UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

BÁRBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES

**Geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e
progenitores eritroides a partir de células-tronco de
pluripotência induzida derivadas de pacientes com anemia
falciforme**

Ribeirão Preto
2018

BÁRBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES

**Geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e
progenitores eritroides a partir de células-tronco de
pluripotência induzida derivadas de pacientes com anemia
falciforme**

**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)**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Células-Tronco e
Terapia Celular

Orientadora: Profa. Dra. Virgínia Picanço e
Castro

Ribeirão Preto

2018

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.

Paes, Bárbara Cristina Martins Fernandes

Geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides a partir de células-tronco de pluripotência induzida derivadas de pacientes com anemia falciforme. Ribeirão Preto, 2018.

111 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular.

Orientadora: Castro, Virgínia Picanço e.

1. Diferenciação hematopoética. 2. iPSC. 3. Diferenciação eritroide. 4. In vitro. 5. Anemia falciforme.

Nome: PAES, Bárbara Cristina Martins Fernandes

Título: Geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides a partir de células-tronco de pluripotência induzida derivadas de pacientes com anemia falciforme

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Células-Tronco e Terapia Celular

Aprovado em: 18/10/2018

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Alexandre Panepucci

Instituição: FUNDHERP (FMRP)

Julgamento: _____

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha

Instituição: UFSCar - Externo

Julgamento: _____

Prof. Dr. Luiza Cunha Junqueira Reis

Instituição: HCFMRP - Externo

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rita e João Roberto, e meu irmão, Rodrigo, por me darem o exemplo de dedicação e trabalho, e o suporte e incentivo para a realização dos meus objetivos.

Ao Pablo pelo companheirismo e por estar presente em todos os momentos, sejam eles de vitórias ou de superação das derrotas.

À professora Virgínia Picanço e Castro pela oportunidade, confiança e orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia, Laboratório de Transferência Gênica, Laboratório de Terapia Celular e Laboratório de Biologia Molecular pela convivência e ajuda na realização deste trabalho. Em especial à Luiza por tudo que me ensinou, pelo auxílio no desenvolvimento teórico e prático deste trabalho.

A todos os pesquisadores, alunos e funcionários do Hemocentro. Em especial à Patrícia Bonini e Camila Menezes pelo auxílio na elaboração de experimentos e análises por citometria de fluxo, e à Carmen Simão por estar sempre disposta a ajudar.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo conhecimento científico adquirido ao longo do curso de pós-graduação.

À secretaria do programa pela ajuda com os assuntos burocráticos relacionados ao programa.

À FAPESP (Processo número 2016/08373-9) pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

Aos membros da banca por se disponibilizarem a avaliar este trabalho.

E a todos que não nomeei, mas estiveram envolvidos direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

PAES, Bárbara Cristina Martins Fernandes. **Geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides a partir de células-tronco de pluripotência induzida derivadas de pacientes com anemia falciforme**. 2018. 111 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

As células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) são células geradas a partir da reprogramação de células somáticas e têm potencial para diferenciação em todos os tipos celulares do organismo adulto. A indução da diferenciação de iPSC paciente-específico em células hematopoéticas é uma forma de estudo da hematopoese em modelos de doenças, como a anemia falciforme, e também essencial para o desenvolvimento de terapias. O presente estudo propôs a geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides *in vitro* a partir de iPSC derivadas de pacientes com anemia falciforme através da formação de corpos embrioides. Ao longo da diferenciação, os desenvolvimentos hematopoético e eritroide foram monitorados através de ensaios de formação de colônia e imunofenotipagem por citometria de fluxo. Neste estudo, geramos células com características de células-tronco/progenitoras hematopoéticas, de fenótipos CD34⁺CD45⁺ e CD45⁺CD43⁺, progenitores eritroides (CD36⁺, CD71⁺ e CD235a⁺), bem como a formação de colônias hematopoéticas em cultura em meio semi-sólido. A linhagem de iPSC PBscd08 demonstrou maior potencial para diferenciação em células hematopoéticas e eritroide que as demais linhagens celulares avaliadas. A linhagem PBscd01, também gerada a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de paciente com anemia falciforme, não demonstrou o mesmo potencial para a diferenciação hematopoética, gerando apenas células CD34⁺ e baixa porcentagem de células CD45⁺ e CD43⁺. A linhagem de iPSC PB12, gerada a partir de PBMC de indivíduo saudável, promoveu a geração de populações de células CD34⁺, CD45⁺ e CD43⁺, mas não duplo-positivas, e a geração de células com morfologia de células mieloides após a maturação. As linhagens celulares de iPSC demonstraram variabilidade quanto ao potencial de diferenciação hematopoética. Isto mostra a necessidade de estudos futuros para uma investigação mais detalhada.

Palavras-chave: Diferenciação hematopoética. iPSC. Diferenciação eritroide. *In vitro*. Anemia falciforme.

ABSTRACT

PAES, Bárbara Cristina Martins Fernandes. **Generation of hematopoietic stem/progenitor cells and erythroid progenitor cells from induced pluripotent stem cells derived from patients with sickle cell anemia.** 2018. 111 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

Induced pluripotent stem cells (iPSC) are cells generated by reprogramming somatic cells, they have the potential for differentiation into all types of cells in the adult organism. The differentiation of patient-specific iPSC into hematopoietic cells is a way of studying hematopoiesis in disease models, such as sickle cell anemia, and is also essential for the development of therapies. The present study proposed the generation of hematopoietic stem/progenitor cells and erythroid progenitors from iPSC derived from patients with sickle cell anemia. Throughout the differentiation, hematopoietic and erythroid developments were monitored by colony forming cell assay and immunophenotypic analysis. In this study, we generated cells with characteristics of hematopoietic stem/progenitor cells, of CD34⁺CD45⁺ and CD45⁺CD43⁺ phenotypes, erythroid progenitors (CD36⁺, CD71⁺ and CD235a⁺), as well as the formation of hematopoietic colonies in culture in semi-solid medium. The iPSC line PBscd08 demonstrated greater potential for differentiation into hematopoietic and erythroid cells than the other cell lines evaluated. The iPSC line PBscd01, also generated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with sickle cell anemia, did not demonstrate the same potential for hematopoietic differentiation, generating only CD34⁺ cells and a low percentage of CD45⁺ and CD43⁺ cells. The iPSC line PB12, generated from healthy individual PBMC, promoted the generation of CD34⁺, CD45⁺ and CD43⁺ cell populations, but not double-positives, and the generation of cells with myeloid cell morphology after maturation. The iPSC cell lines demonstrated variability in the potential for hematopoietic differentiation. This shows the need for future studies for a more detailed investigation.

Keywords: Hematopoietic differentiation. iPSC. Erythroid differentiation. *In vitro*. Sickle cell anemia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma com os passos e análises realizados neste projeto	32
Figura 2 – Esquema da diferenciação hematopoética de células-tronco pluripotentes	35
Figura 3 – Esquema da indução da diferenciação hematopoética por formação de corpos embrioides	36
Figura 4 – Morfologia das colônias de células-tronco pluripotentes das quatro linhagens	42
Figura 5 – Morfologia das colônias de células-tronco pluripotentes ao longo das passagens por isolamento enzimático	43
Figura 6 – Caracterização das linhagens de célula-tronco pluripotentes.....	44
Figura 7 – Formação de corpos embrioides – Meio STEMdiff APEL 2	45
Figura 8 – Formação de corpos embrioides – Meio SFM	46
Figura 9 – Formação de corpos embrioides não uniformes – Meio SFM	47
Figura 10 – Formação de corpos embrioides não uniformes – Meio STEMdiff APEL 2	47
Figura 11 – Cultura dos corpos embrioides em meio STEMdiff APEL 2.....	48
Figura 12 – Cultura dos corpos embrioides em meio SFM	48
Figura 13 – Caracterização das linhagens celulares quanto aos marcadores de pluripotência	49
Figura 14 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd01 – CD31, CD144	50
Figura 15 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD31, CD144	51
Figura 16 – Imunofenotipagem das células da linhagem H1 – CD34	52
Figura 17 – Imunofenotipagem das células da linhagem PB12 – CD34.....	53
Figura 18 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd01 – CD34	54
Figura 19 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD34	54
Figura 20 – Imunofenotipagem das células das quatro linhagens celulares – CD34	55
Figura 21 – Imunofenotipagem das células da linhagem H1 – CD45	56
Figura 22 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd01 – CD45	56
Figura 23 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD45	57
Figura 24 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD34CD45	57
Figura 25 – Imunofenotipagem das células da linhagem H1 – CD43	58
Figura 26 – Imunofenotipagem das células da linhagem PB12 – CD43.....	59

Figura 27 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd01 – CD43	59
Figura 28 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD43	60
Figura 29 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD43CD45	61
Figura 30 – Ensaio de formação de colônia das células da linhagem PB12	63
Figura 31 – Ensaio de formação de colônia das células da linhagem PBscd01	63
Figura 32 – Ensaio de formação de colônia das células da linhagem PBscd08 previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2.....	64
Figura 33 – Ensaio de formação de colônia das células da linhagem PBscd08 previamente cultivadas em meio SFM	65
Figura 34 – Cultivo das células da linhagem H1 em meio de maturação	70
Figura 35 – Cultivo das células da linhagem PB12 em meio de maturação	71
Figura 36 – Coloração com Leishman das células após a maturação.....	72
Figura 37 – Cultivo das células da linhagem PBscd01 em meio de maturação	73
Figura 38 – Cultivo das células da linhagem PBscd08 em meio de maturação	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coletas de células realizadas ao longo da diferenciação hematopoética	52
Tabela 2 – Ensaio de formação de colônias em metilcelulose	62
Tabela 3 – Coletas de células do sobrenadante realizadas ao final da diferenciação hematopoética	66
Tabela 4 – Expansão e porcentagem de células viáveis no sobrenadante	66
Tabela 5 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem H1 coletadas do sobrenadante	67
Tabela 6 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PB12 coletadas do sobrenadante	67
Tabela 7 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PBscd01 coletadas do sobrenadante	68
Tabela 8 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PBscd08 coletadas do sobrenadante	68
Tabela 9 – Experimentos de maturação das células previamente cultivadas em dois meios de diferenciação	69
Tabela 10 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem H1 coletadas após a maturação.....	75
Tabela 11 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PB12 coletadas após a maturação.....	76
Tabela 12 – Caracterização imunofenotípica para marcadores eritroides das células da linhagem PB12 coletadas após a maturação	77
Tabela 13 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PBscd01 coletadas após a maturação	77
Tabela 14 – Caracterização imunofenotípica para marcadores hematopoéticos das células da linhagem PBscd08 coletadas após a maturação	78
Tabela 15 – Caracterização imunofenotípica para marcadores eritroides das células da linhagem PBscd08 coletadas após a maturação	79
Tabela 16 – Caracterização imunofenotípica da linhagem H1 em meio STEMdiff APEL 2	104
Tabela 17 – Caracterização imunofenotípica da linhagem H1 em meio SFM	104
Tabela 18 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PBscd01 em meio STEMdiff APEL 2	104

Tabela 19 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PBscd01 em meio SFM104	
Tabela 20 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PBscd08 em meio STEMdiff	
APEL 2	105
Tabela 21 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PBscd08 em meio SFM105	
Tabela 22 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PB12 em meio STEMdiff	
APEL 2	105
Tabela 23 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PB12 em meio SFM	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM	aorta-gônada-mesonefros
APC	do inglês, <i>allophycocyanin</i>
BFU-E	do inglês, <i>Erythroid Burst Colony-Forming Unit</i>
BMP4	proteína óssea morfogenética-4
CFU-E	do inglês, <i>Erythroid Colony-Forming Unit</i>
CFU-GEMM	do inglês, <i>Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte Colony-Forming Unit</i>
CFU-GM	do inglês, <i>Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Unit</i>
CTE	células-tronco embrionárias
CTH	células-tronco hematopoéticas
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EPO	eritropoietina
FGF2	fator de crescimento de fibroblasto
FITC	do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
Hb	hemoglobina
HbA	hemoglobina adulta
HbS	hemoglobina falciforme
IL-3	interleucina 3
iPSC	células-tronco de pluripotência induzida
KDR	do inglês, <i>kinase insert domain receptor</i>
LMPP	do inglês, <i>lymphoid-primed multipotent progenitor</i>
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
PBS	tampão fosfato salino
PE	do inglês, <i>phycoeritrin</i>
PerCP	do inglês, <i>peridinin chlorophyll</i>
PI	iodeto de propídeo
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
PVA	polivinil álcool

SCF	fator de células-tronco
SFM	meio de diferenciação sem soro
TPO	trombopoietina
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

β	beta
mg/mL	miligrama por mililitro
mmol/L	milimol por litro
mM	milimolar
mL	mililitro
μ L	microlitro
$^{\circ}$ C	graus Celsius
min	minutos
μ M	micromolar
x <i>g</i>	vezes gravidade
μ L	microlitro
μ g/mL	micrograma por mililitro
ng/mL	nanograma por mililitro
RPM	rotações por minuto
μ m	micrômetro
G	gauge
células/mL	células por mililitro
U/mL	unidade por mililitro
mm	milímetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	Hematopoese	17
1.1.1	Desenvolvimento do sistema hematopoético	17
1.1.2	Célula-tronco hematopoética.....	19
1.2	Diferenciação hematopoética <i>in vitro</i>.....	22
1.3	Anemia falciforme	26
2	OBJETIVOS	30
2.1	Objetivo geral.....	30
2.2	Objetivos específicos.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1	Células-tronco pluripotentes.....	32
3.1.1	Cultivo e expansão das células-tronco pluripotentes	33
3.1.2	Isolamento enzimático das células-tronco pluripotentes	34
3.1.3	Contagem de células em câmara de Neubauer	34
3.2	Diferenciação hematopoética.....	34
3.2.1	Formação de corpos embrioides	35
3.2.2	Coleta dos corpos embrioides e células do sobrenadante.....	36
3.2.3	Maturação das células-tronco/progenitoras hematopoéticas	37
3.3	Caracterização das células após a diferenciação hematopoética.....	37
3.3.1	Análises morfológicas.....	37
3.3.2	Avaliação do potencial clonogênico das células em metilcelulose.....	38
3.3.3	Imunofenotipagem por citometria de fluxo	38
3.3.4	Cytospin e coloração de Leishman	39
3.4	Análise estatística	40
4	RESULTADOS	42
4.1	Morfologia das células-tronco pluripotentes.....	42

4.2	Morfologia e imunofenotipagem das células-tronco pluripotentes após isolamento enzimático	42
4.3	Morfologia dos corpos embrioides.....	44
4.4	Análise imunofenotípica dos corpos embrioides	49
4.4.1	Marcadores de pluripotência	49
4.4.2	Marcadores endoteliais	49
4.4.3	Marcadores hematopoéticos	51
4.4.3.1	<i>Marcador CD34</i>	<i>52</i>
4.4.3.2	<i>Marcador CD45</i>	<i>55</i>
4.4.3.3	<i>Marcador CD43</i>	<i>58</i>
4.5	Ensaio de formação de colônia após a diferenciação hematopoética	61
4.6	Análise imunofenotípica das células do sobrenadante.....	65
4.7	Maturação das células-tronco progenitoras hematopoéticas	68
4.7.1	Morfologia das células em meio de maturação	69
4.7.2	Análise imunofenotípica das células após a maturação.....	75
5	DISCUSSÃO	81
6	CONCLUSÃO	94
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	96
	APÊNDICE.....	104
	ANEXOS	107

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hematopoese

1.1.1 Desenvolvimento do sistema hematopoético

A hematopoese é o processo de formação dos componentes celulares do sangue que ocorre durante o desenvolvimento embrionário e ao longo da vida adulta. Em embriões no estágio de blastocisto, as células pluripotentes da massa celular interna segregam primeiramente em endoderme primitivo e no epiblasto. A porção posterior do epiblasto origina a estrutura transiente chamada de fenda primitiva (LIU et al., 2015; ROSSANT; TAM, 2009). As células do epiblasto ingressam na fenda primitiva dando origem a mesoderme e endoderme definitiva. A subpopulação de células da mesoderme com potencial hematoendotelial coexpressam o gene *brachyury* e o gene para o receptor KDR (do inglês, *kinase insert domain receptor*) e são encontradas com alta frequência na região posterior da fenda primitiva, indicando que os estágios iniciais do comprometimento hematopoético e vascular das células ocorre antes do desenvolvimento das ilhotas sanguíneas no saco vitelino (HUBER et al., 2004; SLUKVIN, 2013).

A primeira atividade hematopoética se dá com o aparecimento de ilhotas sanguíneas na mesoderme do saco vitelino. Uma rede de agregados de células da mesoderme se desenvolve logo após a gastrulação na região extraembrionária. Neste agregado homogêneo, células da periferia adquirem a morfologia e marcadores de células endoteliais, enquanto células internas desaparecem para permitir a abertura de um lúmen. Agrupamentos de células da mesoderme primitiva que permanecem aderidos ao recém-formado endotélio vascular são chamados de ilhotas sanguíneas e são a origem da hematopoese extraembrionária (TAVIAN; PEULT, 2005). As células sanguíneas produzidas no saco vitelino são, predominantemente, eritrócitos nucleados que sintetizam hemoglobinas embrionárias e são denominados de primitivos (BOISSET et al., 2010; LIU et al., 2015; MEDVINSKY; DZIERZAK, 1996). A produção de células do sangue restrita as linhagens eritroide, megacariócito e macrófago no saco vitelino ocorre na ausência de progenitores mais imaturos, observados na hematopoese no organismo adulto (GODIN, 2016).

A coexpressão da molécula de superfície CD34 pelas células hematopoéticas das ilhotas sanguíneas e pelas células endoteliais adjacentes é consistente com a existência de um precursor hemangioblasto comum para as linhagens sanguínea e endotelial (TAVIAN; PEAULT, 2005). Florence Sabin postulou, em 1917, a existência de um precursor comum de células sanguíneas e endoteliais baseada na observação do desenvolvimento hematopoético em saco vitelino de embriões de galinha (SABIN, 2002). Esse precursor comum foi nomeado hemangioblasto por Murray, em 1932, que o definiu como agregados de mesoderme no saco vitelino no qual se desenvolvem células hematopoéticas e endoteliais (MURRAY, 1932). Em 2009, Lacrin et al. demonstraram que o hemangioblasto dá origem a células hematopoéticas através de um intermediário endotélio hemogênico (LANCRIN et al., 2009). Recentemente, tornou-se claro que a atividade do hemangioblasto representa um grupo muito heterogêneo de progenitores, que incluem células no estágio mesodermal do desenvolvimento no saco vitelino e células com características típicas endoteliais na região aorta-gônada-mesonefros (AGM) (SLUKVIN, 2013).

A hematopoese passa de extraembrionária para intraembrionária, ocorrendo na região AGM, onde precursores da hematopoese definitiva e células-tronco hematopoéticas (CTH) são gerados do endotélio hemogênico através da transição endotelial-hematopoética (BOISSET et al., 2010; LIU et al., 2015; MEDVINSKY; DZIERZAK, 1996). A existência de um endotélio hemogênico é corroborada por estudos demonstrando que em embriões humanos, células endoteliais localizadas na porção ventral da aorta dorsal apresentam morfologia distinta daquelas células do endotélio localizadas na porção dorsal. Na porção ventral, a camada de células endoteliais ao longo do lúmen da aorta é interrompida e substituída por populações de células arredondadas e a frequência dessas células na região AGM está diretamente correlacionada com a atividade hematopoética desta região (TAVIAN et al., 2010). Estudos de imagem conduzidos em camundongos *in vivo* demonstraram que a transição endotelial-hematopoética representa um processo contínuo no qual células endoteliais gradualmente adquirem morfologia e fenótipo hematopoéticos. Embora o conceito de endotélio hemogênico tenha sido inicialmente baseado em estudos da região AGM, tornou-se claro que o endotélio em outros sítios embrionários e extraembrionários possuem potencial hemogênico (SLUKVIN, 2013). No entanto, a maioria das células endoteliais no embrião não são hemogênicas. A expressão dos

antígenos de superfície CD31, CD34 e KDR é compartilhada por células endoteliais e hematopoéticas. Estágios intermediários do desenvolvimento entre as células endoteliais aderentes e células hematopoéticas semi-aderidas têm sido identificados através do aumento da expressão de c-Kit, CD41 e CD45 (ANTAS et al., 2013). Ditadi et al. (2015) demonstraram, em ensaios *in vitro* de diferenciação de células-tronco pluripotentes, que as células com potencial hemogênico estão restritas a fração $CD34^+CD73^-CD184^-$ e que dependem da via de sinalização NOTCH para gerar células com potencial multilinhagem através da transição endotelial-hematopoética. Os progenitores vasculares endoteliais são segregados na fração $CD34^+CD73^{med}CD184^+$ e $CD34^+CD73^{hi}CD184^-$ e não possuem potencial hemogênico.

