordão umbilical (SCU). Foi verificada grande capacidade de expansão destas células em cultura e obtenção de células mieloides nos estágios finais de diferenciação, ou seja, expressando os marcadores de superfície CD71 (transferrina), CD235a (glicoforina) ou apresentando células anucleadas (DORN et al., 2015; GIARRATANA et al., 2005).

A maior eficiência de expansão de células hematopoéticas foi descrita por Giarratana e colaboradores em 2005, ao obterem um máximo de $1,9 \times 10^6$ células mieloides maduras a partir de cada célula CD34+ isolada de sangue de cordão umbilical (SCU), com 100% de enucleação destas células. Em teoria, uma doação de cordão umbilical fornece cerca de 5×10^6 células CD34+, o que seria suficiente para compor uma unidade de concentrado de hemácias para transfusão, a qual contém cerca de 2×10^{12} hemácias (GIARRATANA et al., 2005). Entretanto, como já foi dito, esta fonte de células CD34+ apresenta duas desvantagens em relação às hiPSCs: é menos acessível e não há tecnologias disponíveis que permitam sua manutenção em cultura em estado indiferenciado, sem a utilização prévia de linhagens de hiPSCs ou de modificações genéticas (HIROSE et al., 2013), sendo necessário recorrer à fonte constantemente para obtenção de células CD34+ para diferenciação.

hiPSCs geradas a partir da reprogramação de células CD34+ com vetores lentivirais contendo os genes codificadores dos fatores OSKM, foram diferenciadas com menor eficiência por Dorn e colaboradores em 2015. Foi obtida uma taxa de diferenciação de $1,3 \times 10^3$ células mieloides maduras para cada célula CD34+ diferenciada, sendo a taxa de enucleação de até 29% (DORN et al., 2015). A diferenciação de hiPSCs originadas de fibroblastos humanos revelou eficiência ainda menor de diferenciação, uma vez que $1,5 \times 10^6$ progenitores hematopoéticos deram origem a $4,4 \times 10^8$ células eritroide maduras, ou seja, aproximadamente 293 células maduras para cada célula CD34+ (LAPILLONNE et al., 2010a). Dorn estudou a influência de uma possível memória epigenética presente nas hiPSCs geradas a partir de células somáticas diferentes, o que pode afetar sua capacidade de diferenciação. Foi descrito, por seu grupo de pesquisa, a maior capacidade proliferativa das células diferenciadas a partir de hiPSCs geradas a partir de células CD34 positivas, comparadas com CTs neurais. Isso pode indicar que para fins de diferenciação hematopoética a partir de hiPSCs, a geração de células pluripotentes a partir de células hematopoéticas pode constituir a melhor alternativa no momento (DORN et al., 2015).

Mesmo ainda ocorrendo com baixa eficiência, a diferenciação de hiPSCs em CD34+ e a posterior diferenciação destas células em CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE funcionais constitui a melhor estratégia para a viabilização da proposta deste projeto, uma vez que alia a capacidade de se escolher o fenótipo desejado e sua manutenção, com a capacidade das células CD34+ de expansão e diferenciação em CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUEs. Estes protocolos devem ser desenvolvidos no futuro, aumentando a capacidade tecnológica de expansão e diferenciação destas células, ao mesmo tempo que sejam criados bancos de células, diverso em fenótipos raros ou de baixa imunogenicidade.

O desenvolvimento de protocolos factíveis e reprodutíveis, que permitam a produção *ex vivo* e em larga escala de CÉLULAS VERMELHAS DO SANGUE trariam muitos benefícios à prática transfusional. Essa tecnologia representa uma ferramenta útil na composição de um

perfil antigênico definido e personalizado para suprir demandas de transfusão sanguínea que não são possíveis por meio das doações de sangue voluntárias. Além disso, deve-se considerar a inexistência de agentes infecciosos que representam risco à transfusão sanguínea.

7 Conclusão

Foi possível a geração de células pluripotentes induzidas (hiPSCs) a partir de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) provenientes de doadores de sangue com fenótipo eritrocitário específico (ausência de múltiplos antígenos eritrocitários). Essas hiPSCs mantiveram o perfil antigênico eritrocitário das células iniciais, após a reprogramação e podem ser mantidas em cultura (aproximadamente 26 passagens) e criopreservadas a longo prazo. Estas células também demonstraram potencial de diferenciação hematopoética.

Essas hiPSCs serão úteis na composição de um banco de células que no futuro podem ser utilizadas para a geração de hemácias com perfil antigênico eritrocitário específico.

8 Referências Bibliográficas

ALLEN, H. F.; DIAMOND, L. K.; NIEDZIELA, B. A new blood-group antigen. **Nature**, v. 167, p. 482, 1951.

ALVES, V. M. et al. Alloimmunization screening after transfusion of red blood cells in a prospective study. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 34, n. 3, p. 206–11, 2012.

AVIOR, Y.; SAGI, I.; BENVENISTY, N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. March, p. 170–182, 2016.

BAIOCHI, E.; NARDOZZA, L. M. M. Aloimunização. **revista brasileira de ginecologia e obstetricia**, v. 6, n. 31, p. 311–319, 2009.

BAKER, J. B. et al. Haemolytic disease of the newborn due to anti-Duffy (Fya). **Arch Dis Child**, v. 31, n. 158, p. 298–299, 1956.

BAYANZAY, K.; ALZOEBIE, L. Reducing the iron burden and improving survival in transfusion-dependent thalassemia patients: current perspectives. **Journal of blood medicine**, v. 7, p. 159–69, 2016.

BELIZÁRIO, J. E. Immunodeficient Mouse Models: An Overview. **The Open Immunology Journal**, v. 2, p. 79–85, 2009.

BELLONE, M.; HILLYER, C. **Acute hemolytic transfusion reactions**. Second Edi ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013.

BLUNDELL, J. Experiments on the Transfusion of Blood by the Syringe. **Medico-chirurgical transactions**, v. 9, n. Pt 1, p. 56–92, 1818.

BONIFÁCIO, S. L.; NOVARETTI, M. C. Z. Funções biológicas dos antígenos eritrocitários. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 2, p. 104–111, abr. 2009.

BORDBAR, M. R. et al. Hydroxyurea treatment in transfusion-dependent β -thalassemia patients. **Iranian Red Crescent medical journal**, v. 16, n. 6, p. 2–6, 2014.

BRASIL. Dados sobre o Envelhecimento no Brasil. **Secretaria de Direitos Humanos**, v. 1, n. 1, p. 1–9, 2015.

BUDZYNSKI, W.; RADZIKOWSKI, C. Cytotoxic cells in immunodeficient athymic mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 6, p. 235–242, 1994.

CAMARASA, M. V.; GÁLVEZ, V. M. Robust method for TALEN-edited correction of pF508del in patient-specific induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 1, p. 26, 2016.

CAMBOT, M. et al. In vitro generated Rh(null) red cells recapitulate the in vivo deficiency: a model for rare blood group phenotypes and erythroid membrane disorders. **American journal of hematology**, v. 88, n. 5, p. 343–9, maio 2013.

CARPENTER, M. K. et al. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. **Developmental Dynamics**, v. 229, n. 2, p. 243–258, 2004.

CASTILHO, L. O futuro da aloimunização eritrocitária. **Revista Brasileira Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 4, p. 259–265, 2008.

CASTILHO, L. Blood group polymorphisms in Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 38, n. 3, p. 182–183, 2016.

CASTILHO, L.; PELLEGRINO, J.; REID, M. E. **Fundamentos de Imuno-hematologia**. 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

CHANG, K.-H. et al. Globin phenotype of erythroid cells derived from human induced pluripotent stem cells. **Blood**, v. 115, n. 12, p. 2553–4, 25 mar. 2010.

CHOI, K. et al. Hematopoietic and endothelial differentiation of human induced pluripotent stem cells. **Stem cells**, v. 27, n. 3, p. 559–567, 2010.

CHOU, B.-K. et al. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. **Cell Research**, v. 21, n. 3, p. 518–529, 2011.

CHOU, S. T.; FASANO, R. M. Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 591–608, 2016.

CHRISTÓFARO, M. A. C. (COORD); CARVALHO, M. S. DE (COORD); SALES, M. J. T. (COORD). **Técnico em hemoterapia (livro texto)**. 1ª edição ed. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2013.