O endotélio hemogênico isolado em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário possui potencial hematopoético distinto. O endotélio hemogênico de fases mais iniciais do desenvolvimento geram progenitores eritroides e mieloides, já aqueles de fases mais avançadas do desenvolvimento, como da região AGM, dão origem a CTH com potencial multilinhagem (ANTAS et al., 2013). Isso significa que os dois programas da hematopoese embrionária: primitivo e definitivo, ocorrem através de um intermediário endotélio hemogênico. Sturgeon et al. (2014) distinguiram esse intermediário através da expressão de CD235a, em que os progenitores primitivos são caracterizados por $KDR^+CD235a^+CD34^-CD144^-$ e os progenitores definitivos são caracterizados por $KDR^+CD235a^-CD34^-CD144^-$, e que esta especificação requer a sinalização da via Wnt- β -catenin.

As primeiras CTH de longa duração são geradas na região AGM, entram na circulação sanguínea e migram para o fígado fetal para realizarem a expansão e diferenciação em todas as linhagens sanguíneas. A transição da produção de globinas embrionárias para fetais ocorre no fígado fetal, resultando na eritropoiese definitiva e na produção de eritrócitos enucleados. A produção de células hematopoéticas passa a ocorrer também no timo e no baço, até que se intensifica na medula óssea, gerando a hematopoese definitiva pós-natal (TAVIAN; PEULT, 2005).

1.1.2 Célula-tronco hematopoética

Células-tronco hematopoéticas são células multipotentes e autorrenováveis, capazes de gerar todas as células das linhagens sanguíneas de um organismo adulto (JAGANNATHAN-BOGDAN; ZON, 2013). As CTH se desenvolvem durante a

embriogênese em um complexo processo que envolve múltiplos sítios anatômicos. Elas migram por diversos nichos embrionários, como: o saco vitelino, a região da aorta-gônada-mesonefros, a placenta e o fígado fetal, e, finalmente, para a medula óssea no nascimento. O nicho hematopoético na medula óssea auxilia na regulação da capacidade de autorrenovação e diferenciação das CTH, conservando o potencial multipotente desta célula ao longo das divisões celulares, enquanto sua progênie é direcionada para linhagens específicas. A maioria das CTH adultas são quiescentes e raramente se dividem, apenas para manter a quantidade necessária de células do sangue e para renovar o *pool* de CTH (MIKKOLA; ORKIN, 2006).

As CTH podem ser classificadas em duas subpopulações: as CTH de longa duração e de curta duração. As CTH de longa duração são uma população rara de células quiescentes na medula óssea que possui a habilidade de reconstituição permanente quando transplantadas em recipientes irradiados com dose letal. No entanto, quando expostas a um estímulo, essas células se reativam, saindo do estado quiescente e entrando no ciclo celular. As CTH de curta duração possuem uma habilidade de reconstituição curta, elas se diferenciam em progenitores multipotentes e não tem a mesma capacidade de autorrenovação que as CTH de longa duração (ZHANG et al., 2018).

O marcador mais importante para células hematopoéticas primitivas humanas é a proteína de superfície CD34. O antígeno CD34 é expresso na superfície de 1-5% das células nucleadas da medula óssea, 1% de células do cordão umbilical e menos de 0,1% de células do sangue periférico. A maioria das CTH são CD34⁺ e tem sua expressão diminuída conforme ocorre a diferenciação em células mais especializadas. No entanto, apenas a expressão de CD34 não é uma forma precisa de quantificar as CTH, marcadores adicionais são necessários para a identificação e isolamento desta população específica de células (WOGNUM; SZILVASSY, 2015). Atualmente, a população de CTH da medula óssea pode ser identificada pelo perfil Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻ (LIU et al., 2015). A ausência da expressão dos antígenos Lin pela CTH possibilita a sua separação das demais populações de células hematopoética, como: eritrócitos, granulócito, macrófagos, células NK, e linfócitos B e T. Também é possível separar as CTH através da ausência da expressão dos antígenos CD38 e CD45RA, geralmente expressos em células mais maduras (WOGNUM; SZILVASSY, 2015).

Os progenitores multipotentes se diferenciam em progenitores oligopotentes, que são: as células progenitoras linfóide comum e progenitoras mieloide comum, que estão comprometidas com determinada linhagem. As células oligopotentes progenitoras mieloide comum dão origem aos progenitores granulócito-monócito, e aos progenitores megacariócito-eritroide (DOULATOV et al., 2012; WOGNUM; SZILVASSY, 2015). Progenitores mielóides, células progenitoras mieloide comum, progenitores granulócito-monócito e progenitores megacariócito-eritroide, foram isolados baseados na expressão de CD123 ou CD135, e CD45RA (DOULATOV et al., 2010; MANZ et al., 2002). Os progenitores mielóides, mas não os eritroides, expressam CD123 e CD135 e a transição de progenitores mieloide comum para progenitores granulócito-monócito é marcada pela aquisição de CD45RA. Progenitores mieloide comum de fenótipo $CD135^+CD45RA^-$ produzem, *in vitro* e após transplante, todas as células da linhagem mieloide, mas não da linfóide (DOULATOV et al., 2012). Entre os marcadores presentes nos progenitores eritroides estão: CD71, que é o receptor de transferrina 1, essencial para captura de ferro e consequentemente para síntese de hemoglobina durante a diferenciação eritroide; e CD235a, a glicoforina A, que é um marcador específico de células eritroides e é expresso em precursores, desde o proeritroblasto até eritrócitos (MACRÌ et al., 2015). Nos últimos estágios da diferenciação eritroide, eritroblastos ortocromáticos expulsam seu núcleo e migram da medula óssea para a corrente sanguínea, na forma de reticulócitos circulantes, e finalmente se tornam eritrócitos maduros (ZEUNER et al., 2012).

Apesar de considerarmos as CTH como populações homogêneas por compartilharem marcadores de superfície e terem o mesmo potencial de diferenciação, recentes análises epigenômicas e transcriptômicas de células individualizadas têm evidenciado a heterogeneidade das CTH. Esses estudos indicam uma preferência na produção de linhagens específicas e que esta segregação das linhagens ocorre logo no início da hematopoese (ZHANG et al., 2018). Ao contrário do que se pensava, esse processo não é exatamente realizado de forma gradual a partir da diferenciação de progenitores multipotentes até uma das possíveis linhagens hematopoéticas. Boyer et al. (2011) e Adolfsson et al. (2005) demonstraram que uma subpopulação de CTH com alta expressão do gene *flt3* foi definida como LMPP (do inglês, *lymphoid-primed multipotent progenitor*) gerando, preferencialmente, células

da linhagem linfoide.

1.2 Diferenciação hematopoética *in vitro*

A medula óssea, o sangue de cordão umbilical e o sangue periférico são fontes de CTH. No entanto, a população de CTH nestes sítios é bastante rara, o que é um obstáculo para o seu isolamento e estudo. A expansão desta célula *in vitro* também apresenta obstáculos, principalmente quanto a manutenção do potencial de diferenciação destas células após expansão (DORN et al., 2015). Mas a diferenciação hematopoética *in vitro* para a obtenção de CTH, progenitores hematopoéticos e células maduras do sangue pode ser realizada a partir de células-tronco pluripotentes.

Células-tronco embrionárias (CTE) são células pluripotentes estabelecidas da massa celular interna de embriões em estágio de blastocisto, e são capazes de autorrenovação e de dar origem aos três folhetos embrionários ectoderme, mesoderme e endoderme (LIM et al., 2013). As células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) possuem propriedades semelhantes às células-tronco embrionárias, ou seja, a autorrenovação e a habilidade de se diferenciar em todas as células dos três folhetos embrionários. Por serem obtidas a partir de células somáticas do próprio organismo, estas células pluripotentes contornam os problemas éticos e práticos enfrentados pelo uso das células-tronco embrionárias (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). A expressão dos transgenes *oct4*, *sox2*, *klf4* e *c-Myc* para a geração de iPSC pode ser feita em células mononucleares do sangue periférico (PBMC), sendo este uma fonte acessível de células somáticas (STAERK et al., 2010). As células mononucleares de cordão umbilical ou de sangue periférico podem ser facilmente obtidas de estoques de sangue já existentes ou de amostras recém colhidas, para então serem reprogramadas (CHOU et al., 2015).

Enquanto a eficiente geração *de novo* de CTH permanece um desafio, progressos para a derivação de linhagens hematopoéticas a partir da diferenciação hematopoética de células-tronco pluripotentes estão sendo realizados (VO; DALEY, 2015). A maioria dos protocolos para a diferenciação de CTE e iPSC dependem da adição de citocinas para a indução da mesoderme e da diferenciação ocorrendo em corpos embrioides, seguida pelo direcionamento para a linhagem eritroide, mieloide ou linfoide. Os corpos embrioides são estruturas esféricas formadas por células-tronco pluripotentes quando cultivadas em placas de baixa aderência. Eles abrigam o

desenvolvimento de células dos três folhetos embrionários. A interação célula-célula favorece a diferenciação celular e dispensa o uso de células alimentadoras. Este método de diferenciação também permite o uso de meios sem soro permissíveis aos efeitos de citocinas e fatores de crescimentos que virão a ser adicionados (DORN et al., 2015; LAPILLONNE et al., 2010; NAKAGAWA et al., 2014; YE et al., 2014). Para maior eficiência, desenvolveu-se a técnica de formação de corpos embrioides por centrifugação, na qual um número definido de células-tronco pluripotentes é agregado através de centrifugação em placas de baixa aderência (NG et al., 2008).

Durante a diferenciação de CTE, células hematopoéticas são derivadas de precursores CD45⁻ que coexpressam os marcadores CD31 e CD34. Também já foram reportadas populações imaturas de células endoteliais responsáveis por dar origem a hematopoese a partir de CTE (BHATIA, 2007). Wang et al. (2004) demonstraram que uma população rara de células no corpo embrioide foi capaz de dar origem a linhagem endotelial e hematopoética, sugerindo propriedades de hemangioblasto. Essas descobertas recapitulam as observações feitas em embriões humanos.

Diversas combinações de citocinas e fatores de crescimento têm sido relatadas para a realização da indução mesodérmica, hematopoética e eritroide de células-tronco pluripotentes. A proteína óssea morfogenética-4 (BMP4) é membro da superfamília de TGF- β que secretam moléculas de sinalização. Ela regula a proliferação celular, diferenciação, apoptose e a determinação do destino das células no desenvolvimento dos mamíferos. BMP4 é uma molécula de sinalização crítica para a diferenciação no embrião e o estabelecimento do eixo dorsal-ventral. Mais especificamente, BMP4 regula o comprometimento das células da mesoderme para a linhagem hematopoética. Mais tarde na embriogênese, a proteína é expressa na região AGM, onde CTH emergem. Evidências de que a BMP4 dá suporte a CTH definitivas vem de análises de população CD34⁺CD38⁻ de CTH de sangue de cordão cultivadas na presença de BMP4. BMP4 aumentou a atividade de formação de colônias dessas células bem como a capacidade de repopulação em animais imunodeficientes (GOLDMAN et al., 2009). Estudos têm demonstrado que a adição de BMP4 durante a formação dos corpos embrioides é suficiente para a formação de mesoderme. A combinação de BMP4 com os fatores de crescimento VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), SCF (fator de células-tronco) e FGF2 (fator de

crescimento de fibroblasto) é capaz dar origem as células hematopoéticas a partir de CTE (PICK et al., 2007).

O VEGF possui funções no desenvolvimento vascular, regulando a proliferação, diferenciação, migração e apoptose de células endoteliais precursoras e maduras. A expressão de VEGF é aumentada em CTH e a presença do seu receptor VEGFR-2 (KDR) é considerada um marcador de CTH pluripotentes (DUFFY; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2013).

Estudos têm demonstrado que BMP4, VEGF e FGF2 promovem a diferenciação hematopoética e facilitam a geração de células CD34⁺ a partir de células-tronco pluripotentes (KENNEDY et al., 2007; ZHANG et al., 2008). Para verificar os efeitos desses fatores na geração de células CD34, várias combinações foram adicionadas ao meio de diferenciação sem soro. Análises por citometria de fluxo demonstraram que nem BMP4 sozinha, e nem a combinação de VEGF com FGF2 foram suficientes para promover a diferenciação. Já a presença dos três fatores, em determinadas concentrações, aumentou significativamente a diferenciação em células CD34⁺. A adição de BMP4 no início da diferenciação promoveu o aumento da população de células CD34⁺CD31⁺. Já os efeitos de VEGF e FGF2 no desenvolvimento de dessas células foram mais expressivos a partir do quarto dia da diferenciação (BAI et al., 2009).

O SCF é uma citocina que se liga ao receptor c-Kit (CD117). O SCF aumenta a sobrevivência de CTH *in vitro* e contribui para a autorrenovação e manutenção de CTH *in vivo*. As CTH de todos os estágios do desenvolvimento expressam níveis do receptor c-Kit. Esse receptor também é expresso em progenitores hematopoéticos, como, eritroblastos, mieloblastos e megacariócitos, e a sua expressão diminui conforme ocorre a maturação dessas células (DUFFY; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2013; FANG et al., 2007; LEE et al., 2013; LENNARTSSON; RÖNNSTRAND, 2012; YE et al., 2014).

A trombopoietina (TPO) atua principalmente na proliferação e diferenciação de megacariócitos imaturos. No entanto, estudos têm demonstrado o efeito da TPO na geração de progenitores mieloide e eritroides. A presença de TPO combinado com SCF e IL-3 (interleucina 3) ao meio de cultivo de células CD34⁺CD117^{low}CD38^{low} promoveu o aumento na produção de CFU-GM (do inglês, *Granulocyte-Macrophage*

Colony-Forming Unit), CFU-E (do inglês, *Erythroid Colony-Forming Unit*) e CFU-GEMM (do inglês, *Granulocyte, Erythroid, Macrophage, Megakaryocyte Colony-Forming Unit*) (KAUSHANSKY, 1997, 2006).

Embora o marcador CD34 possa identificar os progenitores hematopoéticos e CTH, na cultura de diferenciação de células-tronco pluripotentes, ele é expresso por uma variedade de tipos celulares, incluindo células endoteliais e células-tronco mesenquimais. Vodyanik, Thomson e Slukvin (2006) identificaram o antígeno CD43 como um marcador confiável que separa progenitores hematopoéticos formadores de colônia CD43⁺ de células endoteliais CD43⁻CD31⁺ e de células com características mesenquimais CD43⁻CD31⁻ (SLUKVIN, 2013).

Em inúmeros estudos, a diferenciação hematopoética de CTE e iPSC tem demonstrado uma relação muito próxima ao desenvolvimento hematopoético durante a embriogênese. Evidenciando o surgimento, inicialmente, de células Brachyury⁺ indicando a formação da fenda primitiva, células KDR⁺ representando a mesoderme hematopoética, e células CD34⁺CD43⁺CD45⁻ como precursores hematopoéticos e CD43⁺CD45⁺ como progenitores hematopoéticos (LIU et al., 2015). Consequentemente, as células hematopoéticas maduras obtidas ao final da diferenciação são células com fenótipo da hematopoese primitiva.

A continuação do estímulo para diferenciação de células-tronco/progenitoras hematopoéticas pela adição de determinadas citocinas permite o direcionamento da maturação dessas células em progenitores da linhagem mieloide e eritroide.

A IL-3 é um fator de crescimento hematopoético que atua no crescimento, proliferação e diferenciação de todas as linhagens hematopoéticas. Quando combinado com eritropoietina (EPO), em meio semi-sólido, promove o desenvolvimento de BFU-E (do inglês, *Erythroid Burst Colony-Forming Unit*) e CFU-E. A EPO é um hormônio necessário para a sobrevivência, crescimento, proliferação e diferenciação das células progenitoras eritroides. A sua presença durante a hematopoese estimula o desenvolvimento da linhagem eritroide (DUFFY; BOUCHIER-HAYES; HARMEY, 2013; FANG et al., 2007; LEE et al., 2013; LENNARTSSON; RÖNNSTRAND, 2012; YE et al., 2014).

Li et al. (2014) examinaram as mudanças na expressão de CD34, IL3-R, CD36, CD71, CD45 e CD235a durante os estágios iniciais da eritropoiese para a

caracterização de populações com potencial de geração de células eritroides. Eles verificaram que a capacidade de formação de colônia de BFU-E, caracterizadas por $CD45^+GPA^-IL-3R^-CD34^+CD36^-CD71^{low}$, era influenciada pela presença de SCF e EPO, enquanto as células CFU-E, caracterizadas por $CD45^+GPA^-IL-3R^-CD34^-CD36^+CD71^{high}$, necessitavam apenas de EPO.

A completa diferenciação de iPSC em eritrócitos capazes de maturação, enucleação e contendo hemoglobinas fetais foi reportada por Lapillonne et al. (2010). Os autores realizaram a diferenciação em dois passos: através da formação de corpos embrioides por 20 dias seguida pela maturação através da cultura com citocinas SCF, IL-3 e EPO por até 25 dias. Dorn et al. (2015) obtiveram células hematopoéticas e eritrócitos a partir de iPSC geradas de células-tronco hematopoéticas $CD34^+$ de cordão umbilical. Neste estudo foram obtidas células eritroides maduras, onde cerca de 96% expressaram CD235a, exibiram a morfologia bicôncava, e cerca de 21 a 29% eram células enucleadas com uma preferência para a produção de hemoglobina fetal. Kobari et al. (2012) demonstraram a completa maturação de células eritroides, ou seja, a expulsão do núcleo e a síntese de hemoglobinas adultas, derivadas de iPSC. Os resultados obtidos sugerem que a completa maturação de eritroides imaturos ocorre com a influência de um microambiente hematopoético adulto. Através de ensaios *in vivo*, eles demonstraram que células eritroides derivadas de iPSC podem adquirir características de células eritroides adultas (KOBARI et al., 2012). Estudos estão sendo realizados para a determinação das vias que estão envolvidas na determinação da hematopoese definitiva. Essas pesquisas proporcionariam a obtenção de células hematopoéticas maduras e CTH de longa duração com potencial multilinhagem (DITADI et al., 2015; SUGIMURA et al., 2017). O estabelecimento de estratégias eficientes de diferenciação hematopoética e eritroide, a partir de células-tronco de pluripotência induzida, possibilita termos a disposição células que poderão ser instrumento de estudos e terapias para diversas doenças.

1.3 Anemia falciforme

A doença falciforme é um grupo de condições de herança autossômica codominante caracterizada por mutações no gene HBB, na região cromossômica 11p15.5, que codifica a subunidade β na hemoglobina (Hb). A Hb é uma proteína tetramérica expressa por células vermelhas do sangue. A substituição de um único

nucleotídeo altera o códon do sexto aminoácido, que passa de ácido glutâmico para valina. Esta mutação origina uma hemoglobina anormal, denominada hemoglobina S (HbS) (STEINBERG, 2008). Indivíduos carregando dois alelos com a mutação vão produzir HbS contendo duas subunidades da β -globina mutada em vez de produzirem a HbA saudável. Esses indivíduos vão ter a forma mais comum e severa da doença falciforme, a anemia falciforme. Nestes casos, as moléculas de HbS vão se polimerizar quando desoxigenadas, alterando a conformação do eritrócito para um formato de foice. Essas células se tornam rígidas e podem causar oclusão em vasos sanguíneos, o que pode resultar em crises de dor, infecções, síndrome torácica aguda, anemia, entre outras complicações. Isquemias recorrentes podem causar danos de longa duração em diversos órgãos, além de doença crônica nos rins e necrose avascular (EATON; HEBBEL, 1981; KATO et al., 2018).