COCHRANE, J. B.; MALONE, R. H.; DUNSFORD, I. Kell-celano blood group system in pregnancy and transfusion. **The British Medical Journal**, n. 1949, p. 1949–1950, 1950.

COOMBS, R. R. A.; MOURANT, A. E.; RACE, R. R. In-vivo isosensitisation of red cells in babies with haemolytic disease. **The Lancet**, p. 264–266, 1946.

DASARARAJU, R.; MARQUES, M. B. Adverse Effects of Transfusion. **Cancer Control**, v. 22, n. 1, p. 16–25, 2015.

DIAS, J. et al. Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. **Stem cells and development**, v. 20, n. 9, p. 1639–47, 2011a.

DIAS, J. et al. Generation of red blood cells from human induced pluripotent stem cells. **Stem cells and development**, v. 20, n. 9, p. 1639–47, set. 2011b.

DORN, I. et al. Erythroid differentiation of human induced pluripotent stem cells is independent of donor cell type of origin. **Haematologica**, v. 100, n. 1, p. 32–41, 2015.

DOWEY, S. N. et al. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. **Nat Protoc**, v. 7, n. 11, p. 1–18, 2012.

DOWEY, S. N. et al. Generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from postnatal blood mononuclear cells by plasmid vector expression. **Nat Protoc**, v. 7, n. 11, p. 2013–2021, 2013.

EBIHARA, Y.; MA, F.; TSUJI, K. Generation of red blood cells from human embryonic/induced pluripotent stem cells for blood transfusion. **International journal of hematology**, v. 95, n. 6, p. 610–6, jun. 2012.

EYMARD, N. et al. The role of spatial organization of cells in erythropoiesis. **Journal of mathematical biology**, 5 fev. 2014.

FAN, Y. et al. Generation of Human β -thalassemia Induced Pluripotent Stem Cells from Amniotic Fluid Cells Using a Single Excisable Lentiviral Stem Cell Cassette. **J. Reprod. Dev.**, v. 58, n. 4, p. 404–409, 2012.

FENAUX, P.; ADÈS, L. How we treat lower-risk myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 121, n. 21, p. 4280–4287, 2014.

FERNÁNDEZ-SANTIAGO, R. et al. Aberrant epigenome in iPSC-derived dopaminergic neurons from Parkinson's disease patients. **EMBO Mol Med**, v. 7, n. 12, p. 1529–1546, 2015.

GANJI, F. et al. Differentiation Potential of O Bombay Human-Induced Pluripotent Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells into Fetal Erythroid-Like Cells. v. 16, n. 4, p. 426–439, 2015.

GIARRATANA, M.-C. et al. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. **Nature biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 69–74, 2005.

GIARRATANA, M.-C. et al. Proof of principle for transfusion of in vitro-generated red blood cells. **Blood**, v. 118, n. 19, p. 5071–9, 10 nov. 2011.

GOH, P. A. et al. A systematic evaluation of integration free reprogramming methods for deriving clinically relevant patient specific induced pluripotent stem (iPS) cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

GRIGORIADIS, N. G. et al. Pharmacological preconditioning for short-term ex vivo expansion of human umbilical cord blood hematopoietic stem cells by filgrastim. v. 5, n. 1, p. 29–38, 2016.

HAJDU, S. I. A note from history: The discovery of blood cells. **Annals of clinical and laboratory science**, v. 33, n. 2, p. 237–238, 2003.

HIROSE, S. I. et al. Immortalization of erythroblasts by c-MYC and BCL-XL enables large-scale erythrocyte production from human pluripotent stem cells. **Stem Cell Reports**, v. 1, n. 6, p. 499–508, 2013.

HUANG, X. et al. Production of gene-corrected adult beta globin protein in human erythrocytes differentiated from patient iPSCs after genome editing of the sickle point mutation. **Stem Cells**, v. 33, n. 5, p. 1470–1479, 2015.

ISBT - INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION. **Red cell immunogenetics and blood group terminology**. Disponível em: <<http://www.isbtweb.org/working-parties/red-cell-immunogenetics-and-blood-group-terminology/>>. Acesso em: 5 nov. 2016a.

ISBT - INTERNATIONAL SOCIETY OF BLOOD TRANSFUSION. **Rare donors**. Disponível em: <<http://www.isbtweb.org/nc/working-parties/rare-donors/>>. Acesso em: 5 nov. 2016b.

KIM, C. Disease modeling and cell based therapy with iPSC: future therapeutic option with fast and safe application. **Blood research**, v. 49, n. 1, p. 7–14, mar. 2014.

KOBARI, L. et al. Human induced pluripotent stem cells can reach complete terminal maturation: in vivo and in vitro evidence in the erythropoietic differentiation model. **Haematologica**, v. 97, n. 12, p. 1795–803, dez. 2012.

KURODA, T.; YASUDA, S.; SATO, Y. Tumorigenicity Studies for Human Pluripotent Stem Cell-Derived Products. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 36, n. February, p. 189–192, 2013.

LAKSHMIPATHY, U.; VERFAILLIE, C. Stem cell plasticity. **Blood Reviews**, v. 19, n. 1, p. 29–38, 2005.

LANDSTEINER, K. **Origins and syntheses of blood group genetics**Wiener Klinische Wochenschrift, 1901.

LANDSTEINER, K.; WIENER, A. S. An Agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood. **Soc. Exp. Bioi. NY.**, v. 43, p. 223, 1940.

LAPILLONNE, H. et al. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: Perspectives for transfusion medicine. **Haematologica**, v. 95, n. 10, p. 1651–1659, 2010a.

LAPILLONNE, H. et al. Red blood cell generation from human induced pluripotent stem cells: perspectives for transfusion medicine. **Haematologica**, v. 95, n. 10, p. 1651–9, out. 2010b.

LEE, R. I. A simple and rapid method for the selection of suitable donors for transfusion by the determination of blood groups. **The British Medical Journal**, v. 2, n. 2969, p. 684–685, 1917.

LETTRE, G.; BAUER, D. E. Fetal haemoglobin in sickle-cell disease: from genetic epidemiology to new therapeutic strategies. **The Lancet**, v. 387, n. 10037, p. 2554–2564, 2016.

LONG, B.; KOYFMAN, A. Red blood cell transfusion in the emergency department. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 51, n. 12, p. 120–130, 2016.

LORAND-METZE, I. Contribuição da citometria de fluxo para o diagnóstico e prognóstico das síndromes mielodisplásicas. **Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia**, v. 28, n. 3, p. 178–181, 2006.

LOWER, R. The Method Observed in Transfusing the Blood out of One Animal into Another. **Philosophical Transactions**, v. 1, n. 20, p. 353–358, 1666.

LOWREY, C. H. Down the repressors! Up the fetal hemoglobin! **Blood**, v. 127, n. 11, p. 1383–1384, 2016.

LU, S. et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4475–4484, 2008a.

LU, S.-J. et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4475–84, 1 dez. 2008b.

MA, F. et al. Generation of functional erythrocytes from human embryonic stem cell-derived definitive hematopoiesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 35, p. 13087–92, 2 set. 2008.

MACHADO, C. M.; LEVI, J. E. Transplant-associated and blood transfusion-associated tropical and parasitic infections. **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 225–41, jun. 2012.

MADGE, H. M. On Transfusion of Blood. **The British Medical Journal**, p. 42–44, 1874.

MARSH, W. L. Biological roles of blood group antigens. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 63, n. 5, p. 455–60, 1990.

MENY, G. M.; FLICKINGER, C.; MARCUCCI, C. The American Rare Donor Program. **Journal of Critical Care**, v. 28, n. 1, p. 110.e9-110.e18, 2013.

MIGLIACCIO, A. R. Stem cell-derived erythrocytes as upcoming players in blood transfusion. **ISBT Sci Ser**, v. 33, n. 4, p. 395–401, 2013.

MULAY, S. B. et al. Risks and adverse outcomes associated with emergency-release red blood cell transfusion. **Transfusion**, v. 53, n. 7, p. 1416–20, jul. 2013.

MÜLLER, F. J. et al. A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. **Cell Stem Cell**, v. 6, n. 5, p. 412–414, 2010.