A anemia falciforme é uma das doenças hematológicas hereditárias mais comuns em todo o mundo. No Brasil, ela é a doença hereditária de maior prevalência. Segundo o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), do Ministério da Saúde, nascem no Brasil 3.500 crianças por ano com a forma homozigota, ou seja, com anemia falciforme, e 200.000 com a forma heterozigota (FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010). A expectativa de vida para os indivíduos com anemia falciforme é de cerca de 42 anos para homens e 48 para mulheres (PLATT et al., 1994). A mortalidade, em 2005, por 100 mil pessoas na população afrodescendente americana foi de 2,75 em adultos (>19 anos) e de 0,5 em crianças (≤ 19 anos) (LANZKRON; CARROLL; HAYWOOD, 2013). Na África subsaariana estimou-se, em 2010, o nascimento de 230 mil bebês com anemia falciforme, o que corresponde a 75% de todos os nascidos com a doença no mundo. Ainda, a mortalidade em crianças menores de 5 anos na África subsaariana é de 50 a 90%. Testes específicos são necessários para confirmar o diagnóstico da doença, principalmente porque as manifestações clínicas são muito variáveis entre os indivíduos (KATO et al., 2018).

Indivíduos com anemia falciforme têm três opções de terapias: o uso de hidroxycarbamida, que aumenta a expressão de hemoglobina fetal para evitar a polimerização; transfusões sanguíneas e transplantes de células-tronco hematopoéticas. Essas terapias podem tratar as complicações agudas e prolongar a sobrevivência, mas os pacientes ainda podem sofrer de complicações crônicas (KATO et al., 2018).

Estudos utilizando a tecnologia de reprogramação de células somáticas em iPSC têm sido realizados com amostras celulares de modelos animais da doença e de pacientes de anemia falciforme. Hanna et al. (2007) reportaram a geração de iPSC a partir de fibroblastos murinos portadores de anemia falciforme. Desde então, iPSC geradas de células do sangue periférico de pacientes de anemia falciforme também já foram geradas por diversos grupos de pesquisa (CHOU et al., 2011; KOBARI et al., 2012; REIS et al., 2017; YE et al., 2009). Mais avanços estão se concretizando, principalmente na área da edição de genoma para a correção da mutação (HUANG et al., 2015; SEBASTIANO et al., 2011; ZOU et al., 2011). Essas pesquisas proporcionam o melhor entendimento da hematopoese e da doença, abrindo caminho para novos tratamentos. Neste contexto, estabelecemos a hipótese de que as iPSC, geradas no Hemocentro de Ribeirão Preto a partir de células mononucleares de sangue periférico de pacientes com anemia falciforme, são capazes de se diferenciar em células-tronco/progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é a diferenciação *in vitro* de células-tronco de pluripotência induzida com mutação para anemia falciforme em células-tronco/progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides através da formação de corpos embrioides.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características morfológicas e imunofenotípicas das células-tronco de pluripotência induzida durante a adaptação da cultura ao repique enzimático;
- Induzir a formação de corpos embrioides através do método de centrifugação em dois meios de diferenciação sem soro;
- Caracterizar morfolologicamente e imunofenotipicamente o processo de diferenciação hematopoética e geração das células-tronco/progenitoras hematopoéticas;
- Caracterizar morfolologicamente e imunofenotipicamente o processo de maturação hematopoética.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Células-tronco pluripotentes

Figura 1 – Fluxograma com os passos e análises realizados neste projeto

As células-tronco de pluripotência induzida utilizadas neste estudo foram previamente geradas e se encontram criopreservadas no Hemocentro de Ribeirão Preto. As linhagens celulares com mutação para anemia falciforme utilizadas foram: as linhagens PBscd01 e PBscd08 (originalmente denominada PBscd08cl02^{HU}), geradas a partir de PBMC de dois pacientes com anemia falciforme (REIS et al., 2017) e cedidas pela Dr^a. Elisa Maria de Sousa Russo, Universidade de São Paulo (Parecer do Comitê de Ética: 1.887.343). Reis et al. (2017) realizaram a caracterização das duas linhagens através de análises imunofenotípicas por citometria de fluxo e de

expressão, por qRT-PCR, de genes relacionados a pluripotência. Os autores demonstraram a formação espontânea de corpos embrioides *in vitro* e a habilidade de formação de teratomas *in vivo* com a presença de células originárias dos três folhetos embrionários. A linhagem PB12, gerada a partir de PBMC de doador saudável (CATELLI, 2016) e cedida pela Dr^a. Simone Kashima Haddad, Universidade de São Paulo, e as células-tronco embrionárias da linhagem H1, cedida pela Dr^a. Maristela Delgado Orellana, Universidade de São Paulo, também foram utilizadas. Como representado na Figura 1, as células-tronco pluripotentes foram, inicialmente, expandidas e adaptadas ao isolamento enzimático. A formação de corpos embrioides foi avaliada em dois meios de diferenciação sem soro e as células obtidas foram caracterizadas antes e depois da sua maturação em meio de diferenciação eritroide.

3.1.1 Cultivo e expansão das células-tronco pluripotentes

As células-tronco de pluripotência induzida das linhagens PB12, PBscd01 e PBscd08, encontravam-se congeladas em soro fetal bovino (Hyclone) suplementado com 10% de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich). Após o descongelamento, as iPSC e as células-tronco embrionárias da linhagem H1 foram cultivadas sobre matriz Geltrex (0,15 mg/mL) (Gibco) em meio de cultura mTeSR 1 (StemCell Technologies). O meio de cultura para as iPSC foi suplementado com butirato de sódio (0,25 mmol/L) (Sigma-Aldrich) para dar suporte a autorrenovação das células. As colônias de células-tronco pluripotentes foram repicadas a cada 5 dias ou quando se fez necessário. O repique foi realizado com a adição de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) (0,5 mM) (Invitrogen). Após o período de incubação de 4 minutos em temperatura ambiente, removeu-se o agente e adicionou-se o meio de cultura mTeSR 1. Com pipeta de 5 mL fez-se a raspagem do poço, as colônias fragmentadas foram transferidas para placas de 6 poços. A presença de diferenciação espontânea em determinadas colônias não inviabilizou o uso das células. As regiões que apresentaram diferenciação foram manualmente removidas com o auxílio de uma ponteira de 30 µL, em fluxo laminar horizontal com um microscópio invertido Olympus IX51 (Olympus). As células foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% CO₂, e umidade controlada.

3.1.2 Isolamento enzimático das células-tronco pluripotentes

O tratamento enzimático das colônias foi realizado para o isolamento das células para contagem, para análise por citometria de fluxo, e para o início da diferenciação hematopoética. Nestes casos, as colônias foram lavadas com 1 mL de PBS (tampão fosfato salino) (Gibco) e dissociadas, por 5 min a 37°C, com 1 mL do reagente de dissociação Stempro Accutase® (Gibco) suplementado com Y-27632 dicloridrato (10 μ M) (Tocris) para evitar apoptose. Após a incubação, as células individualizadas foram transferidas para tubos falcon e adicionou-se 1 mL de PBS para diluição da enzima. As células foram centrifugadas a 200 x *g* por 5 minutos, ressuspensas em meio mTeSR 1 e transferidas para placas de 6 poços, ou destinadas a análise por citometria de fluxo. As células destinadas a diferenciação hematopoética passaram por este repique enzimático por cerca de 5 a 20 passagens antes do início da diferenciação, afim de adaptar as células a individualização e facilitar o processo de reagregação.

3.1.3 Contagem de células em câmara de Neubauer

A determinação da quantidade de células pela contagem em câmara de Neubauer foi realizada diluindo uma alíquota da suspensão celular (10 μ L) em 10 μ L (1:2) de Trypan Blue 0,4% (Gibco) em tubo cônico do tipo Eppendorf de 1,5 mL. Foram contabilizadas as células não coradas presentes nos quatro quadrantes laterais da câmara. A determinação do número de células por mL foi feita através da divisão do número total de células contadas por 4, multiplicado por 10.000 (fator de correção) e pelo fator de diluição.

3.2 Diferenciação hematopoética

A diferenciação hematopoética das células-tronco pluripotentes foi realizada em duas etapas principais: a indução a diferenciação hematopoética por formação de corpos embrioides e a maturação das células-tronco/progenitoras hematopoéticas para geração de células da linhagem eritroide. Durante a diferenciação fez-se a caracterização imunofenotípica das células por citometria de fluxo e o ensaio de formação de colônia em metilcelulose (Figura 2).

Figura 2 – Esquema da diferenciação hematopoética de células-tronco pluripotentes

A diferenciação foi realizada em duas etapas: a formação de corpos embrioides e a maturação das células-tronco/progenitoras hematopoéticas em células da linhagem eritroide. Foram feitas análises de caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo ao longo da diferenciação e ensaios de formação de colônia.

3.2.1 Formação de corpos embrioides

A indução da diferenciação hematopoética foi realizada pelo método de formação de corpo embriode por centrifugação (*spin*) com adição de citocinas e fatores de crescimento ao meio de diferenciação sem soro (HUANG et al., 2015; NG et al., 2008). As iPSC cultivadas em placas de 6 poços foram expandidas e adaptadas ao isolamento enzimático por cerca de 5 a 20 passagens. No dia anterior ao início da diferenciação, fez-se a passagem das células que estavam 70% confluentes na proporção 1:1. Esta passagem com a enzima Stempro Accutase permite que as células estejam se dividindo ativamente no início da diferenciação. No dia 0, dia do início da diferenciação, as células foram tratadas com 1 mL da enzima Stempro Accutase, transferidas para tubos falcon de 15 mL e centrifugadas, como descrito anteriormente. As células foram contadas em câmara de Neubauer com corante Trypan Blue e a quantidade necessária de células foi ressuspensa em meio de diferenciação suplementado e filtrado. Transferiu-se entre 2000 e 4000 células para cada poço de placas de 96 poços de baixa aderência com fundo arredondado (Sarstedt 833925500 e Corning 3788) em 50 µL de meio de diferenciação suplementado com citocinas e fatores de crescimento. Foram utilizados o meio de diferenciação comercial STEMdiff APEL 2 (StemCell Technologies) e o meio de diferenciação sem soro (SFM) preparado *in house* com 50% IMDM (Gibco), 50%

Ham's F12 (Gibco), 1% lipídios definidos (Gibco), 1% ITS-X (Gibco), glutamax 2 mM (Gibco), 1-tioglicerol 450 μ M (Sigma-Aldrich), ácido ascórbico 50 μ g/mL (Sigma-Aldrich), 0,5% albumina humana (CSL Behring), e 0,05% polivinil álcool (PVA) (Sigma-Aldrich). Os meios de diferenciação foram suplementados com BMP4 (10 ng/mL) (PeproTech), bFGF (10 ng/mL) (R&D) e Y-27632 dicloridrato (10 μ M) no dia 0. Somente os 60 poços centrais das placas foram utilizados, os poços na lateral das placas foram preenchidos com PBS para evitar a evaporação de meio. As placas foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos, para forçar a agregação das células individualizadas, e foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% CO₂ e umidade controlada. Foram realizadas adições de meio suplementado com as seguintes citocinas: BMP4 (10 ng/mL), bFGF (10 ng/mL), VEGF (D2: 20 ng/mL; D5+: 10 ng/mL) (PeproTech), SCF (D2: 100 ng/mL; D5+: 50 ng/mL) (PeproTech), e TPO (20 ng/mL) (PeproTech) nos dias 2, 5, 8 e 11, conforme Figura 3. As coletas das células foram feitas ao longo da diferenciação em diferentes dias e ao final da diferenciação.

Figura 3 – Esquema da indução da diferenciação hematopoética por formação de corpos embrioides

Fez-se adição de meio suplementado com as citocinas conforme indicado. A coleta das células foi feita ao longo da diferenciação e ao final da diferenciação.

3.2.2 Coleta dos corpos embrioides e células do sobrenadante

A coleta das células foi realizada ao longo da diferenciação. Todo o conteúdo dos poços foi transferido para tubo falcon de 50 mL utilizando ponteiras de 1 mililitro. Foi utilizado filtro de 100 μ m sobre tubo falcon de 50 mL para separar os corpos embrioides das células do sobrenadante, quando era o caso. As células foram centrifugadas a 160 x g por 5 minutos e ressuspensas em 1 mL de PBS. Os corpos embrioides retidos no filtro foram transferidos para outro tubo falcon, centrifugados a 200 x g por 5 minutos, ressuspensos em 1 mL da enzima Stempro Accutase e incubados a 37°C por 15 a 30 minutos. Após o período de incubação, os corpos

embrióides foram passados por agulha 22 G para dissociá-los em células individualizadas. Adicionou-se 1 mL de PBS e centrifugou-se a 250 x g por 5 minutos. As células dissociadas foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Foram feitas coletadas nos dias 4, 6, 8, 11, 13, 14, 15 e 16 da diferenciação. Essas células foram utilizadas para análise por citometria de fluxo, análise de formação de colônia em metilcelulose e para a continuação da maturação das células.

3.2.3 Maturação das células-tronco/progenitoras hematopoéticas

Células coletadas ao longo e no final da diferenciação hematopoética foram induzidas a maturação. Cerca de 1×10^5 células/mL foram plaqueadas em placas de 6, 12 ou 24 poços tratadas previamente com gelatina (Stemcell Technologies) por 1 hora a 37°C. O meio de maturação foi preparado a partir do meio de diferenciação SFM sem a adição de polivinil álcool. O meio foi suplementado com holo-transferrina humana (500 µg/mL) (Sigma-Aldrich), IL-3 (10 ng/mL), EPO (3 U/mL), e SCF (50 ng/mL) (PeproTech). Foi feita a troca do meio suplementado a cada 2-3 dias e as células foram mantidas em cultura por cerca de 8 a 15 dias. Após este período fez-se a coleta das células para a contagem e a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo. Para a coleta das células, descartou-se o meio de diferenciação, adicionou-se 1 mL de Stempro Accutase e incubou-se a 37°C por 5 min. Transferiu-se as células para tubo falcon e adicionou-se 1 mL de PBS. Centrifugou-se a suspensão de células a 200 x g por 5 min, e ressuspendeu-se as células em PBS. Uma alíquota da suspensão de células foi retirada para contagem, conforme descrito anteriormente. O restante das células em suspensão foi caracterizado por citometria de fluxo.

3.3 Caracterização das células após a diferenciação hematopoética

3.3.1 Análises morfológicas

As culturas celulares e a diferenciação hematopoética foram observadas diariamente ao microscópio para análise morfológica. A documentação fotográfica foi realizada em câmera digital acoplada ao microscópio.

3.3.2 Avaliação do potencial clonogênico das células em metilcelulose

Para avaliar o potencial clonogênico das células após a indução hematopoética, fez-se o cultivo em meio semi-sólido MethoCult® H4435 (StemCell Technologies). As células coletadas foram contadas e adicionadas ao meio semi-sólido na concentração de 10^4 células por mililitro. A mistura de células com o meio semi-sólido foi homogeneizada utilizando agulha 16 G, distribuída em alíquotas de 1 mL por placa de 35 mm e mantida em incubadora a 37°C, 5% CO₂ e umidade controlada, por 14 dias. Após 14 dias, as colônias foram fotografadas.

3.3.3 Imunofenotipagem por citometria de fluxo

Foi realizada a imunofenotipagem por citometria de fluxo das iPSC e células-tronco embrionárias H1 indiferenciadas e ao longo da diferenciação hematopoética. A aquisição dos eventos foi feita com os citômetros FACSCalibur e FACSARIA (Becton Dickinson) e os dados foram analisados com os softwares FACSDiva, CELLQuest™ (Becton Dickinson). Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais (BD Biosciences): CD31, CD144, CD43, CD36, CD71 e NANOG conjugados com FITC (do inglês, *fluorescein isothiocyanate*); CD31, CD144, CD34, CD235a, OCT3/4 e SOX2 conjugados com PE (do inglês, *phycoerythrin*); CD45 conjugado com PerCP (do inglês, *peridinin chlorophyll*), CD45 e CD34 conjugados com APC (do inglês, *allophycocyanin*). Foram utilizados os isotipos controles de imunoglobulinas G conjugados com FITC, PE, PerCP e APC.

Para realização da marcação interna com os marcadores de pluripotência NANOG, OCT3/4 e SOX2, alíquotas de 100 µL de suspensão celular em PBS contendo cerca de 10^5 células foram transferidas para tubos de poliestireno 12 x 75 mm previamente identificados com os marcadores. Adicionou-se 1 mL de solução PBS 2% formol por tubo e incubou-se por 10 minutos, a temperatura ambiente, para fixação das células. Adicionou-se 1 mL de PBS e centrifugou-se a 1800 RPM por três minutos. Descartou-se o sobrenadante, adicionou-se 300 µL tampão de permeabilização e incubou-se por mais 10 minutos. Fez-se a centrifugação novamente e adicionou-se 100 µL de PBS. Foram adicionados os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos na diluição 1:20 e as amostras foram incubadas em ambiente escuro por 30 min. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de PBS em cada tubo e as amostras foram centrifugadas a 1800 RPM por três minutos.

Os sobrenadantes foram desprezados, as células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

Para a realização da marcação de superfície com os demais anticorpos, alíquotas de 100 μ L de suspensão celular em PBS contendo cerca de 10^5 células foram transferidas para tubos de poliestireno 12 x 75 mm previamente identificados com os diferentes marcadores. Como descrito anteriormente, foram adicionados os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos na diluição 1:20 e as amostras foram incubadas em ambiente escuro por 30 min. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de PBS em cada tubo e as amostras foram centrifugadas a 1800 RPM por três minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, as células foram ressuspensas em 200 μ L de PBS e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo. Quando necessário, as células foram ressuspensas em PBS 1% formol para posterior aquisição das células. A caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo nos permite detectar os seguintes perfis de células ao longo do processo de diferenciação: OCT3/4⁺, NANOG⁺ e SOX2⁺: células-tronco pluripotentes; CD31⁺CD144⁺: células endoteliais; CD34⁺CD43⁺: precursor hematopoético; CD34⁺CD45⁺: células-tronco/progenitoras hematopoéticas; CD71⁺, CD235a⁺ e CD36⁺: precursores e células eritroides. Para verificar a viabilidade das células, fez-se a marcação com iodeto de propídeo (PI). 50 μ L da solução de PI foram adicionados ao tubo contendo a suspensão de células não marcadas com nenhum anticorpo.

3.3.4 Cytospin e coloração de Leishman

As células geradas após o cultivo em meio de maturação foram coradas com corante Leishman. Cerca de $2,5 \times 10^5$ células foram depositadas na lâmina para centrifugação em citocentrífuga (cytospin). As lâminas foram centrifugadas a 800 RPM por 10 min e secas à temperatura ambiente. A coloração foi realizada com o corante Leishman conforme as instruções descritas pelo fabricante. A lâmina foi coberta com o corante e incubada por 5 min. Após esse período, foi adicionado água para diluição do corante, e a lâmina foi deixada a temperatura ambiente para secagem. Após a secagem, as lâminas foram observadas ao microscópio e fotografadas.

3.4 Análise estatística

As análises estatísticas, teste-t não-pareado e gráficos foram geradas com o auxílio do software GraphPad Prism, V7 (GraphPAD Software Inc.) para o sistema operacional Windows®. Foi adotado o nível de significância de 5% para as análises.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Morfologia das células-tronco pluripotentes

Neste estudo foram utilizadas as linhagens de células-tronco embrionárias H1 e três linhagens de iPSC: uma linhagem de doador saudável, a PB12, e duas linhagens com a mutação para anemia falciforme, PBscd01 e PBscd08. As linhagens de iPSC foram cultivadas sobre matriz geltrex em meio mTeSR1 por mais de 22 passagens e, assim como a linhagem H1, mantiveram sua morfologia em estado indiferenciado (Figura 4 A-D). A linhagem PBscd01 foi uma exceção e apresentou estruturas diferenciadas que lembram rosetas neurais (Figura 4 D). Quando do aparecimento dessas estruturas na cultura, fez a remoção manual da colônia diferenciada.

Figura 4 – Morfologia das colônias de células-tronco pluripotentes das quatro linhagens

Linhagens pluripotentes H1, iPSC PB12, PBscd08 e PBscd01 representadas com os respectivos números de passagem (P). A seta indica as estruturas diferenciadas que lembram rosetas neurais. (A-C, aumento de 40x; D, aumento de 100x).

4.2 Morfologia e imunofenotipagem das células-tronco pluripotentes após isolamento enzimático

Antes do início da diferenciação por formação de corpos embrioides, fez-se a adaptação das células ao isolamento enzimático, por pelo menos 5 passagens. Essa

adaptação permite a maior sobrevivência das células individualizadas e melhor agregação no momento da formação dos corpos embrioides. Ao longo da adaptação ao isolamento com a enzima Stempro Accutase, acompanhou-se a mudança da morfologia das células através da observação em microscópio e fotografia das colônias. Vinte e quatro horas após o isolamento enzimático e passagem, as células apresentavam morfologia mais alongada (Figura 5 A e B). No entanto, as células foram capazes de formar colônias com morfologia característica de colônias pluripotentes cerca de 72 horas depois (Figura 5 C e D). Observamos o eventual crescimento espontâneo de células diferenciadas durante a adaptação (Figura 5 E). Novamente, a linhagem PBscd01 apresentou estruturas diferenciadas que lembram rosetas neurais (Figura 5 F).

Figura 5 – Morfologia das colônias de células-tronco pluripotentes ao longo das passagens por isolamento enzimático

(A, B) Células das linhagens H1 e PBscd01 24 horas após a passagem com a enzima Stempro Accutase. (C, D) Linhagens H1 e PBscd01 72 horas após a passagem com a enzima Stempro Accutase. (E, F) Linhagens PBscd08 e PBscd01 apresentando células diferenciadas (seta). Junto a identificação da linhagem estão indicados os números de passagens totais e os números de passagens com a enzima (P-P) (A-E, aumento de 40x; F, aumento de 100x).

As células-tronco pluripotentes foram caracterizadas quanto a presença de marcadores de pluripotência e marcadores hematopoéticos durante a adaptação ao isolamento enzimático, entre as passagens 5 e 13 da adaptação. Foi detectado elevado percentual de células positivas para os marcadores de pluripotência OCT3/4, NANOG e SOX2 para a linhagem H1: 92,88%, 95,24% e 96,98%, respectivamente; para a linhagem PB12: 73%, 77,2% e 96,4%; para PBscd01: $94,15 \pm 1,90\%$, $97,55 \pm 0,63\%$ e $99,15 \pm 0,35\%$; e para a linhagem PBscd08: 67,1%, 93,1% e 99,5%, respectivamente. O percentual de células positivas para os marcadores hematopoéticos foi abaixo de 5,03% para CD43, abaixo de 4,16% para CD34 e abaixo de 0,25% para CD45 para todas as linhagens (Figura 6).

Figura 6 – Caracterização das linhagens de célula-tronco pluripotentes

Caracterização das linhagens H1 (A), PB12 (B), PBscd01 (C) e PBscd08 (D) quanto a expressão dos marcadores de pluripotência OCT3/4, NANOG e SOX2 e de marcadores de células progenitoras hematopoéticas CD43, CD34 e CD45. Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

4.3 Morfologia dos corpos embrioides

Após a adaptação ao isolamento enzimático foram realizados experimentos de formação de corpos embrioides com as quatro linhagens de células-tronco

pluripotentes utilizando o meio de diferenciação comercial STEMdiff APEL 2 e o meio de diferenciação SFM. As células cultivadas em meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 formaram corpos embrioides, cerca de 24 a 48 horas após a centrifugação, em todos os poços de todos os experimentos realizados com as quatro linhagens celulares (Figura 7).

Figura 7 – Formação de corpos embrioides – Meio STEMdiff APEL 2

A formação dos corpos embrioides foi observada nas linhagens H1, PBscd01 e PBscd08 após 24 horas e na linhagem PB12 após 48 horas da centrifugação em meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (aumento de 40x).

As células cultivadas com o meio SFM não formaram corpos embrioides 24 horas após a centrifugação das placas (Figura 8 A, E e H). A formação de corpos embrioides menos uniformes ocorreu em parte dos poços e somente após 48 horas da centrifugação (Figura 8 B, D, G e J). Ainda, em alguns poços foram observados diversos pequenos corpos embrioides (Figura 8 C, D, F, G e H) ou nenhuma formação de corpo embrioide (Figura 8 I).

Figura 8 – Formação de corpos embrioides – Meio SFM

Formação de corpos embrioides com o meio de diferenciação SFM foi observada nas quatro linhagens celulares, 24 e 48 horas após a centrifugação (aumento de 40x).

Também foram observados corpos embrioides aderidos a cultura, independente da linhagem celular utilizada, e principalmente quando as células foram cultivadas em meio SFM (Figura 9 A-B). No entanto, os corpos embrioides não uniformes e com células aderidas a cultura permitiram o surgimento e expansão de células no sobrenadante (Figura 9 C). Corpos embrioides com morfologia variável foram observados em culturas iniciadas com mais de 5000 células em meio de cultura STEMdiff APEL 2 (Figura 10).

Figura 9 – Formação de corpos embrioides não uniformes – Meio SFM

Observamos a formação de corpos embrioides não uniformes e com células aderidas a placa em meio de diferenciação SFM (A-B). Observamos o surgimento e expansão de células no sobrenadante (C). Junto a identificação da linhagem está indicado o dia (D) do desenvolvimento dos corpos embrioides após a centrifugação. (A-B, aumento de 40x; C, aumento de 100x).

Figura 10 – Formação de corpos embrioides não uniformes – Meio STEMdiff APEL 2

Formação de corpos embrioides com morfologia variável cultivado em meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (aumento de 40x).

Foram observadas células no sobrenadante dos experimentos realizados com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 a partir do dia 8 da diferenciação com todas as linhagens celulares, e a expansão dessas células até o momento da coleta ao final da diferenciação (Figura 11). O cultivo em meio de diferenciação SFM promoveu a formação de corpos embrioides menos uniformes. No entanto, também foram observadas células no sobrenadante que foram coletadas separadamente dos corpos embrioides para análise (Figura 12).

Figura 11 – Cultura dos corpos embrioides em meio STEMdiff APEL 2

Observa-se a presença de células no sobrenadante dos corpos embrioides em cultivo com meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A, aumento de 100x; B e C, aumento de 160x; D aumento de 40x).

Figura 12 – Cultura dos corpos embrioides em meio SFM

Observa-se a presença de células no sobrenadante dos corpos embrioides em cultivo com meio de diferenciação SFM (A, aumento de 40x; B e D, aumento de 160x; C, aumento de 100x).

4.4 Análise imunofenotípica dos corpos embrioides

4.4.1 Marcadores de pluripotência

As linhagens H1 e PBscd01 foram caracterizadas quanto a expressão dos marcadores de pluripotência após o início da diferenciação. As linhagens induzidas a formação de corpo embrioide e cultivadas nos dois meios de diferenciação e coletadas no dia 4 demonstraram queda na porcentagem de células positivas para os marcadores de pluripotência OCT3/4 e NANOG (Figura 13).

Figura 13 – Caracterização das linhagens celulares quanto aos marcadores de pluripotência

Células da linhagem H1 (A-B) e PBscd01 (C-D). Porcentagem de células positivas para os marcadores de células pluripotentes OCT3/4 e NANOG no início da diferenciação e 4 dias após o cultivo em meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A-C) e SFM (B-D).

4.4.2 Marcadores endoteliais

As linhagens PBscd01 e PBscd08 foram caracterizadas quanto a expressão dos marcadores de células endoteliais CD31 e CD144, e de células hematopoéticas CD34 e CD45, ao longo da diferenciação. As células foram induzidas a formação de corpo embrioide e cultivadas em meio de diferenciação SFM e coletadas nos dias 4,

6 e 8 da diferenciação para análise por citometria de fluxo. As células da linhagem PBscd01 promoveram o surgimento de uma população de células $CD31^+CD144^+$ no dia 4, seguida pela queda na porcentagem de células $CD144^+$ nos dias 6 e 8. Essa queda deu lugar a células $CD34^+$ e $CD45^+$ no dia 8 da diferenciação (Figura 14).

Figura 14 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd01 – CD31, CD144

As células da linhagem PBscd08 promoveram o surgimento de uma população de células $CD31^+CD144^+CD34^+$ no dia 4, que representou cerca de 24,9% das células, seguida pela queda na porcentagem de células $CD144^+$ no dia 8. Essa queda deu lugar a população de células $CD34^+CD45^+$ no dia 8 da diferenciação (Figura 15).

Figura 15 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD31, CD144

4.4.3 Marcadores hematopoéticos

Os experimentos realizados para indução de diferenciação hematopoética por formação de corpo embriode estão representados na Tabela 1. Foram realizados experimentos com células-tronco embrionárias da linhagem H1, e com três linhagens de iPSC. Foram utilizados os meios de diferenciação STEMdiff APEL 2 e o meio de diferenciação SFM preparado *in house*. Os dias de coleta dos corpos embrioides e o número de replicatas variaram entre as linhagens e estão descritos na tabela. As replicatas representam experimentos diferentes que tiveram a coleta realizada no mesmo dia do desenvolvimento. As células dos corpos embrioides foram caracterizadas imunofenotipicamente para os marcadores hematopoéticos: CD34, CD45 e CD43.

Tabela 1 – Coletas de células realizadas ao longo da diferenciação hematopoética

Linhagem	Meio de Cultura	Dia das coletas e número de replicatas
H1	STEMdiff APEL 2	D0, D4, D8, D11, D14
	Meio SFM	D0, D4, D8, D11, D14
PB12	STEMdiff APEL 2	D0 (N=3), D8, D11, D13, D15
	Meio SFM	D0 (N=3), D8, D13, D14, D15
PBscd01	STEMdiff APEL 2	D0, D4, D8, D11, D14
	Meio SFM	D0 (N=3), D4 (N=2), D6, D8 (N=4), D11 (N=2), D14 (N=2), D15
PBscd08	STEMdiff APEL 2	D0 (N=2), D6, D8, D14
	Meio SFM	D0 (N=3), D4 (N=2), D8 (N=4), D11 (N=3), D14 (N=2), D15, D16

4.4.3.1 Marcador CD34

Quanto a caracterização imunofenotípica das células dos corpos embrioides ao longo da diferenciação, a linhagem H1 cultivada em meio STEMdiff APEL 2 demonstrou aumento na porcentagem de células positivas para CD34 até o dia 11, atingindo 3,6% (Figura 16 A). Com o cultivo em meio de diferenciação SFM, a maior porcentagem de células CD34⁺ foi detectada no dia 4, 10,54% de células positivas (Figura 16 B).

Figura 16 – Imunofenotipagem das células da linhagem H1 – CD34

Porcentagem de células CD34⁺ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A) e o meio de diferenciação SFM (B).

A linhagem PB12 cultivada em meio STEMdiff APEL 2 demonstrou aumento na porcentagem de células positivas para CD34 até o dia 13, atingindo 53,38% (Figura 17 A). Com o cultivo em meio de diferenciação SFM, a maior porcentagem de células CD34⁺ foi detectada no dia 14, 29,68% de células positivas (Figura 17 B).

Figura 17 – Imunofenotipagem das células da linhagem PB12 – CD34

Porcentagem de células CD34⁺ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A) e o meio de diferenciação SFM (B). Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

A linhagem PBscd01 cultivada em meio STEMdiff APEL 2 demonstrou aumento na porcentagem de células CD34⁺ até o dia 8, atingindo 9,58% (Figura 18A). Com o cultivo em meio SFM, a porcentagem de células CD34⁺ variou ao longo da diferenciação atingindo no dia 8 a média de $22,77 \pm 11,02\%$ de células positivas (Figura 18 B).

Figura 18 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd01 – CD34

Porcentagem de células CD34⁺ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A) e o meio de diferenciação SFM (B). Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

A linhagem PBscd08 cultivada em meio STEMdiff APEL 2 demonstrou a maior porcentagem de células CD34⁺ no dia 6, atingindo 44,73% (Figura 19 A). Com o cultivo em meio de diferenciação SFM, a porcentagem de células CD34⁺ aumentou até o dia 11, com média de $67,61 \pm 26,43\%$ de células positivas (Figura 19 B).

Figura 19 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD34

Porcentagem de células CD34⁺ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A) e o meio de diferenciação SFM (B). Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

Fez-se a comparação da porcentagem de células CD34⁺ entre as linhagens de células-tronco pluripotentes cultivadas nos dois meios de diferenciação e coletadas no dia 8 da diferenciação. A linhagem H1 gerou cerca de 3,13% de células CD34⁺ em

meio STEMdiff APEL 2 e 4,94% em meio SFM. A linhagem PB12 gerou cerca de 13,17% de células CD34⁺ em meio STEMdiff APEL 2 e 19,21% em meio SFM. A linhagem PBscd01 gerou cerca de 9,58% de células CD34⁺ em meio STEMdiff APEL 2 e apresentou uma média de 22,77% $\pm$ 11,02% (N=4) de células CD34⁺ quando cultivada em meio SFM. A linhagem de células PBscd08 apresentou cerca de 38,65% de CD34⁺ em meio STEMdiff APEL 2 e média de 53,99 $\pm$ 24,49% (N=4) de células CD34⁺ em meio SFM (Figura 20).

Figura 20 – Imunofenotipagem das células das quatro linhagens celulares – CD34

Porcentagem de células CD34⁺ coletadas no dia 8 com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A) e com o meio de diferenciação SFM (B). Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

4.4.3.2 Marcador CD45

O antígeno CD45 é uma glicoproteína de membrana expressa em quase todas as células hematopoéticas. Verificamos a presença deste marcador ao longo da diferenciação. Detectamos células CD45⁺, originárias da linhagem H1, apenas no dia 14 da diferenciação com meio STEMdiff APEL 2 e que representaram 5,78% das células dos corpos embrioides coletados (Figura 21 A). A diferenciação com o meio SFM gerou cerca de 12,36% de células CD45⁺ apenas no dia 11 da diferenciação (Figura 21 B). Não foram detectadas células duplo-positivas para CD34⁺CD45⁺ nas duas condições de diferenciação.

Figura 21 – Imunofenotipagem das células da linhagem H1 – CD45

Porcentagem de células CD45⁺ em meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 no dia 14 da diferenciação (A) e em meio de diferenciação SFM no dia 11 da diferenciação (B).

As células da linhagem PB12 cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 e em meio SFM não apresentaram marcação para CD45 ao longo de toda a diferenciação hematopoética.

As células da linhagem PBscd01 cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 apresentaram marcação para CD45 apenas no dia 14 da diferenciação (Figura 22 A). As células cultivadas em meio SFM apresentaram marcação para CD45 nos dias 4 e 8 da diferenciação (Figura 22 B e C, respectivamente).

Figura 22 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd01 – CD45

Porcentagem de células CD45⁺ cultivadas em meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 e coletadas no dia 14 da diferenciação (A) e cultivadas em meio de diferenciação SFM coletadas no dia 4 (B) e 8 da diferenciação (C).

A linhagem PBscd08 cultivada em meio STEMdiff APEL 2 não apresentou células CD45⁺ ao longo de toda a diferenciação hematopoética. Com o cultivo em meio de diferenciação SFM, a porcentagem de células CD45⁺ variou ao longo da

diferenciação, atingindo no dia 11 a média de $36,31 \pm 26,02\%$. Ainda, um experimento com coleta no dia 15 detectou $59,64\%$ de células $CD45^+$ (Figura 23).

Figura 23 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – $CD45$

Porcentagem de células $CD45^+$ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação SFM. Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

Apenas nos experimentos com a linhagem PBscd08 em meio SFM foi possível verificar células duplo-positivas para $CD34^+CD45^+$ nos corpos embrioides (Figura 24). A porcentagem de células $CD34^+CD45^+$ variou entre os dias 4 e 15, atingindo, no dia 11 a média de $37,4 \pm 31,66\%$. Ainda, um experimento com coleta no dia 15 detectou $51,93\%$ de células duplo-positivas (Figura 24).

Figura 24 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – $CD34CD45$

Porcentagem de células $CD34^+CD45^+$ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação SFM. Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

4.4.3.3 Marcador CD43

CD43 é uma sialoglicoproteína leucocitária transmembrana expressa em células da linhagem hematopoética, inclusive em células-tronco hematopoéticas. A linhagem H1 cultivada em meio STEMdiff APEL 2 demonstrou aumento na porcentagem de células positivas para CD43 entre os dias 8 e 14, sendo a maior porcentagem de células CD43⁺ no dia 14, 9,48% (Figura 25 A). Com o meio de diferenciação SFM, a maior porcentagem de células CD43⁺ também foi detectada no dia 14, cerca de 4,37% de células CD43⁺ (Figura 25 B).

Figura 25 – Imunofenotipagem das células da linhagem H1 – CD43

Porcentagem de células CD43⁺ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A) e com o meio de diferenciação SFM (B).

A linhagem PB12 cultivada em meio STEMdiff APEL 2 apresentou maior porcentagem de células positivas para CD43 no dia 15 da diferenciação, cerca de 31,05% (Figura 26 A). Com o meio de diferenciação SFM, as porcentagens de células CD43⁺ ao longo da diferenciação foram inferiores a porcentagem detectada no início, de $3,11 \pm 4,40$ % (Figura 26 B).

Figura 26 – Imunofenotipagem das células da linhagem PB12 – CD43

Porcentagem de células CD43⁺ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A) e com o meio de diferenciação SFM (B). Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

A linhagem PBscd01 cultivada em meio STEMdiff APEL 2 apresentou a maior porcentagem de células CD43⁺ no dia 11 da diferenciação, cerca de 3,97% (Figura 27 A). Com o meio de diferenciação SFM, as porcentagens de células CD43⁺ variaram ao longo da diferenciação atingindo no dia 8, $4,18 \pm 1,25\%$ de células positivas (Figura 27 B).

Figura 27 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd01 – CD43

Porcentagem de células CD43⁺ cultivadas com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A) e com o meio de diferenciação SFM (B). Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

A linhagem PBscd08 cultivada em meio STEMdiff APEL 2 apresentou a maior porcentagem de células CD43⁺ no dia 6 da diferenciação, cerca de 6,97% (Figura 28

A). Com o meio de diferenciação SFM, a porcentagem de células $CD43^+$ variou ao longo da diferenciação, atingindo no dia 11, a média de $65,62 \pm 34,64\%$ (Figura 28 B).

Figura 28 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD43

Porcentagem de células $CD43^+$ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 (A) e meio SFM (B). Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

Apenas nos experimentos com a linhagem PBscd08 em meio SFM foi possível verificar células duplo-positivas para $CD43^+CD45^+$ nos corpos embrioides. A porcentagem de células $CD43^+CD45^+$ variou entre os dias 11 e 15, atingindo, no dia 11 a média de $38,79 \pm 51,26\%$. Ainda, um experimento com coleta no dia 15 detectou 59% de células duplo-positivas (Figura 29).

Figura 29 – Imunofenotipagem das células da linhagem PBscd08 – CD43CD45

Porcentagem de células CD43⁺CD45⁺ ao longo da diferenciação hematopoética com o meio de diferenciação SFM. Barras representam média $\pm$ desvio padrão.

4.5 Ensaio de formação de colônia após a diferenciação hematopoética

Para verificar o potencial hematopoético das células geradas ao longo da diferenciação, realizamos ensaios de formação de colônia com as células dos corpos embrioides e do sobrenadante após estas serem caracterizadas quanto aos marcadores CD34, CD45 e CD43 (Tabela 2). As células utilizadas nos ensaios de formação de colônia foram originadas de coletas em diferentes tempos da diferenciação hematopoética, indicadas na coluna “Coleta”. Também realizamos a análise de células provenientes do sobrenadante (SN) de um experimento com as células da linhagem PB12 coletadas no dia 14 da diferenciação hematopoética. O cultivo das células em meio semi-sólido foi realizado por 14 dias em todos os ensaios. Apenas as células da linhagem PBscd08 foram capazes de gerar colônias hematopoéticas em cultivo em metilcelulose MethoCult H4435. As linhagens PB12 e PBscd01 geraram, em alguns experimentos, colônias de células aderidas e alongadas, semelhantes a células endoteliais.