MUZES, G.; SIPOS, F. Heterogeneity of stem cells: a brief overview. **Methods in Molecular Biology**, n. 1341, 2016.

NANCE, S. T. How to find, recruit and maintain rare blood donors. **Current opinion in hematology**, v. 16, n. 6, p. 503–508, 2009.

NG, E. S. et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells as spin embryoid bodies and a description of the hematopoietic blast colony forming assay. **Current Protocols in Stem Cell Biology**, n. SUPPL. 4, p. 1–23, 2008.

NIU, X. et al. Combining single strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in beta-thalassemia-induced pluripotent stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 32, p. 16576–16585, 2016.

OCHI, K. et al. Multicolor Staining of Globin Subtypes Reveals Impaired Globin Switching During Erythropoiesis in Human Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells Translational Medicine**, v. 3, n. 7, p. 792–800, 2014.

OLIVÈS, B. et al. **Kidd blood group and urea transport function of human erythrocytes are carried by the same protein**, 1995.

ORKIN, S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. **Nature reviews. Genetics**, v. 1, n. 1, p. 57–64, out. 2000.

PALIS, J. Ontogeny of erythropoiesis. **Current opinion in hematology**, v. 15, n. 3, p. 155–61, maio 2008.

PEYRARD, T. et al. Banking of pluripotent adult stem cells as an unlimited source for red blood cell production: potential applications for alloimmunized patients and rare blood challenges. **Transfusion medicine reviews**, v. 25, n. 3, p. 206–16, jul. 2011.

PORTAL BRASIL. **Novas regras para doação de sangue no país são divulgadas.** Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2013/11/novas-regras-para-doacao-de-sangue-do-pais>>. Acesso em: 5 nov. 2016.

PRICHARD, J. C. Successful Case of Transfusion of Blood. **The Provincial Medical Journal**, p. 34, 1843.

SANKARAN, V. G.; NATHAN, D. G. Thalassemia: An overview of 50 years of clinical research. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 24, n. 6, p. 1005–1020, 2010.

SCHONEWILLE, H. **Red blood cell alloimmunization after blood transfusion.** Leiden, Holanda: Leiden University Press, 2008.

SCHONEWILLE, H.; VAN DE WATERING, L. M. G.; BRAND, A. Additional red blood cell alloantibodies after blood transfusions in a nonhematologic alloimmunized patient cohort: Is it time to take precautionary measures? **Transfusion Practice**, v. 46, n. 4, p. 630–635, 2006.

SEIFINEJAD, A. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from a Bombay individual: moving towards “universal-donor” red blood cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 391, n. 1, p. 329–34, 1 jan. 2010.

SEKI, T.; FUKUDA, K. Methods of induced pluripotent stem cells for clinical application. **World journal of stem cells**, v. 7, n. 1, p. 116–125, 2015.

SILVY, M. et al. A simple genotyping procedure without DNA extraction to identify rare blood donors. **Vox Sanguinis**, v. 109, n. 2, p. 173–180, 2015.

SIMÕES, B. DE J. (COORD. .; GENOVEZ, G. (COORD. . **Caderno de Informação - Sangue e Hemoderivados.** 1ª ed. Brasília - DF: Ministério da Saúde, 2014.

SMITH-WHITLEY, K.; THOMPSON, A. A. Indications and complications of transfusions in sickle cell disease. **Pediatr Blood Cancer**, v. 59, p. 358–364, 2012.

SOLDNER, F.; JAENISCH, R. iPSC Disease Modeling. **Science**, v. 338, n. 6111, p. 1155–1156, 2012.

SPLENDRE, A. Para que existem as regras de nomenclatura genética? **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 27, n. 2, p. 148–152, 2005.

STOWELL, S. R. et al. Initiation and regulation of complement during hemolytic transfusion reactions. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 12, 2012.

SU, R. J. et al. Efficient Generation of Integration-Free iPS Cells from Human Adult Peripheral

Blood Using BCL-XL Together with Yamanaka Factors. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

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

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–76, 25 ago. 2006.