Tabela 2 – Ensaio de formação de colônias em metilcelulose

Linhagem	Meio de Cultura	Coleta	CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD43 ⁺	Colônias
H1	STEMdiff APEL 2	D8	3,13%	0%	0,71%	-
		D11	3,6%	0%	2,67%	-
	Meio SFM	D8	4,94%	0%	2,41%	-
		D11	7,7%	0%	0%	-
PB12	STEMdiff APEL 2	D8	13,17%	0%	0,46%	-
		D13	53,38%	0%	0,18%	-
		D15	2,23%	0%	31,05%	Endotelial
	Meio SFM	D8	19,21%	0%	1,46%	-
		D13	23,97%	0%	1,18%	-
		D14	29,68%	0%	0%	-
		D14 SN	19,82%	0%	1,77%	Endotelial
PBscd01	STEMdiff APEL 2	D8	9,58%	0%	2,28%	-
		D8	32,1%	0%	3,98%	Endotelial
	Meio SFM	D8	16,98%	0%	2,57%	Endotelial
		D8	10,11%	0%	4,66%	-
		D11	11,86%	0%	3,77%	-
PBscd08	STEMdiff APEL 2	D6	44,73%	0,21%	6,97%	Hematopoética
		D8	38,65%	0%	5,21%	Hematopoética
	Meio SFM	D8	85,82%	61,31%	93,29%	Hematopoética
		D11	81,33%	48,64%	86,84%	Hematopoética

Para a linhagem PB12, não foram observadas colônias hematopoéticas em nenhum dos três experimentos em meio STEMdiff APEL 2. Apenas as placas com células coletadas no dia 15 da diferenciação hematopoética apresentaram células aderidas e alongadas com morfologia similar à de células endoteliais (Figura 30 A). As placas com células dos corpos embrioides coletadas no dia 15 do cultivo e com células do sobrenadante coletadas no dia 14 do cultivo com meio SFM também apresentaram colônias de células aderidas e alongadas (Figura 30 B e C).

Figura 30 – Ensaio de formação de colônia das células da linhagem PB12

Colônias formadas a partir de células provenientes de corpos embrioides cultivados em meio STEMdiff APEL 2 por 15 dias (A), em meio SFM por 15 dias (B) e, provenientes do sobrenadante (SN) cultivado em meio SFM por 14 dias (C). Após mais 14 dias em cultura em meio semi-sólido foram observadas células aderidas e alongadas (aumento de 40x).

Para a linhagem PBscd01, apenas dois experimentos com células coletadas dos corpos embrioides no dia 8 da diferenciação em meio SFM apresentaram células aderidas e alongadas com morfologia similar à de células endoteliais (Figura 31).

Figura 31 – Ensaio de formação de colônia das células da linhagem PBscd01

Nos dois ensaios independentes foram observadas somente células aderidas e alongadas (aumento de 40x).

Para a linhagem PBscd08, as células coletadas dos corpos embrioides nos dias 6 e 8 do cultivo com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 geraram colônias hematopoéticas após 14 dias em meio semi-sólido (Figura 32).

Figura 32 – Ensaio de formação de colônia das células da linhagem PBscd08 previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2

Células coletadas de corpos embrioides nos dias 6 (A e B) e 8 (C e D) da diferenciação hematopoética e cultivadas por mais 14 dias em meio semi-sólido. Foram observadas colônias hematopoéticas nos dois experimentos realizados (aumento de 40x).

Células coletadas dos corpos embrioides nos dias 8 e 11 do cultivo da linhagem PBscd08 com o meio de diferenciação SFM também foram avaliadas quanto ao potencial de formação de colônias hematopoéticas. Após 14 dias em cultura foram observadas colônias hematopoéticas, inclusive colônias da linhagem eritroide (Figura 33).

Figura 33 – Ensaio de formação de colônia das células da linhagem PBscd08 previamente cultivadas em meio SFM

Células coletadas de corpos embrioides nos dias 8 (A e B) e 11 (C e D) e cultivadas por 14 dias em metilcelulose. Foram observadas colônias hematopoéticas nos dois experimentos realizados (aumento de 40x).

4.6 Análise imunofenotípica das células do sobrenadante

As células que emergem dos corpos embrioides para o sobrenadante durante a diferenciação são células com potencial hematopoético. Desta forma, fizemos coletas das células presentes no sobrenadante nos dias 11, 13, 14, 15 e 16 da diferenciação hematopoética, como indicado na Tabela 3. Essas células foram caracterizadas imunofenotipicamente para os marcadores hematopoéticos: CD34, CD45 e CD43.

Tabela 3 – Coletas de células do sobrenadante realizadas ao final da diferenciação hematopoética

Linhagem	Meio de Cultura	Dia das coletas
H1	STEMdiff APEL 2	D14
	Meio SFM	D14
PB12	STEMdiff APEL 2	D11, D13, D15
	Meio SFM	D13, D14, D15
PBscd01	STEMdiff APEL 2	D14
	Meio SFM	D14, D15
PBscd08	STEMdiff APEL 2	D14
	Meio SFM	D14, D15, D16

Fez-se a comparação da expansão e porcentagem de células viáveis presentes no sobrenadante das linhagens cultivadas nos dois meios de diferenciação (Tabela 4). A expansão foi calculada a partir da contagem em câmara de Neubauer do número inicial e final de células após o período da diferenciação. A porcentagem de células viáveis foi verificada por citometria de fluxo com as células coletadas ao final da diferenciação. Foi observada menor porcentagem de células viáveis em meio SFM. No entanto, quando cultivadas neste meio, as células apresentaram maior expansão. A linhagem PBscd08 não teve as células marcadas com PI para análise da porcentagem de células viáveis nos dois meios, apenas foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer.

Tabela 4 – Expansão e porcentagem de células viáveis no sobrenadante

Linhagem	Meio STEMdiff APEL 2		Meio SFM	
	Células viáveis (PI)	Expansão	Células viáveis (PI)	Expansão
H1	14,3%	0,452	10,7%	2,488
PB12	19,6%	0,793	15,5%	0,916
PBscd01	27,8%	1,677	4,35%	2,078
PBscd08	-	0,271	-	1,364 ± 0,254

Quanto a caracterização imunofenotípica destas células coletadas do sobrenadante, as células da linhagem H1 cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 apresentaram marcação para CD34 em 32,07% das células. Mas apenas uma pequena população de células CD45⁺ e CD43⁺ foi detectada. As células cultivadas em meio SFM apresentaram marcação de CD34 em 44,64% das células. Neste meio foram detectadas células CD45⁺ (Tabela 5).

Tabela 5 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem H1 coletadas do sobrenadante

Meio de diferenciação hematopoética	Coleta	Marcador		
		CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD43 ⁺
STEMdiff APEL 2	D14 SN	32,07%	0,34%	2,83%
SFM	D14 SN	44,64%	9,11%	1,94%

As células do sobrenadante da linhagem PB12 cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 em três experimentos independentes foram coletadas ao final de cada experimento, nos dias 11, 13 e 15. Estas células foram caracterizadas imunofenotipicamente quanto a marcação de CD34, CD45 e CD43 (Tabela 6). A coleta no dia 13 da diferenciação, principalmente, apresentou uma grande população de células CD34⁺. As células do sobrenadante da linhagem PB12 cultivadas em meio SFM em três experimentos independentes foram coletadas, ao final de cada experimento, nos dias 13, 14 e 15. As coletas no dia 14 e 15 da diferenciação apresentaram uma grande população de células CD34⁺. No entanto, não foram detectadas porcentagens significativas de células CD45⁺ nos dois meios de diferenciação.

Tabela 6 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PB12 coletadas do sobrenadante

Meio de diferenciação hematopoética	Coleta	Marcador		
		CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD43 ⁺
STEMdiff APEL 2	D11 SN	6,48%	0,28%	31,26%
	D13 SN	48,64%	0%	4,09%
	D15 SN	3,18%	0,21%	3,21%
SFM	D13 SN	3,08%	0%	2,95%
	D14 SN	19,82%	0%	1,77%
	D15 SN	16,36%	0%	2,74%

As células do sobrenadante da linhagem PBscd01 cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 e em meio SFM foram coletadas nos dias 14 e 15 da diferenciação e caracterizadas quanto a marcação de CD34, CD45 e CD43. Detectamos porcentagem significativa de células CD45⁺ apenas nos experimentos com meio de

diferenciação SFM. Neste meio também detectamos populações de células CD43⁺ (Tabela 7).

Tabela 7 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PBscd01 coletadas do sobrenadante

Meio de diferenciação hematopoética	Coleta	Marcador		
		CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD43 ⁺
STEMdiff APEL 2	D14 SN	6,09%	0,67%	1,86%
SFM	D14 SN	3,24%	3,33%	26,98%
	D15 SN	1,24%	2,5%	10,85%

Foram feitas coletas das células presentes no sobrenadante da linhagem PBscd08 no cultivo com o meio de diferenciação STEMdiff APEL 2 no dia 14 e com meio SFM nos dias 14, 15 e 16. Estas células foram caracterizadas quanto a marcação para CD34, CD45 e CD43. Populações de células CD34⁺CD45⁺ e CD43⁺CD45⁺ foram detectadas nos dois meios de diferenciação (Tabela 8).

Tabela 8 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PBscd08 coletadas do sobrenadante

Meio de diferenciação hematopoética	Coleta	Marcador				
		CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD43 ⁺	CD34 ⁺ CD45 ⁺	CD43 ⁺ CD45 ⁺
STEMdiff APEL 2	D14 SN	37,51%	4,73%	23,54%	5,5%	5,89%
	D14 SN	16,39%	0%	5,65%	0%	0%
SFM	D15 SN	81,5%	37,44%	87,85%	35,13%	33,43%
	D16 SN	8,18%	1,14%	12,11%	0,87%	0%

4.7 Maturação das células-tronco progenitoras hematopoéticas

Após a indução da diferenciação pela formação de corpos embrioides em placas de baixa aderência, as células dos corpos embrioides e do sobrenadante foram cultivadas em meio de maturação em placas tratadas com gelatina. O cultivo das células progenitoras hematopoéticas em meio de maturação suplementado com citocinas para a diferenciação eritroide deve promover a maturação dessas células em células da linhagem eritroide. A Tabela 9 mostra os experimentos de maturação

realizados com cada linhagem, bem como a origem da célula utilizada e o dia da coleta final.

Tabela 9 – Experimentos de maturação das células previamente cultivadas em dois meios de diferenciação

Linhagem celular	Meio da diferenciação	Maturação	
	hematopoética	Início	Coleta
CTE H1	STEMdiff APEL 2	D14	+ D11
	Meio SFM	D14	+ D11
iPSC PB12	STEMdiff APEL 2	D11	+ D12
		D11 SN	+ D12
		D13	+ D8
		D15	+ D10
	Meio SFM	D13	+ D8
		D14 SN	+ D9
		D15	+ D10
		D15 SN	+ D10
iPSC PBscd01	STEMdiff APEL 2	D14	+ D11
	Meio SFM	D14	+ D11
		D14 SN	+ D11
iPSC PBscd08	STEMdiff APEL 2	D14	+ D12
		D14 SN	+ D12
	Meio SFM	D8	+ D10
		D11	+ D15
		D16	+ D10
		D16 SN	+ D10

4.7.1 Morfologia das células em meio de maturação

Após a indução da diferenciação hematopoética por 14 dias com os dois meios de diferenciação, as células da linhagem H1 foram cultivadas separadamente por mais 11 dias em meio de maturação eritroide. Foi possível observar um grande número de aglomerados de células mortas, confirmado através da coloração com Trypan blue; e a presença de poucas células arredondadas semi-aderidas, com morfologia similar a de células-tronco/progenitoras hematopoéticas tanto no cultivo das células previamente diferenciadas em meio STEMdiff APEL 2 (Figura 34 A e B) como em meio SFM (Figura 34 C e D). Além disso, foi observado um grande número de células

aderidas e alongadas, com morfologia similar à de células endoteliais, principalmente no cultivo com as células previamente diferenciadas em meio SFM (Figura 34 C).

Figura 34 – Cultivo das células da linhagem H1 em meio de maturação

Presença de poucas células arredondadas semi-aderidas durante a maturação das células previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 (A-B) e em meio SFM (C-D). O dia da coleta das células na diferenciação hematopoética e o dia no cultivo em meio de maturação estão representados junto a indicação da linhagem (D+D). Muitas células mortas presentes nas duas condições e também células aderidas e alongadas (A, aumento de 400x; B-D, aumento de 100x).

Após a indução da diferenciação por formação de corpos embrioides das células da linhagem PB12 por 11 a 15 dias, as células foram cultivadas por mais 8 a 12 dias em meio de maturação. Foram observadas poucas células arredondadas semi-aderidas nos experimentos com a linhagem PB12 previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 (Figura 35 A) e em meio SFM (Figura 35 C). Ainda, foram observadas muitas células mortas durante a maturação das células previamente cultivadas com os dois meios de diferenciação. Em um experimento realizado com as células coletadas dos corpos embrioides cultivados por 11 dias em meio STEMdiff APEL 2 observamos a expansão de 1,35 vezes após 12 dias em cultivo em meio de maturação. Em outro experimento, realizado com as células coletadas do sobrenadante cultivado por 14 dias em meio de cultivo SFM, observamos a expansão de 1,19 vezes após 9 dias de cultivo em meio de maturação. Nos demais experimentos observamos, ao final, um menor número de células viáveis do que no início.

Foi observado um grande número de células aderidas e alongadas, com morfologia similar à de células endoteliais. Além disso, células previamente cultivadas por 13 dias em dois experimentos com os dois meios de diferenciação foram cultivadas por mais 8 dias em meio de maturação (Figura 35 B e D). Após este período da maturação coletou-se e preparou-se lâminas dessas células coradas com corante de Leishman. Na Figura 36 é possível observar a morfologia de células hematopoéticas, principalmente da linhagem mieloide, derivadas da linhagem PB12.

Figura 35 – Cultivo das células da linhagem PB12 em meio de maturação

Presença de células aderidas e poucas células arredondadas semi-aderidas durante a maturação das células previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 (A-B) e meio SFM (C-D). O dia da coleta das células na diferenciação hematopoética e o dia no cultivo em meio de maturação estão representados junto a indicação da linhagem (D+D). (A-B, aumento de 100x; C-D, aumento de 400x).

Figura 36 – Coloração com Leishman das células após a maturação

Células da linhagem PB12 após 8 dias de maturação geraram células semelhantes a células das linhagens mieloide e eritroide. (A-D) Células previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 por 13 dias. (E-H) Células previamente cultivadas em meio SFM por 13 dias (A-D e F-H, aumento de 1000x; E, aumento de 400x).

Após a indução da diferenciação por formação de corpos embrioides das células da linhagem PBscd01 por 14 dias, as células foram cultivadas por mais 11 dias em meio de maturação. Foram observadas poucas células arredondadas semi-aderidas nos experimentos com a linhagem PBscd01 previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 (Figura 37 A-B) e em meio SFM (Figura 37 C-D). Além disso, foi observado um grande número de células aderidas com morfologia de células endoteliais. Também foram observados muitos aglomerados de células mortas durante a maturação das células previamente cultivadas com os dois meios de diferenciação.

Figura 37 – Cultivo das células da linhagem PBscd01 em meio de maturação

Presença de células aderidas e poucas células viáveis arredondadas semi-aderidas durante a maturação das células previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 (A-B) e meio SFM (C-D). O dia da coleta das células na diferenciação hematopoética e o dia no cultivo em meio de maturação estão representados junto a indicação da linhagem (D+D). (A, C e D, aumento de 100x; B, aumento de 40x)

Após a indução da diferenciação por formação de corpos embrioides das células da linhagem PBscd08 por 8 a 16 dias, as células foram cultivadas por mais 10 a 15 dias em meio de maturação. Diferentemente das outras linhagens, foram observadas muitas células arredondadas semi-aderidas com morfologia similar a células-tronco/progenitoras hematopoéticas nos experimentos com as células

previamente cultivadas em meio STEMdiff (Figura 38 A-B) e em meio SFM (Figura 38 C-F). Em um experimento realizado com as células de corpos embrioides cultivados por 14 dias em meio STEMdiff APEL 2 observamos uma expansão de 7 vezes no número de células viáveis após o cultivo em meio de maturação. Nos experimentos realizados com as células previamente cultivadas em meio SFM observamos um menor número de células viáveis após o cultivo em meio de maturação. Além disso, foram observadas células aderidas com morfologia de células endoteliais.

Figura 38 – Cultivo das células da linhagem PBscd08 em meio de maturação

Presença de muitas células arredondadas semi-aderidas durante a maturação das células previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 (A-B) e em meio SFM (C-F). Presença de células aderidas e alongadas nas duas condições. O dia da coleta das células na diferenciação hematopoética e o dia no cultivo em meio de maturação estão representados junto a indicação da linhagem (D+D). (A, C e F, aumento de 100x; B, D e E, aumento de 400x).

4.7.2 Análise imunofenotípica das células após a maturação

Após o período de 8 a 15 dias em cultura de maturação, fez-se a análise das células para os marcadores hematopoéticos CD34, CD45, CD43, e eritroides CD36, CD71 e CD235a por citometria de fluxo. O cultivo em meio de maturação eritroide deve promover o aumento das populações CD45⁺ e queda nas populações CD34⁺, bem como o surgimento de células CD36⁺, CD71⁺ e CD235a⁺.

As células da linhagem H1 foram coletadas após 11 dias em cultivo em meio de maturação e fez-se a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo para a expressão dos marcadores CD34, CD45 e CD43 (Tabela 10). Detectou-se apenas o aumento da população de células CD34⁺ e de CD43⁺ no cultivo realizado previamente em meio SFM.

Tabela 10 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem H1 coletadas após a maturação

Linhagem H1	Maturação	Marcador		
		CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD43 ⁺
STEMdiff APEL 2	Início D14	2,43%	0%	9,48%
	Coleta + D11	2,25%	0%	1,56%
SFM	Início D14	1,24%	0%	4,37%
	Coleta + D11	45,2%	0,49%	10,12%

As células da linhagem PB12 foram coletadas após 8 a 12 dias em cultivo em meio de maturação, quando fez-se a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo. As células de três experimentos independentes, previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2, apresentaram queda na porcentagem de células CD34⁺ após o cultivo em meio de maturação. Apenas um experimento com as células coletadas após 10 dias em meio de maturação apresentou um pequeno aumento da porcentagem de células CD34⁺, de 2,23% para 4,76%. As células de três experimentos independentes, previamente cultivadas em meio SFM, também apresentaram queda na porcentagem de células CD34⁺ após o cultivo em meio de maturação. Apenas um experimento com as células coletadas após 10 dias em meio de maturação apresentou um pequeno aumento da porcentagem de células CD34⁺, de 2,55% para 4,69%. Apenas em um experimento, com células previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 por 11 dias,

foram detectadas células CD45⁺ e CD43⁺ após 12 dias do cultivo em meio de maturação, o que seria o esperado para todos os experimentos (Tabela 11).

Tabela 11 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PB12 coletadas após a maturação

Linhagem PB12	Maturação	Marcador		
		CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD43 ⁺
STEMdiff APEL 2	Início D11	14,13%	0%	0,17%
	Coleta + D12	6,32%	13,04%	12,23%
	Início D11 SN	6,48%	0,28%	31,26%
	Coleta + D12	1,81%	0%	3,06%
	Início D13	53,38%	0%	0,81%
	Coleta + D8	1,02%	0%	0,69%
	Início D15	2,23%	0%	31,05%
	Coleta + D10	4,76%	0%	5,04%
SFM	Início D13	23,97%	0%	1,18%
	Coleta + D8	0%	0%	1,83%
	Início 14 SN	19,82%	0%	1,77%
	Coleta + D9	1,9%	0%	0%
	Início D15	2,55%	0%	2,5%
	Coleta + D10	4,69%	0%	1,56%
	Início D15 SN	16,36%	0%	2,74%
	Coleta + D10	0%	2,76%	0%

Os dois experimentos que iniciaram com uma grande população de células CD34⁺, 53,38% em cultivo prévio em meio STEMdiff APEL 2 e 23,97% em cultivo prévio em meio SFM, não apresentaram porcentagens significativas de células positivas para os marcadores hematopoéticos e eritroides analisados ao final de 8 dias da maturação (Tabela 12). No entanto, como demonstrado na Figura 36, nos dois experimentos foi possível observar células com morfologia de células da linhagem mieloide ao final da maturação. Outros dois experimentos foram avaliados quanto aos marcadores eritroides após 12 dias de maturação e também não detectamos porcentagens significativas de células positivas.