TEOH, H.-K.; CHEONG, S.-K. Induced pluripotent stem cells in research and therapy. **The Malaysian journal of pathology**, v. 34, n. 1, p. 1–13, jun. 2012.

THOMSON, J. A. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145–1147, 6 nov. 1998.

TOURNAMILLE, C. et al. Disruption of a GATA motif in the Duffy gene promoter abolishes erythroid gene expression in Duffy-negative individuals. **Nature Genetics**, v. 10, p. 196–201, 1995.

TRAKARNSANGA, K. et al. Induction of adult levels of γ -globin in human erythroid cells that intrinsically express embryonic or fetal globin by transduction with KLF1 and BCL11A-XL. **Haematologica**, v. 99, n. 11, p. 1677–1685, 2014.

WEPPELMANN, T. A et al. High frequency of the erythroid silent Duffy antigen genotype and lack of Plasmodium vivax infections in Haiti. **Malaria Journal**, v. 12, n. 1, p. 30, 2013.

WU, Y. et al. In situ genetic correction of F8 intron 22 inversion in hemophilia A patient-specific iPSCs. **Scientific Reports**, v. 6, p. 18865, 2016.

XU, C. Characterization and Evaluation of Human Embryonic Stem Cells. **Methods in Enzymology**, v. 420, n. 1999, p. 18–37, 2006.

YAZDANBAKHSH, K. et al. Molecular mechanisms that lead to reduced expression of Duffy antigens. **Transfusion**, v. 40, n. 3, p. 310–320, 2000.

YE, Z. et al. Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. **Blood**, v. 114, n. 27, p. 5473–5480, 2009.

YU, J. et al. Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequence. **Science**, v. 324, n. June, p. 797–802, 2009.

9 Anexos

9.1 Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP/USP):

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

Ribeirão Preto, 25 de junho de 2015

Ofício nº 2281/2015
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPS) A PARTIR DE CÉLULAS SOMÁTICAS DE INDIVÍDUOS COM FENÓTIPO DE INTERESSE PARA TRANSFUSÕES SANGÜÍNEAS"** - versão 3, de 25/05/2015, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - versão 2, de 10/04/2015, foram analisados pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 410ª Reunião Ordinária, realizada em 22/06/2015 e enquadrados na categoria: **APROVADO**, de acordo o Processo HCRP nº 2058/2015.

Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

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 (ICH-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,

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

Ilustríssimos Senhores
DRª. SIMONE KASHIMA HADDAD (Orientadora)
LUCAS FERIOLI CATELLI
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

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
PWA-0002733, IRB-00002106 e Registro PEICONEP nº 5440
(16) 3622-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

9.2 Aprovação do projeto de pesquisa comissão interna de biossegurança da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio/FUNDHERP):

Fundação
Hemocentro RP

Ribeirão Preto, 13 de outubro de 2015.

O projeto de pesquisa intitulado "Geração de Células-Tronco Pluripotentes induzidas (Ips) a partir de células somáticas de indivíduos com fenótipo de interesse para transfusões sanguíneas", em nome de Lucas Catelli, técnico principal Profa. Dra. Simone Kashima Haddad, foi avaliado por esta Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) e pela CTNBio, recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2014.019-02**.

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

Simone Kashima Haddad
Presidente da CIBio
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

PR12T-PBC 1 RUA TEN. CATÃO ROXO * 2501 - CEP 14051-142 - RIBEIRÃO PRETO - SP - FONE (16) 2101-8300 - FAX (16) 2101-8309
CNPJ 00.255.795/0001-22 - INSCR. EST. : 66204

9.3 Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA/FUNDHERP)

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo 13.1.394.53.4), intitulado "Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) humanas", de autoria de **Simone Kashima Haddad**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04/11/2013.

Colaboradores: Aline Fernanda Ferreira, Cleide Lúcia Araújo Silva, Dimas Tadeu Covas, Isabela Gerdes Gyuricza, Lucas Eduardo Botelho, Thatiane Maistro Malta Pereira e Virgínia Picança Castro.

This is to certify that the work (Protocol number 13.1.394.53.4), entitled: "Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) humanas", by **Simone Kashima Haddad** is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, November, 4 2013.

Ribeirão Preto, 18 de novembro de 2013.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Vanessa Bombonato Garcia