Tabela 12 – Caracterização imunofenotípica para marcadores eritroides das células da linhagem PB12 coletadas após a maturação

Linhagem PB12	Maturação	Marcador			
		CD45 ⁺ CD43 ⁺	CD36 ⁺	CD71 ⁺	CD235a ⁺
STEMdiff APEL 2	Início D11	0%	-	6,59%	0%
	Coleta + D12	5,12%	-	7,89%	1,78%
	Início D11 SN	-	-	53,96%	1,3%
	Coleta + D12	0%	-	0%	0%
	Início D13	0%	0,18%	34,31%	2,63%
	Coleta + D8	0%	0%	3,2%	1,23%
SFM	Início D13	0%	0,12%	18,98%	1,64%
	Coleta + D8	0%	1,36%	4,13%	0,21%

As células da linhagem PBscd01 foram coletadas após 11 dias em meio de maturação e fez-se a caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo para os marcadores CD34, CD45 e CD43. As células previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 apresentaram aumento na porcentagem de células CD34⁺ após o cultivo em meio de maturação. As células previamente cultivadas em meio SFM apresentaram uma grande população de células CD34⁺, tanto para células coletadas do corpo embrioide, quanto para células coletadas do sobrenadante (Tabela 13). Não foi detectada uma população significativa de células CD45⁺ em nenhum dos experimentos com esta linhagem celular.

Tabela 13 – Caracterização imunofenotípica das células da linhagem PBscd01 coletadas após a maturação

Linhagem PBscd01	Maturação	Marcador		
		CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD43 ⁺
STEMdiff APEL 2	Início D14	0%	0%	2,34%
	Coleta + D11	4,06%	0%	1,08%
SFM	Início D14	9,21%	0%	6,85%
	Coleta + D11	47,91%	0,98%	6,6%
	Início D14 SN	3,14%	0%	26,98%
	Coleta + D11	10,01%	0%	5,16%

As células da linhagem PBscd08, previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2, apresentaram queda na porcentagem de células CD34⁺ e aumento na porcentagem de células CD45⁺ após o cultivo em meio de maturação, como o esperado. As células previamente cultivadas em meio SFM de dois experimentos apresentaram queda na porcentagem de células CD34⁺, outros dois experimentos apresentaram aumento de células CD34⁺. No entanto, as células dos quatro experimentos apresentaram aumento na porcentagem de células CD45⁺ após o cultivo em meio de maturação, como o esperado (Tabela 14).

Tabela 14 – Caracterização imunofenotípica para marcadores hematopoéticos das células da linhagem PBscd08 coletadas após a maturação

Linhagem PBscd08	Maturação	Marcador		
		CD34 ⁺	CD45 ⁺	CD43 ⁺
STEMdiff APEL 2	Início D14	31,71%	0%	5,21%
	Coleta + D12	1,42%	26,4%	36,36%
	Início D14 SN	37,51%	4,73%	23,54%
	Coleta + D12	1,24%	28,72%	73,42%
SFM	Início D8	38,02%	0%	-
	Coleta + D10	11,99%	53,67%	-
	Início D11	37,14%	3,9%	25,65%
	Coleta + D15	1,61%	90,02%	47,97%
	Início D16	3,98%	0%	20,31%
	Coleta + D10	55,25%	14,29%	20,66%
	Início D16 SN	4,44%	0,23%	7,04%
	Coleta + D10	15,57%	14,67%	10,89%

Verificou-se a porcentagem de células positivas para os marcadores hematopoéticos e eritroides CD43⁺CD45⁺, CD36⁺ e CD71⁺CD235a⁺ dos dois experimentos com células previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 e dos quatro experimentos com células previamente cultivadas em meio SFM (Tabela 15). A presença destes marcadores caracteriza as células progenitoras hematopoéticas e eritroides.

Tabela 15 – Caracterização imunofenotípica para marcadores eritroides das células da linhagem PBscd08 coletadas após a maturação

Linhagem PBscd08	Maturação	Marcador				
		CD43 ⁺ CD45 ⁺	CD71 ⁺ CD235a ⁺	CD36 ⁺	CD71 ⁺	CD235a ⁺
STEMdiff APEL 2	Início D14	0%	0%	-	25,49%	0%
	Coleta + D12	25,36%	7,38%	8%	24,06%	8,11%
	Início D14 SN	-	12,4%	-	16,74%	12,61%
	Coleta + D12	28,16%	5,92%	10,92%	18,02%	5,4%
SFM	Início D8	-	-	-	-	5,47%
	Coleta + D10	-	-	7,76%	34,95%	14,79%
	Início D11	-	9,06%	10,35%	21,75%	25,94%
	Coleta + D15	48,28%	0%	40,33%	66,17%	0,42%
	Início D16	-	0%	-	7,17%	0,03%
	Coleta + D10	5,67%	3,57%	-	24,06%	0,42%
	Início D16 SN	-	0%	-	23,35%	1,03%
	Coleta + D10	8,17%	5,86%	-	9,59%	4,46%

Discussão

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, demonstramos que iPSC derivadas de PBMC de pacientes com anemia falciforme podem ser diferenciadas *in vitro* em células-tronco/progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides. Também foi demonstrado o potencial destas células para a formação de colônias hematopoéticas em cultura em metilcelulose.

Ao longo da expansão, as colônias de iPSC das três linhagens apresentaram morfologia semelhante a CTE, com a presença de células pequenas, crescidas em colônias e justapostas (Figura 4), como relatado por Catelli (2016) e por Reis et al. (2017). As células foram adaptadas ao isolamento enzimático, por pelo menos 5 passagens, para permitir a maior sobrevivência das células individualizadas e melhor agregação no momento da formação dos corpos embrioides (NG et al., 2008). Ao longo dessa adaptação fizemos a caracterização imunofenotípica, que demonstrou alta porcentagem de células positivas para os marcadores de pluripotência OCT3/4, NANOG e SOX2 nas três linhagens celulares (Figura 6). A linhagem PB12, cultivada por 15 passagens, sendo 5 delas por isolamento enzimático, demonstrou menor porcentagem de células OCT3/4⁺ (73%) e NANOG⁺ (77,2%) quando comparado com a caracterização realizada por Catelli (2016). No entanto, Catelli (2016) realizou a caracterização com células em passagem menor e sem adaptação ao isolamento enzimático, o que pode explicar a obtenção de uma porcentagem maior de células positivas para os marcadores de pluripotência (88,44% OCT3/4⁺ e 90,4% NANOG⁺). A linhagem PBscd01, com mutação para anemia falciforme, demonstrou maior porcentagem de células positivas para os três marcadores quando comparado com a caracterização realizada por Reis et al. (2017). Observou-se a presença de diferenciação espontânea, no cultivo da linhagem PBscd01, em estruturas similares a rosetas neurais (Figura 4D). Essas diferenciações foram observadas tanto durante a expansão quanto durante a adaptação a passagem enzimática. Segundo Healy e Ruban (2015), as rosetas neurais demonstram uma estrutura radial de células em forma de colunas. Essa morfologia é observada em células pluripotentes comprometidas com a linhagem neuroepitelial. A linhagem PBscd08, também com mutação para anemia falciforme, demonstrou menor porcentagem de células positivas apenas para o marcador de pluripotência OCT3/4 (67,1%) quando comparado com a

caracterização realizada por Reis et al. (2017), em que 92% das células foram OCT3/4⁺.

A estratégia utilizada para diferenciação hematopoética foi a formação de corpos embrioides, uma estrutura 3D que mimetiza a formação do embrião *in vitro*. O método de diferenciação por formação de corpos embrioides permite o uso de meios sem soro permissíveis aos efeitos de citocinas e fatores de crescimentos (NG et al., 2008; YE et al., 2014). Neste trabalho, utilizamos dois meios de diferenciação sem soro, o meio comercial STEMdiff APEL 2 e o meio SFM preparado *in house*, suplementados com citocinas que favorecem a indução mesodérmica e diferenciação hematopoética. A formação de corpos embrioides foi observada nas quatro linhagens celulares 24 horas após a centrifugação, como relatado por Ng et al. (2008), quando essa foi realizada utilizando o meio de diferenciação comercial STEMdiff APEL 2 (Figura 7). Quando utilizado o meio de diferenciação SFM preparado *in house*, conforme descrito por Ng et al. (2008) e Bai et al. (2016), não foi observada a formação de corpos embrioides tão uniformes, mesmo com a adição de 0,05% de polivinil álcool para favorecer a formação do corpo embrioide (Figura 8). O meio de diferenciação utilizado influenciou na formação e uniformidade dos corpos embrioides e, provavelmente, isto está relacionado com a preparação *in house* do meio SFM. Alguns fatores que podem ter contribuído são: a variabilidade entre lotes de albumina humana, e principalmente, o preparo da solução e a concentração de PVA utilizada. Foi utilizada a combinação de 0,5% de albumina humana e 0,05% de PVA na formulação do meio SFM, como indicado por Ng et al. (2008). Autores tem reportado que a adição de albumina melhora o crescimento e a saúde das células em cultura (ASHMAN et al., 2005; ZOELLNER et al., 1996), mas a adição da albumina no meio de cultura traz uma maior variabilidade, o que pode comprometer a reprodutibilidade dos experimentos de diferenciação. Esta concentração de albumina e PVA, segundo Ng et al. (2008), está otimizada para a indução mesodérmica, que fica comprometida quando utilizada proporções maiores de PVA. Em nossos experimentos não testamos diferentes concentrações dos reagentes. Também foram observados corpos embrioides aderidos a cultura, principalmente quando as células foram cultivadas em meio SFM (Figura 9). No entanto, os corpos embrioides não uniformes e com células aderidas a cultura permitiram o surgimento de células no sobrenadante e positivas para os marcadores hematopoéticos. Ng et al. (2008) demonstrou que corpos

embrioides formados com mais de 4000 células podem apresentar estruturas que lembram epitélio neural mesmo em meio indutor de mesoderme. Desta forma, mantivemos o número de células iniciais entre 2000 e 4000 e observamos que o tamanho do corpo embrioide foi proporcional ao número de células iniciais. Apenas um experimento, realizado com 5800 células iniciais da linhagem PBscd08 em meio de diferenciação STEMdiff APEL 2, demonstrou corpos embrioides com morfologia bastante variável (Figura 10) mas, ainda assim, foram detectadas células positivas para os marcadores hematopoéticos.

Avaliamos a porcentagem de células positivas para os marcadores de pluripotência no início da diferenciação. Após 4 dias da formação do corpo embrioide e da indução hematopoética, foi observada a queda na porcentagem de células positivas para os marcadores de pluripotência avaliados, OCT3/4 e NANOG, nas células dos corpos embrioides das duas linhagens avaliadas (Figura 13). Isto indica uma perda da pluripotência das células, e consequentemente, o início do comprometimento. Essa queda na porcentagem de células positivas para os marcadores de pluripotência também foi verificada por Reis et al. (2017) no dia 4 da diferenciação, nos experimentos com a linhagem PBscd08.

Para verificar o progresso da diferenciação, foram feitas análises dos corpos embrioides em diferentes tempos do desenvolvimento para a presença dos antígenos CD34, CD45 e CD43. Esses são marcadores de superfície conhecidamente presentes em células hematopoéticas mais primitivas obtidas em culturas de diferenciação de células-tronco pluripotentes. CD34 é uma glicoproteína transmembrana e um marcador utilizado para caracterizar células-tronco progenitoras hematopoéticas. No entanto, no início do desenvolvimento embrionário, esta molécula é expressa também em células progenitoras endoteliais. O endotélio hemogênico é uma subpopulação de células vasculares endoteliais rara e altamente especializada que funciona como precursor para o desenvolvimento hematopoético. A transição endotelial-hematopoética é o processo no qual as células do endotélio hemogênico passam do estado fenotípico de células endoteliais estacionárias para células-tronco progenitoras hematopoéticas não aderidas (ANGELOS et al., 2018). Ditadi et al. (2015) distinguiram células do endotélio hemogênico de células vasculares endoteliais através da presença e ausência de marcadores. O endotélio hemogênico é restrito a fração

CD34⁺CD73⁻CD184⁻ de células em corpos embrioides no dia 8 da diferenciação e são dependentes de NOTCH para a realização da transição endotelial-hematopoética e geração de células com potencial multilinhagem. Já as células progenitoras vasculares endoteliais são restritas as frações CD34⁺CD73^{med}CD184⁺ e CD34⁺CD73^{hi}CD184⁻. Angelos et al. (2018) também demonstraram que células do endotélio hemogênico e progenitoras hematopoéticas derivadas de células-tronco embrionárias compartilham vias de desenvolvimento, enquanto células vasculares endoteliais sem a capacidade de endotélio hemogênico são mais heterogêneas, distintas em relação ao perfil transcricional e têm uma exclusiva população de células mesenquimal/fibroblasto-like. Em nosso trabalho, verificamos que as linhagens PBscd01 e PBscd08 cultivadas em meio SFM promoveram o surgimento de uma população de células endoteliais CD31⁺CD144⁺CD34⁺ por volta do dia 4 da diferenciação. Também vimos na cultura que os corpos embrioides apresentaram células aderidas (Figura 9 A-B). Por volta do dia 8 da diferenciação, essa população de células deu lugar a células CD34⁺ e CD45⁺ (Figura 14 e Figura 15).

Neste estudo, detectamos células CD34⁺ nos corpos embrioides do dia 8 dos experimentos com as quatro linhagens celulares cultivadas nos dois meios de diferenciação (Figura 20). O meio de diferenciação SFM gerou uma maior porcentagem de células CD34⁺ para todas as linhagens comparado ao meio STEMdiff APEL 2. No entanto, não foi possível realizar análises estatísticas e verificar se houve diferença estatística significativa entre os meios utilizados devido ao número de replicatas. Os dois meios proporcionaram o surgimento de células CD34⁺ e podem ser usados na diferenciação hematopoética. A linhagem PBscd08 apresentou a maior porcentagem de células CD34⁺ entre as linhagens cultivadas com o meio de diferenciação SFM e com meio STEMdiff APEL 2. No entanto, comparando as porcentagens de células CD34⁺ no dia 8 entre as linhagens PBscd01 (22,77% ± 11,02%) e PBscd08 (53,99 ± 24,49%) cultivadas no meio SFM não foi verificada diferença estatística (P=0,059, Teste t não-pareado). Não foi possível realizar análises estatísticas e verificar se houve diferença estatística significativa entre as demais linhagens utilizadas devido ao número de replicatas. Ng et al. (2005) obtiveram cerca de 23% de células CD34⁺ em corpos embrioides coletados no dia 11 da diferenciação de CTE em meio sem soro suplementado com citocinas. Bai et al. (2013, 2016) demonstraram a geração de células CD34⁺ a partir de corpos embrioides de linhagens

de CTE e iPSC e obtiveram cerca de 23% de células CD34⁺ no dia 8 da diferenciação. Reis et al. (2017) obtiveram, a partir de corpos embrioides da linhagem PBscd08, cerca de 58% de células CD34⁺ no dia 8 da diferenciação em meio STEMdiff APEL suplementado com citocinas BMP4, FGF, VEGF e SCF. As populações de células CD34⁺ obtidas com as linhagens PB12, PBscd01 e PBscd08 neste trabalho foram significativas e correspondentes ao relatado na literatura (BAI et al., 2013, 2016; NG et al., 2005; REIS et al., 2017).

O antígeno pan-leucocitário CD45 é uma glicoproteína de membrana que é expressa em quase todas as células hematopoéticas, exceto plaquetas e eritrócitos maduros. Wang et al. (2004), utilizando CTE, demonstraram que células CD45⁺ foram detectadas apenas depois de 10 dias do desenvolvimento de corpos embrioides, e aglomerados de células hematopoéticas, após 15 dias. Ao longo do nosso estudo, detectamos células CD45⁺ nos corpos embrioides a partir do dia 4 até o dia 15 da diferenciação com meio SFM, e apenas no dia 14 da diferenciação com meio STEMdiff APEL 2 (Figura 21, Figura 22 e Figura 23). De acordo com os nossos resultados, o meio SFM induziu o surgimento de células CD45⁺ mais cedo que o meio STEMdiff APEL 2. Inclusive, em algumas linhagens o marcador CD45 não foi detectado quando as células foram cultivadas em meio STEMdiff APEL 2, mas não descartamos a possibilidade de que o marcador viria a ser detectado caso a cultura fosse prolongada. A linhagem PBscd08, que carrega a mutação para anemia falciforme, gerou células CD45⁺ apenas com os corpos embrioides cultivados em meio SFM, sendo estas detectadas desde o dia 4 até o dia 15 da diferenciação e atingindo no dia 11 a média de $36,31 \pm 26,02\%$ (N=3) (Figura 23). Kennedy et al. (2012) detectaram células CD45⁺ a partir do dia 13 da diferenciação de CTE, quando verificaram cerca de 21,7% de células positivas que aumentaram no dia 15, atingindo cerca de 28,4% de células CD45⁺ nos corpos embrioides. Também foram identificadas populações duplo-positivas CD34⁺CD45⁺ de células da linhagem PBscd08 entre os dias 4 e 15 da diferenciação (Figura 24), e no dia 11 obtivemos uma média de $37,4 \pm 31,66\%$ (N=3). Kobari et al. (2012) realizaram a diferenciação de células iPSC com mutação para anemia falciforme através da formação de corpos embrioides e detectaram, após 27 dias de cultivo, cerca de 65% de células CD45⁺ e 3% de células CD34⁺CD45⁺. Reis et al. (2017) obtiveram, a partir de corpos embrioides da linhagem PBscd08, cerca de 38% de células CD34⁺CD45⁺ no dia 8 da diferenciação. A linhagem PBscd01, que

também carrega a mutação para anemia falciforme, e as linhagens saudáveis PB12 e H1 não apresentaram populações de células $CD34^+CD45^+$ ao final de 14 dias da diferenciação.

CD43 é uma das mais prevalentes sialoglicoproteínas leucocitárias transmembrana expressa em células da linhagem hematopoética, inclusive em células-tronco hematopoéticas. Vodyanik, Thomson e Slukvin (2006) demonstraram que progenitores hematopoéticos derivados de CTE podem ser identificados pelo marcador CD43. Inclusive, a seleção de $CD43^+$ separa as células hematopoéticas $CD34^+$ das células endoteliais $CD34^+CD43^-KDR^+CD31^+$. Kennedy et al. (2012) detectaram células $CD43^+$ a partir do dia 9 do desenvolvimento dos corpos embrioides de CTE. Neste trabalho, detectamos a presença de células $CD43^+$ nos corpos embrioides das quatro linhagens celulares nas duas condições de meio de cultivo. A porcentagem de células $CD43^+$ variou ao longo da diferenciação com picos entre os dias 8 e 15. Para a linhagem PBscd01, a porcentagem de células $CD43^+$ geradas não foi afetada pelo meio de diferenciação em que ela foi cultivada (Figura 27). Para as linhagens H1 e PB12, a porcentagem de $CD43^+$ no início da diferenciação não pareceu ser afetada pelo meio em que as células estavam sendo cultivadas. No entanto, por volta dos dias 14 e 15, observou-se um aumento na porcentagem de células $CD43^+$ nas duas linhagens cultivadas em meio STEMdiff APEL 2, cerca de 2,16 vezes para a linhagem H1 e 12,42 vezes para a linhagem PB12 (Figura 25 A e Figura 26 A). Já a linhagem celular PBscd08 em meio STEMdiff APEL 2 não apresentou esse aumento de células $CD43^+$ no dia 14 da diferenciação. No entanto, quando cultivada em meio SFM, essa linhagem apresentou uma média de $65,62 \pm 34,64\%$ (N=3) de células $CD43^+$ no dia 11 da diferenciação (Figura 28 B). Reis et al. (2017) obtiveram, a partir de corpos embrioides da linhagem PBscd08, cerca de 29% de células $CD43^+$ no dia 8 da diferenciação com meio STEMdiff APEL. Neste trabalho, a linhagem PBscd08 cultivada em meio SFM gerou alta porcentagem de células positivas para os marcadores hematopoéticos analisados, o que não aconteceu com as demais linhagens. Kessel et al. (2017) induziram a diferenciação hematopoética de iPSC através do método de formação de corpos embrioide e determinaram que células $CD43^+$ são a população de células que dão origem a eritropoiese *in vitro*. Também demonstraram, por ensaio de formação de colônia, que a fração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas com potencial multipotente é enriquecida na

população de células $CD43^+CD45^+$. Neste estudo, nós obtivemos células $CD43^+CD45^+$ entre os dias 11 e 15 da diferenciação, apenas com a linhagem celular PBscd08, onde cerca de $38,79 \pm 51,26\%$ (N=2) das células foram duplo-positivas no dia 11 e 59% no dia 15 (N=1) (Figura 29). Como demonstrado anteriormente, esta foi a única linhagem a também gerar células $CD34^+CD45^+$.

Assim como demonstrado por Kessel et al. (2017), em nossos ensaios de formação de colônia com células dos corpos embrioides da linhagem PBscd08 coletados nos dias 8 e 11 da diferenciação com meio SFM foi possível observarmos a formação de colônias hematopoéticas, inclusive colônias da linhagem eritroide (Figura 33). Também observamos o potencial de formação de colônia tão cedo quanto em células de corpos embrioides da linhagem PBscd08 com 6 dias de desenvolvimento, quando cultivados em meio STEMdiff APEL 2. No entanto, com esta população de células, com alta porcentagem de células $CD34^+$, baixa porcentagem de células $CD43$ e sem a presença do marcador $CD45$, não foram observadas entre as colônias hematopoéticas geradas, colônias da linhagem eritroide (Figura 32). A formação de colônias hematopoéticas a partir de corpos embrioides de 6 e 8 dias na ausência de células $CD45^+$, corrobora os achados de Wang et al. (2004) e Vodyanik, Thomson e Slukvin (2006), em que os autores verificaram que os corpos embrioides analisados entre os dias 7 e 10 do desenvolvimento já continham células precursoras hematopoéticas competentes, mesmo na ausência da expressão do marcador $CD45$. Kennedy et al. (2012) analisaram as populações de células $CD34/CD43$ para o potencial de formação de colônias. Segundo os autores, a população de células $CD34^-CD43^+$ geraram colônias eritroides e mieloides, mas as células $CD34^+CD43^-$ e $CD34^-CD43^-$ não geraram nenhuma colônia. Neste estudo, populações de células, inclusive contendo células $CD43^+$, coletadas de corpos embrioides da linhagem PB12 geraram apenas colônias de células aderidas e alongadas após o cultivo em metilcelulose (Figura 30). Também foram realizados ensaios de formação de colônias com a linhagem PBscd01. Em dois ensaios com populações contendo células $CD34^+$ e baixa porcentagem de células $CD43^+$ foram observadas apenas colônias de células aderidas e alongadas (Figura 31).

Além das coletas de corpos embrioides ao longo da diferenciação para análise de marcadores hematopoéticos, também foram feitas coletas de células presentes no

sobrenadante do cultivo com os dois meios de diferenciação. Wang et al. (2013) e Huang et al. (2015) relataram o surgimento de células no sobrenadante entre os dias 10 e 14 da diferenciação. Neste trabalho, foram observados o surgimento e a expansão de células no sobrenadante entre os dias 8 e 14 da diferenciação com os dois meios de diferenciação utilizados. Observamos o maior número de células no sobrenadante nos experimentos com o meio SFM (Figura 12) em comparação ao meio STEMdiff APEL 2, que formou corpos embrioides mais uniformes (Figura 11). No entanto, ao final da diferenciação, foram detectadas poucas células viáveis no sobrenadante nas duas condições para todas as linhagens, entre 4,35% a 27,8% de células viáveis (Tabela 4). Huang et al. (2015) demonstraram uma expansão de cinco vezes no número de células CD34⁺ no sobrenadante em relação ao número inicial de iPSC. Neste trabalho, obtivemos uma expansão máxima de 2,4 vezes, para as células da linhagem H1 cultivadas em meio SFM, onde 44,64% destas células eram CD34⁺ e 9,11% CD45⁺, mas não foram detectadas células CD34⁺CD45⁺ (Tabela 5). Foram detectadas populações de células CD34⁺ no sobrenadante dos experimentos com a linhagem PB12 principalmente naqueles coletados no dia 13 da diferenciação com meio STEMdiff APEL 2 e nos dias 14 e 15 com o meio SFM (Tabela 6). As células do sobrenadante coletadas nos experimentos com a linhagem PBscd01 nos dois meios de diferenciação apresentaram baixa porcentagem de CD34⁺ (Tabela 7) e também não foram detectadas células duplo-positivas CD34⁺CD45⁺. As coletas do sobrenadante dos experimentos com a linhagem PBscd08 com meio STEMdiff APEL 2 apresentaram células duplo-positivas para CD34⁺CD45⁺ (5,5%) e CD43⁺CD45⁺ (5,89%) (Tabela 8). Os experimentos realizados com o meio SFM e coletados no dia 15 geraram células duplo-positivas para CD34⁺CD45⁺ (35,13%) e CD43⁺CD45⁺ (33,43%) (Tabela 8). Em experimentos de diferenciação com iPSC, Wang et al. (2013) detectaram 46,8% de células CD34⁺CD45⁺ no sobrenadante dos corpos embrioides no dia 14 da diferenciação. Ye et al. (2014) e Huang et al. (2015) detectaram maiores porcentagens de células CD34⁺CD45⁺, cerca de 73% e 64,8%, respectivamente, no sobrenadante no dia 14 da diferenciação de iPSC por formação de corpos embrioides. De forma geral, obtivemos células no sobrenadante positivas para o marcador CD34, mas apenas aquelas da linhagem PBscd08 apresentaram populações com células positivas para mais de um marcador hematopoético avaliado.

Após o cultivo dos corpos embrioides e coleta das células do sobrenadante, fez-se o cultivo destas células em meio de maturação, preparado a partir do meio de cultivo SFM suplementado com citocinas para a indução da diferenciação eritroide e sem a adição de PVA, como sugerido por Ng et al. (2008). Segundo Xie et al. (2015), placas cobertas com matriz extracelular proporcionam a geração de um maior número de agregados hematopoéticos em comparação com a ausência de matriz extracelular, o que sugere que as proteínas proporcionam melhor desenvolvimento hematopoético das células progenitoras. Desta forma, fizemos a maturação das células em placas tratadas com gelatina (Tabela 9). Xie et al. (2015), observaram células aderidas e células arredondadas e semi-aderidas após 4 dias em cultivo sobre matriz extracelular. Neste estudo, foram observadas células aderidas a cultura e a expansão de células arredondadas e semi-aderidas com morfologia similar a células-tronco/progenitoras hematopoéticas, principalmente nos experimentos com a linhagem PBscd08, após 5 dias do início do cultivo em meio de maturação (Figura 38). As células da linhagem PB12, previamente cultivadas nos dois meios de diferenciação por 13 dias, foram coradas após 8 dias em meio de maturação e foi possível observar células com morfologia de células hematopoéticas, principalmente da linhagem mieloide (Figura 36). No entanto, não verificamos na caracterização imunofenotípica através de marcadores de superfície uma significativa porcentagem de células positivas para os marcadores CD71, CD36 e CD235a (Tabela 12). Huang et al. (2015) demonstraram a geração de populações de células com morfologia eritroide após 10 dias em meio de maturação.

Após o período de maturação, detectamos o aumento na porcentagem de células CD34⁺ no experimento com a linhagem H1 previamente cultivada em meio SFM, bem como o aumento na população de células CD43⁺. No entanto, não detectamos células CD45⁺ (Tabela 10). Foram observadas muitas células aderidas na cultura, o que pode indicar a presença de células endoteliais CD34⁺ sem potencial hemogênico (Figura 34 C e D). Também detectamos aumento da população de células CD34⁺ nos três experimentos realizados com a linhagem PBscd01. Porém, não foram detectadas células CD45⁺ (Tabela 13). No experimento com maior porcentagem de células CD34⁺ também verificamos a presença de muitas células aderidas a cultura, o que pode indicar a presença de células endoteliais CD34⁺ sem potencial hemogênico (Figura 37 C e D). Outros marcadores para caracterização de células

progenitoras endoteliais, como CD31, CD144 e CD73, não foram incluídos nessas análises imunofenotípicas. Angelos et al. (2018) obtiveram, após 15 dias de diferenciação, cerca de 11% de células com fenótipo CD34⁺CD45⁺ e 16% de CD34⁺CD43⁺. Esse estudo também utilizou a técnica de formação de corpos embrioides por spin e meio sem soro suplementado com citocinas BMP4, VEGF e SCF nos primeiros 6 dias para promover a indução de mesoderme. Similarmente ao realizado no nosso estudo, os autores transferiram os corpos embrioides para placas tratadas com gelatina e utilizaram meio suplementado com as citocinas SCF, VEGF, TPO, IL-3 e IL-6 por até 15 dias. Isso permitiu a adesão das células endoteliais a cultura e a emergência de células progenitoras hematopoéticas não aderidas. No entanto, os autores relataram que, células endoteliais sem potencial endotélio hemogênico mantiveram a morfologia endotelial e não foram capazes de gerar células-tronco/progenitoras hematopoéticas. Em nosso estudo, foram detectadas células CD45⁺ em apenas um experimento com a linhagem PB12 com células previamente cultivadas em meio STEMdiff APEL 2 por 11 dias (Tabela 11). Como esperado para a maturação de células CD34⁺, observou-se o declínio da população de células CD34⁺ e o aumento da população de células CD45⁺ e CD43⁺. Nos demais experimentos com esta linhagem celular observamos a queda na porcentagem de células CD34⁺ (Tabela 11) mas não detectamos populações CD45⁺ e CD43⁺. As células da linhagem PBscd08 coletadas ao final da diferenciação, dissociadas e cultivadas em meio de maturação para indução eritroide demonstraram aumento na porcentagem de células CD45⁺ em todos os experimentos realizados (Tabela 14). Também foi detectada a queda na marcação de CD34, com exceção de dois experimentos iniciados com uma pequena população de células CD34⁺ que tiveram aumento após o cultivo em meio de maturação. Huang et al. (2015) demonstraram a geração de células progenitoras eritroides após 10 dias em meio suplementado com citocinas SCF, EPO, IL-3 e holo-transferrina. Os pesquisadores relataram a presença de marcadores de eritroblastos, onde cerca de 55% das células foram CD45⁺ e 77,8% das células foram CD36⁺CD235a⁺.

A expressão de CD34 é alta em populações de células progenitoras megacariócito-eritroide e baixa na população de pró-eritroblastos. Os pró-eritroblastos demonstram alta expressão de CD36, CD71 e CD235a, ausentes em progenitores megacariócito-eritroide. CD45 é expresso em progenitores megacariócito-eritroide,

em pró-eritroblastos e tem expressão diminuída em eritroblastos basofílicos (ATTAR, 2014). Kobari et al. (2012) realizaram a diferenciação de células iPSC com mutação para anemia falciforme através da formação de corpos embrioides por 27 dias e mais 25 dias em meio de diferenciação eritroide, e detectaram aumento na porcentagem de células positivas para os três marcadores eritroides, de 69% para 95% de células CD71⁺, de 2,7% para 11% CD36⁺ e de 10,5% para 98% CD235a⁺. Kessel et al. (2017) detectaram, ao final de 18 dias em meio de diferenciação para indução eritroide, cerca de 25% de células CD36⁺, e quase totalidade de células CD71⁺ e CD235a⁺. No presente estudo, marcadores de progenitores eritroides foram apenas detectados nos experimentos com as células da linhagem PBscd08 (Tabela 15). Em um experimento, o cultivo das células por 15 dias em meio de maturação gerou 48,28% de células duplo-positivas CD43⁺CD45⁺, sendo 90,02% de células CD45⁺, 40,33% de CD36⁺ e 66,17% de CD71⁺, mas não foram detectadas porcentagens significativas de células CD235a⁺.

Conforme evidenciado neste trabalho, a linhagem celular de iPSC PBscd08 se mostrou ser um modelo de anemia falciforme eficiente capaz de gerar células progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides *in vitro* através da formação de corpos embrioides. Assim, para esta linhagem celular, determinamos que o meio de diferenciação SFM preparado *in house* e suplementado com citocinas promoveu a geração da maior porcentagem de células CD34⁺CD45⁺ e CD43⁺CD45⁺ em corpos embrioides cultivados por, pelo menos, 8 dias. Estas células apresentaram potencial de formação de colônias hematopoéticas, inclusive de colônias eritroides, quando cultivadas por mais 14 dias em meio semi-sólido. O cultivo das células dos corpos embrioide desta linhagem por, pelo menos, mais 10 dias em meio de maturação eritroide, promoveu o surgimento de populações CD36⁺ e CD71⁺CD235a⁺.

A linhagem de células pluripotentes PBscd08, com mutação para anemia falciforme, demonstrou maior potencial para diferenciação em células hematopoéticas e da linhagem eritroide que as demais linhagens celulares avaliadas, independente do meio de cultivo utilizado. Essa linhagem gerou células-tronco/progenitoras hematopoéticas de fenótipos CD34⁺CD45⁺ e CD45⁺CD43⁺ e progenitores eritroides (CD36⁺, CD71⁺ e CD235a⁺), bem como a formação de colônias hematopoéticas em cultura em meio semi-sólido. A linhagem de iPSC PBscd01, também gerada a partir de PBMC de paciente de anemia falciforme, não demonstrou o mesmo potencial para

a diferenciação hematopoética, gerando apenas células CD34⁺ e baixa porcentagem de células CD45⁺ e CD43⁺. A linhagem de células pluripotentes PB12, gerada a partir de PBMC de indivíduo saudável, também não demonstrou o mesmo potencial para a diferenciação hematopoética e eritroide que a linhagem PBscd08, conforme demonstrado pelas análises imunofenotípicas das células ao final da maturação. No entanto, a linhagem PB12 promoveu a geração de populações de células CD34⁺, CD45⁺ e CD43⁺ e a geração de células com morfologia de células mieloides após a maturação. A linhagem de células pluripotentes embrionárias H1 não demonstrou o mesmo potencial para a diferenciação hematopoética que a linhagem PBscd08. A realização de um maior número de replicatas com a linhagem H1 nos forneceria mais e melhores dados para possibilitar a comparação do método de diferenciação hematopoética empregado neste estudo. Essas discrepâncias do potencial de diferenciação hematopoética sugerem uma variabilidade entre as diferentes linhagens celulares de iPSC. Choi et al. (2009) demonstraram variabilidade na eficiência de diferenciação hematopoética a partir de iPSC. No entanto, essa variabilidade foi compatível à observada entre diferentes linhagens de CTE. Bock et al. (2011) postularam que variações na diferenciação entre linhagens de iPSC estão dentro do espectro de variação das CTE. Dorn et al. (2015) observaram variações na expressão de CD43 em diferentes linhagens de iPSC, e atribuíram essas variações às passagens em cada linhagem. Nishizawa et al. (2016) demonstraram que características moleculares influenciam na capacidade de diferenciação de linhagens de iPSC. No estudo, os autores concluíram que a capacidade de maturação de precursores hematopoéticos em células maduras do sangue está associada com a quantidade e padrão de metilação do DNA adquirida durante a reprogramação. Outros autores também relataram diferenças entre linhagens de iPSC e entre iPSC e CTE, demonstrando a influência do *background* genético na variação do potencial hematopoético em vez do método de reprogramação (FENG et al., 2010; FÉRAUD et al., 2016; MIURA et al., 2009).

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Este trabalho padronizou e implementou, no Hemocentro de Ribeirão Preto, um protocolo de geração de progenitores hematopoéticos e eritroides a partir de iPSC paciente-específico para anemia falciforme.

- O meio de diferenciação comercial, STEMdiff APEL 2, proporcionou a formação de corpos embrioides uniformes e demonstrou potencial para geração de células progenitoras hematopoéticas;
- O meio de diferenciação preparado *in house*, SFM, proporcionou a formação de corpos embrioides menos uniformes, mas demonstrou potencial para geração de células progenitoras hematopoéticas;
- A linhagem de iPSC paciente-específico para anemia falciforme, PBscd08, gerou células com fenótipo de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides, e colônias hematopoéticas em cultivo em meio semi-sólido, podendo ser utilizada como modelo de estudo da anemia falciforme;
- A linhagem de iPSC saudável, PB12, não apresentou populações com fenótipo de células-tronco/progenitoras hematopoéticas, mas gerou células com morfologia de células da linhagem mieloide ao final da maturação;
- As linhagens celulares de iPSC demonstraram variabilidade quanto ao potencial de diferenciação hematopoética.

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ADOLFSSON, J. et al. Identification of Flt3+ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential. **Cell**, v. 121, n. 2, p. 295–306, abr. 2005.

ANGELOS, M. G. et al. Single Cell Resolution of Human Hematoendothelial Cells Defines Transcriptional Signatures of Hemogenic Endothelium. **STEM CELLS**, v. 36, n. 2, p. 206–217, fev. 2018.

ANTAS, V. I. et al. Hemogenic endothelium: A vessel for blood production. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 45, n. 3, p. 692–695, mar. 2013.

ASHMAN, N. et al. Albumin stimulates cell growth, L-arginine transport, and metabolism to polyamines in human proximal tubular cells. **Kidney International**, v. 67, n. 5, p. 1878–1889, maio 2005.

ATTAR, A. Changes in the Cell Surface Markers During Normal Hematopoiesis: A Guide to Cell Isolation. **Global Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 1, n. 1, p. 20–28, 17 out. 2014.

BAI, H. et al. BMP4 regulates vascular progenitor development in human embryonic stem cells through a smad-dependent pathway. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 109, n. 2, p. n/a-n/a, 2009.

BAI, H. et al. The Balance of Positive and Negative Effects of TGF- β Signaling Regulates the Development of Hematopoietic and Endothelial Progenitors in Human Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 20, p. 2765–2776, 15 out. 2013.

BAI, H. et al. Definitive Hematopoietic Multipotent Progenitor Cells Are Transiently Generated From Hemogenic Endothelial Cells in Human Pluripotent Stem Cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 5, p. 1065–1076, maio 2016.

BHATIA, M. Hematopoietic Development from Human Embryonic Stem Cells. **Hematology**, v. 2007, n. 1, p. 11–16, 1 jan. 2007.

BOCK, C. et al. Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. **Cell**, v. 144, n. 3, p. 439–452, fev. 2011.

BOISSET, J.-C. et al. In vivo imaging of haematopoietic cells emerging from the mouse aortic endothelium. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 116–120, 14 mar. 2010.

BOYER, S. W. et al. All Hematopoietic Cells Develop from Hematopoietic Stem Cells through Flk2/Flt3-Positive Progenitor Cells. **Cell Stem Cell**, v. 9, n. 1, p. 64–73, jul. 2011.

CATELLI, L. F. **Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSCs) a partir de células somáticas de indivíduos com fenótipo de interesse para**

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

transfusões sanguíneas. Dissertação (Mestrado em Oncologia clínica, células-tronco e terapia celular) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, p. 85. 2016.

CHOI, K. et al. Hematopoietic and Endothelial Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 3, p. 559–567, mar. 2009.

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, 18 mar. 2011.

CHOU, B.-K. et al. A Facile Method to Establish Human Induced Pluripotent Stem Cells From Adult Blood Cells Under Feeder-Free and Xeno-Free Culture Conditions: A Clinically Compliant Approach. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 4, n. 4, p. 320–332, abr. 2015.

DITADI, A. et al. Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages. **Nature Cell Biology**, v. 17, n. 5, p. 580–591, 27 maio 2015.

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, 1 jan. 2015.

DOULATOV, S. et al. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. **Nature Immunology**, v. 11, p. 585, 13 jun. 2010.

DOULATOV, S. et al. Hematopoiesis: A Human Perspective. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 2, p. 120–136, fev. 2012.

DUFFY, A. M.; BOUCHIER-HAYES, D. J.; HARMEY, J. H. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. In: **VEGF and Cancer**. Austin (TX): Landes Bioscience, 2013. p. 133–144.

EATON, J. W.; HEBBEL, R. P. Pathogenesis of sickle cell disease. **Pathobiology Annual**, v. 11, p. 31–52, 1981.

FANG, J. et al. EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts. **Blood**, v. 110, n. 7, p. 2361–2370, 1 out. 2007.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 3, p. 203–208, 2010.

FENG, Q. et al. Hemangioblastic Derivatives from Human Induced Pluripotent Stem Cells Exhibit Limited Expansion and Early Senescence. **STEM CELLS**, v. 28, n. 4, p. 704–712, 12 fev. 2010.

FÉRAUD, O. et al. Donor Dependent Variations in Hematopoietic Differentiation among Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cell Lines. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0149291, 3 mar. 2016.

GODIN, I. Ontogeny of the Hematopoietic System. In: **Kaufman's Atlas of Mouse Development Supplement**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 111–120.

GOLDMAN, D. C. et al. BMP4 regulates the hematopoietic stem cell niche. **Blood**, v. 114, n. 20, p. 4393–4401, 12 nov. 2009.

HANNA, J. et al. Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1920–1923, 21 dez. 2007.

HEALY, L.; RUBAN, L. **Atlas of Human Pluripotent Stem Cells in Culture**. [s.l.] Springer, 2015.

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, maio 2015.

HUBER, T. L. et al. Haemangioblast commitment is initiated in the primitive streak of the mouse embryo. **Nature**, v. 432, n. 7017, p. 625–30, 2 dez. 2004.

JAGANNATHAN-BOGDAN, M.; ZON, L. I. Hematopoiesis. **Development**, v. 140, n. 12, p. 2463–2467, 15 jun. 2013.

KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, p. 18010, 15 mar. 2018.

KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin: More than a lineage-specific megakaryocyte growth factor. **Stem Cells**, v. 15, n. S2, p. 97–103, abr. 1997.

KAUSHANSKY, K. Lineage-Specific Hematopoietic Growth Factors. **New England Journal of Medicine**, v. 354, n. 19, p. 2034–2045, 11 maio 2006.

KENNEDY, M. et al. Development of the hemangioblast defines the onset of hematopoiesis in human ES cell differentiation cultures. **Blood**, v. 109, n. 7, p. 2679–2687, 2007.

KENNEDY, M. et al. T Lymphocyte Potential Marks the Emergence of Definitive Hematopoietic Progenitors in Human Pluripotent Stem Cell Differentiation Cultures. **Cell Reports**, v. 2, n. 6, p. 1722–1735, dez. 2012.

KESSEL, K. U. et al. Emergence of CD43-Expressing Hematopoietic Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 44, n. 3, p. 143–150, 2017.

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. 1795–1803, 1 dez. 2012.

LANCRIN, C. et al. The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. **Nature**, v. 457, n. 7231, p. 892–895, 28 fev. 2009.

LANZKRON, S.; CARROLL, C. P.; HAYWOOD, C. Mortality Rates and Age at Death

from Sickle Cell Disease: U.S., 1979–2005. **Public Health Reports**, v. 128, n. 2, p. 110–116, mar. 2013.

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, out. 2010.

LEE, T.-J. et al. Enhancement of osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells by mesodermal lineage induction with BMP-4 and FGF2 treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 430, n. 2, p. 793–797, jan. 2013.

LENNARTSSON, J.; RÖNNSTRAND, L. Stem Cell Factor Receptor/c-Kit: From Basic Science to Clinical Implications. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 4, p. 1619–1649, out. 2012.

LI, J. et al. Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. **Blood**, v. 124, n. 24, p. 3636–3645, 4 dez. 2014.

LIM, W. F. et al. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 4, n. 3, p. 71, 18 jun. 2013.

LIU, S. et al. Progress and challenges in generating functional hematopoietic stem/progenitor cells from human pluripotent stem cells. **Cytotherapy**, v. 17, n. 4, p. 344–358, abr. 2015.

MACRÌ, S. et al. Immunophenotypic Profiling of Erythroid Progenitor-Derived Extracellular Vesicles in Diamond-Blackfan Anaemia: A New Diagnostic Strategy. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138200, 22 set. 2015.

MANZ, M. G. et al. Prospective isolation of human clonogenic common myeloid progenitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 18, p. 11872–11877, 3 set. 2002.

MEDVINSKY, A.; DZIERZAK, E. Definitive Hematopoiesis Is Autonomously Initiated by the AGM Region. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 897–906, set. 1996.

MIKKOLA, H. K. A.; ORKIN, S. H. The journey of developing hematopoietic stem cells. **Development**, v. 133, n. 19, p. 3733–44, 1 out. 2006.

MIURA, K. et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 743–745, 9 ago. 2009.

MURRAY, P. D. F. The Development in vitro of the Blood of the Early Chick Embryo. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 111, n. 773, p. 497–521, 1 out. 1932.

NAKAGAWA, M. et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. **Scientific Reports**, v. 4, p. 3594, 8 jan. 2014.

NG, E. S. et al. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. **Blood**,

v. 106, n. 5, p. 1601–3, 1 set. 2005.

NG, E. S. et al. A protocol describing the use of a recombinant protein-based, animal product-free medium (APEL) for human embryonic stem cell differentiation as spin embryoid bodies. **Nature Protocols**, v. 3, n. 5, p. 768–776, 1 maio 2008.

NISHIZAWA, M. et al. Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 3, p. 341–354, set. 2016.

PICK, M. et al. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells in Serum-Free Medium Reveals Distinct Roles for Bone Morphogenetic Protein 4, Vascular Endothelial Growth Factor, Stem Cell Factor, and Fibroblast Growth Factor 2 in Hematopoiesis. **STEM CELLS**, v. 25, n. 9, p. 2206–2214, set. 2007.

PLATT, O. S. et al. Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. **The New England Journal of Medicine**, v. 330, n. 23, p. 1639–44, 9 jun. 1994.

REIS, L. C. J. et al. Induced Pluripotent Stem Cell for the Study and Treatment of Sickle Cell Anemia. **Stem Cells International**, v. 2017, p. 1–30, 2017.

ROSSANT, J.; TAM, P. P. L. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. **Development**, v. 136, n. 5, p. 701–713, 1 mar. 2009.

SABIN, F. R. Preliminary Note on the Differentiation of Angioblasts and the Method by Which They Produce Blood-Vessels, Blood-Plasma and Red Blood-Cells As Seen in the Living Chick. **Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research**, v. 11, n. 1, p. 5–7, fev. 2002.

SEBASTIANO, V. et al. In Situ Genetic Correction of the Sickle Cell Anemia Mutation in Human Induced Pluripotent Stem Cells Using Engineered Zinc Finger Nucleases. **STEM CELLS**, v. 29, n. 11, p. 1717–1726, nov. 2011.

SLUKVIN, I. I. Hematopoietic specification from human pluripotent stem cells: current advances and challenges toward de novo generation of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 122, n. 25, p. 4035–46, 12 dez. 2013.

STAERK, J. et al. Reprogramming of Human Peripheral Blood Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. **Cell Stem Cell**, v. 7, n. 1, p. 20–24, jul. 2010.

STEINBERG, M. H. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. **The Scientific World JOURNAL**, v. 8, p. 1295–1324, 25 dez. 2008.

STURGEON, C. M. et al. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, v. 32, n. 6, p. 554–561, 18 jun. 2014.

SUGIMURA, R. et al. Haematopoietic stem and progenitor cells from human pluripotent stem cells. **Nature**, v. 545, n. 7655, p. 432–438, 17 maio 2017.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, ago. 2006.

TAVIAN, M. et al. Embryonic origin of human hematopoiesis. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 54, n. 6–7, p. 1061–1065, 2010.

TAVIAN, M.; PEAULT, B. Embryonic development of the human hematopoietic system. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 49, n. 2–3, p. 243–250, 2005.

VO, L. T.; DALEY, G. Q. De novo generation of HSCs from somatic and pluripotent stem cell sources. **Blood**, v. 125, n. 17, p. 2641–2648, 23 abr. 2015.

VODYANIK, M. A.; THOMSON, J. A.; SLUKVIN, I. I. Leukosialin (CD43) defines hematopoietic progenitors in human embryonic stem cell differentiation cultures. **Blood**, v. 108, n. 6, p. 2095–105, 15 set. 2006.

WANG, L. et al. Endothelial and Hematopoietic Cell Fate of Human Embryonic Stem Cells Originates from Primitive Endothelium with Hemangioblastic Properties. **Immunity**, v. 21, n. 1, p. 31–41, jul. 2004.

WANG, Y. et al. Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions. **Stem Cell Research**, v. 11, n. 3, p. 1103–1116, nov. 2013.

WOGNUM, A. W.; SZILVASSY, S. J. **Hematopoietic Stem and Progenitor Cells** StemCell Technologies, , 2015.

XIE, Y. et al. Cooperative Effect of Erythropoietin and TGF- β Inhibition on Erythroid Development in Human Pluripotent Stem Cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 12, p. 2735–2743, dez. 2015.

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, 24 dez. 2009.

YE, Z. et al. Differential Sensitivity to JAK Inhibitory Drugs by Isogenic Human Erythroblasts and Hematopoietic Progenitors Generated from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. **STEM CELLS**, v. 32, n. 1, p. 269–278, jan. 2014.

ZEUNER, A. et al. Concise Review: Stem Cell-Derived Erythrocytes as Upcoming Players in Blood Transfusion. **STEM CELLS**, v. 30, n. 8, p. 1587–1596, ago. 2012.

ZHANG, P. et al. Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. **Blood**, v. 111, n. 4, p. 1933–1941, 15 fev. 2008.

ZHANG, Y. et al. Hematopoietic Hierarchy – An Updated Roadmap. **Trends in Cell Biology**, jun. 2018.

ZOELLNER, H. et al. Serum albumin is a specific inhibitor of apoptosis in human endothelial cells. **Journal of Cell Science**, v. 109, p. 2571–80, out. 1996.

ZOU, J. et al. Site-specific gene correction of a point mutation in human iPS cells derived from an adult patient with sickle cell disease. **Blood**, v. 118, n. 17, p. 4599–4608, 27 out. 2011.

Apêndices

APÊNDICE

Apêndice A – Caracterização imunofenotípica das linhagens celulares

Tabela 16 – Caracterização imunofenotípica da linhagem H1 em meio STEMdiff APEL 2

Dia de coleta	Marcação (%)		
	CD43	CD34	CD45
D0	1,54	0	0
D4	4,15	1,86	0
D8	0,71	3,13	0
D11	2,67	3,60	0
D14	9,48	2,43	5,78

Tabela 17 – Caracterização imunofenotípica da linhagem H1 em meio SFM

Dia de coleta	Marcação (%)		
	CD43	CD34	CD45
D0	1,54	0	0
D4	2,26	10,54	0
D8	2,41	4,94	0
D11	0	7,70	12,36
D14	4,37	1,24	0

Tabela 18 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PBscd01 em meio STEMdiff APEL 2

Dia de coleta	Marcação (%)		
	CD43	CD34	CD45
D0	2,72	2,28	0
D4	1,02	1,40	0
D8	2,28	9,58	0
D11	3,97	5,61	0
D14	2,34	0	1,91

Tabela 19 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PBscd01 em meio SFM

Dia de coleta	Marcação (%)		
	CD43	CD34	CD45
D0	1,33 ± 1,32	4,16 ± 1,77	0
D4	1,4	5,78 ± 5,71	1,22 ± 1,72
D6	–	3,53	0
D8	4,18 ± 1,25	22,77 ± 11,02	1,62 ± 2,47
D11	2,69 ± 1,52	15,38 ± 4,98	0
D14	3,76 ± 4,37	6,17 ± 4,29	0,34 ± 0,48
D15	2,92	3,14	0

Tabela 20 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PBscd08 em meio STEMdiff APEL 2

Dia de coleta	Marcação (%)		
	CD43	CD34	CD45
D0	0,95 ± 1,38	3,28 ± 0,46	–
D6	6,97	44,73	0,21
D8	5,21	38,65	–
D14	5,21	31,71	0

Tabela 21 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PBscd08 em meio SFM

Dia de coleta	Marcação (%)		
	CD43	CD34	CD45
D0	3,86 ± 5,09	2,19 ± 1,92	0,14 ± 0,24
D4	0	27,55 ± 18,65	1,34 ± 1,90
D8	36,62 ± 38,25	53,99 ± 24,49	20,44 ± 35,4
D11	65,62 ± 34,64	67,61 ± 26,43	36,31 ± 26,02
D14	46,68 ± 51,73	38,06 ± 45,11	34,19 ± 48,34
D15	65,03	44,22	59,64
D16	19,64	9,21	0

Tabela 22 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PB12 em meio STEMdiff APEL 2

Dia de coleta	Marcação (%)		
	CD43	CD34	CD45
D0	3,11 ± 4,40	1,20 ± 2,08	0,17 ± 0,29
D8	0,46	13,17	0
D11	0,17	14,13	0
D13	0,81	53,38	0
D15	31,05	2,23	0

Tabela 23 – Caracterização imunofenotípica da linhagem PB12 em meio SFM

Dia de coleta	Marcação (%)		
	CD43	CD34	CD45
D0	3,11 +- 4,40	1,20 +- 2,08	0,17 +- 0,29
D8	1,46	19,21	0
D11	1,18	23,97	0
D13	0	29,68	0
D15	2,5	2,55	0

Anexos

ANEXOS

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP do HC-FMRP-USP.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Obtenção de eritrócitos a partir de células-tronco de pluripotência induzida em cultivo feeder-free com meio xeno-free

Pesquisador: BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 61387516.9.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.887.343

Apresentação do Projeto:

Resumo:

A hematopoiese é o processo de formação dos componentes celulares do sangue a partir da diferenciação das células-tronco hematopoiéticas (HSC). As HSCs são encontradas na medula óssea humana adulta a uma proporção de 1 células em cada 106. A dificuldade na obtenção dessas células e na determinação de um protocolo para o seu cultivo ex vivo nos leva a buscar fontes alternativas para a produção de células maduras do sangue. As células-tronco de pluripotência induzida (iPS) são células com potencial para diferenciação em todos os tipos celulares do organismo adulto. Desta forma, a indução da diferenciação de células iPS em células hematopoiéticas é uma forma alternativa para a produção de eritrócitos in vitro. A produção dessas células vermelhas do sangue in vitro é necessária para o estudo de doenças, desenvolvimento de terapias e aplicações clínicas que envolvam esse tipo celular. No entanto, para que essas células tenham potencial para aplicações clínicas futuras é necessário que, entre outros requisitos, estas sejam cultivadas sem o uso de células alimentadoras e de moléculas de origem animal. O presente estudo propõe a produção de eritrócitos a partir de células-tronco de pluripotência induzidas em cultivo livre de células alimentadoras e em meio livre de moléculas de origem animal. A diferenciação

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP

Continuação do Parecer: 1.887.343

hematopoiética será induzida pelo método de formação de corpos embrioides por spin e, posteriormente, será realizada a indução da diferenciação eritroide. Ao longo da diferenciação das células iPS, o desenvolvimento hematopoiético e eritroide será monitorado através de análises de formação de colônia e por citometria de fluxo. Também serão realizadas análises para verificação da expressão de genes relacionados as hemoglobinas, através de RT-PCR em tempo real, e análises da composição de hemoglobinas nos eritrócitos produzidos, através da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência por troca catiônica (HPLC).

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é a obtenção de eritrócitos a partir de células-tronco de pluripotência induzida em cultivo livre de células alimentadoras (feeder-free) e em meio de cultivo livre de moléculas de origem animal (xeno-free).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

5. RISCOS E BENEFÍCIOS DA PESQUISA

Toda pesquisa envolve riscos, ainda que mínimos. Os riscos envolvidos nesta pesquisa estão relacionados à quebra de sigilo dos dados. Porém, os pesquisadores responsáveis se comprometem a tomar todas as providências cabíveis para que tal fato não ocorra. As linhagens celulares estão identificadas por meio das iniciais AF e números sequenciais, garantindo o sigilo dos dados. Os benefícios relacionados a esta pesquisa são de conhecimento científico quanto à geração de eritrócitos, o que poderia no futuro constituir fonte de eritrócitos para uso em humanos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia Proposta:

Para a geração de células eritroides em cultura serão utilizadas células-tronco de pluripotência induzida previamente geradas a partir da reprogramação, por vetores episomais, de células mononucleares de sangue periférico, fornecido pelo Hemocentro de Ribeirão Preto/SP (REIS, L.C.J., dados não publicados). O projeto de pesquisa em que foi realizada a geração dessas iPSC foi aprovado pelo CEP/FCFRP, número do parecer: 486.426. As células encontram-se congeladas e disponíveis para cultura. No presente projeto de pesquisa, as células-tronco de pluripotência induzida serão expandidas, adaptadas a passagem enzimática e, através do método de corpos embrioides, serão induzidas a diferenciação mesodérmica e hematopoiética. As células serão individualizadas e induzidas a se diferenciarem em eritrócitos. Células-tronco pluripotentes humanas, previamente obtidas através de reprogramação de células mononucleares do sangue

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

USP - FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP

Continuação do Parecer: 1.887.343

periférico por vetor

episomal sem integração, serão expandidas em placas cobertas com geltrex em meio de cultivo sem soro e xeno-free. A passagem das células deverá ser feita de forma enzimática; pelo menos 5 passagens devem ser realizadas para que as células possam se adaptar a condição enzimática e se dissociar facilmente (NG et al., 2008). Antes do início da diferenciação é necessário que as células sejam passadas 2 vezes, para garantir que as elas estejam se dividindo ativamente e para remover as células mortas. A formação dos corpos embrioides será realizada pelo método de spin, como descrito por Ng et al. (2008). Neste método, cerca de 3000 células são transferidas para cada poço de placas de 96 poços de baixa aderência, e são adicionados 100 l de meio de cultivo líquido. As placas são

centrifugadas por 3 minutos a 480xg, 4 C para que ocorra a agregação das células no fundo do poço. O meio de cultivo sem soro e xeno-free será

suplementado com as seguintes citocinas, conforme descrito por Ye et al. (2014): fator de célula-tronco (SCF; 50 ng/mL), proteína-4 morfogenética

óssea humana recombinante (BMP4; 10 ng/mL), fator de crescimento endotelial vascular humano recombinante (VEGF; 10 ng/mL), e fator de

crescimento de fibroblasto (bFGF; 10 ng/mL). Os corpos embrioides serão cultivados por cerca de 14 dias, a 37 C em atmosfera umidificada, 5%

CO₂.

Após 14 dias de cultivo dos EBs, as células serão dissociadas e, através do método de separação de células ativadas por fluorescência (FACS), a

população de células CD34+ CD45+ será enriquecida para que se inicie a diferenciação eritroide. As células CD34+ CD45+ serão transferidas para

placas e cultivadas em meio sem soro e xeno-free, ao qual serão adicionadas as seguintes citocinas: SCF (50 ng/ml), interleucina 3 (IL-3; 10 ng/mL)

e eritropoietina (EPO; 3 U/mL). As culturas serão mantidas a 37 C em 5% CO₂ por cerca de 7 a 10 dias.

Eritroblastos serão contados, no dia 10 da diferenciação eritroide. Serão cultivadas, em meio para maturação terminal, 1x10⁶ células por ml, a 37 C

em 5% CO₂. O meio para maturação terminal compreende: meio de cultura sem soro IMDM (Isocove's Modified Dulbecco's Medium), suplementado

com 3 U/ml Epo, 500 lg/ml holo-transferrina humana, 4 U/ ml heparina, 10 lg/ml insulina e 10% de plasma de sangue periférico humano normal. Meio

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.887.343

será adicionado a cada 2-3 dias, e as células serão mantidas em cultura por até o dia 10 para então serem analisadas (HUANG et al., 2015).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram corrigidos conforme parecer consubstanciado.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o Projeto de pesquisa Versão II, modificada em 5/12/2016, assim como o a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_794417.pdf	10/12/2016 18:14:02		Aceito
Outros	RESPOSTASAOPARECERCONSUBSTANCIADODOCEP.docx	10/12/2016 18:11:55	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito
Outros	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEPEP_486426.pdf	10/12/2016 18:11:11	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CartaparaCEPFMRP.docx	10/12/2016 18:09:55	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMestradoCEPversaoII.docx	10/12/2016 18:09:13	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito
Outros	CartaApresentacao.pdf	26/10/2016 13:11:46	BARBARA CRISTINA MARTINS	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

Continuação do Parecer: 1.887.343

Outros	CartaApresentacao.pdf	26/10/2016 13:11:46	FERNANDES PAES	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	solicitacaodispensatcle.docx	26/10/2016 13:09:35	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	26/10/2016 13:09:02	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoMestradoCEP.pdf	18/10/2016 20:17:21	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	18/10/2016 20:16:52	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	18/10/2016 20:16:42	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito
Outros	AprovacaoOrcamento.jpg	18/10/2016 20:16:23	BARBARA CRISTINA MARTINS FERNANDES PAES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 04 de Janeiro de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br