UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ALEXANDER RODRIGO FERREIRA

**O *switching* de globinas na
diferenciação hematopoética *in vitro***

Ribeirão Preto

2019

ALEXANDER RODRIGO FERREIRA

**O *switching* de globinas na
diferenciação hematopoética *in vitro***

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

Orientador: Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto
2019

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

Ferreira, Alexander Rodrigo

O *switching* de globinas na diferenciação hematopoética *in vitro*.
Ribeirão Preto, 2019.

102 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.

Orientador: Covas, Dimas Tadeu

1. Globina. 2. *Switching*. 3. Hematopoese. 4. iPSC. 5. Proteômica
dirigida

Nome: FERREIRA, Alexander Rodrigo

Título: O *switching* de globinas na diferenciação hematopoética *in vitro*

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: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Membro do programa Instituição: FMRP – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Membro da USP Instituição: – USP

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Membro externo à USP Instituição:

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Aos
pacientes com hemoglobinopatias e suas famílias
dedico

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Solange e José Francisco, meus irmãos Adriano, André e Adrielly e meus antepassados. Por me darem a vida e estarem sempre ao meu lado, me incentivando diariamente a ser uma melhor versão de mim mesmo e a atingir cada um dos meus objetivos.

À Natalia pela amizade e companheirismo e por estar presente em todos os momentos, sejam eles de vitórias ou de superação.

Ao Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas e à Profa. Dra. Simone Kashima pela oportunidade, orientação e confiança no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Vitor Marcel Faça e ao Guilherme Lanfredi pela ajuda na padronização dos experimentos de espectrometria de massas.

Aos amigos e colegas dos laboratórios do Hemocentro de Ribeirão Preto pela convivência e ajuda na realização deste trabalho. Em especial ao Jonathan Milhomens e aos membros da “diretoria” pela ajuda, carinho e motivação.

Ao laboratório de citometria de fluxo, em especial à Patrícia Bonini e Camila Menezes pela ajuda e dedicação na execução de experimentos de citometria de fluxo, e à Carmen Simão por estar sempre disposta ajudar.

Ao Prof. Dr. Wassim El Nemer e à Dra. Sara El Hoss pelos ensinamentos sobre a eritropoese.

À Barbara Paes pela valiosa ajuda nos experimentos com iPSC.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo desenvolvimento científico e acadêmico ao longo do curso de pós-graduação.

À secretaria do programa ajuda com os assuntos burocráticos da USP.

À FAPESP (2017/08057-2; 2013/08135-2; 2016/03809-3), CAPES (1669446) e CNPq (380061/2019-8; 465539/2014-9) pelo auxílio financeiro e incentivo à pesquisa.

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

E a todos os funcionários do hemocentro, equipe médica, administrativa e às pessoas que contribuíram de maneira direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Muitos de nossos sonhos a princípio parecem impossíveis,
então parecem improváveis e, então, quando invocamos
nossa força de vontade, logo se tornam inevitáveis.

Christopher Reeve (1996)

RESUMO

FERREIRA, Alexander Rodrigo. **O *switching* de globinas na diferenciação hematopoética *in vitro***. 2019. 102f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Muitos modelos buscam reproduzir *in vitro* a eritropoese normal e ineficiente. Um dos maiores desafios está no desenvolvimento de células eritroides semelhantes às do indivíduo adulto e com funcionalidade preservada. A eficácia dessa diferenciação pode ser acompanhada com a avaliação das mudanças morfológicas, imunofenotípicas e da expressão gênica e de proteínas. As hemoglobinas são tetrâmetros de cadeias de globinas diretamente relacionadas à atividade funcional da célula eritroide madura, sendo importantes biomarcadores da diferenciação eritroide terminal. Ao longo do desenvolvimento humano, diferentes globinas são expressas com diferentes afinidades ao oxigênio. Inicialmente, há predomínio da expressão de globinas embrionárias, que são substituídas pelas fetais e posteriormente pelas adultas. Esse processo é denominado *switching* de globinas e sua regulação ainda não é totalmente compreendida. O presente estudo propôs a geração e caracterização da diferenciação de progenitores hematopoético/eritroides *in vitro* a partir de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC), da linhagem K562 e de progenitores CD34⁺ e a avaliação de seu *switching* de globinas. Esse processo foi monitorado por análises morfológicas, imunofenotípica e de expressão gênica. A diferenciação das iPSC foi realizada com protocolo de formação de corpos embrioides e resultou em diminuição da frequência de marcadores de pluripotência e aumento de CD34⁺, CD36⁺, CD71⁺ e CD235a⁺ e expressão gênica de globinas, no entanto não foram capazes de formar colônias em ensaio de metilcelulose. Na diferenciação da linhagem K562 verificou-se o aumento da porcentagem de células Band 3 positivas e o aumento da expressão gênica da globina epsilon. A diferenciação dos progenitores CD34⁺ mostrou-se eficiente na geração de células eritroides terminalmente diferenciadas, mimetizando os estágios da eritropoese. Houve aumento da frequência de CD36⁺, CD235a⁺ e Band 3⁺. Houve mudança na expressão gênica de globinas e de reguladores do *switching*, sendo um importante modelo para o estudo dessa regulação. Além disso, foi desenvolvido um método de proteômica dirigida para o monitoramento do perfil de expressão de globinas que pode ser utilizado em protocolos de diferenciação eritroide *in vitro*.

Palavras-chave: Globina, *switching*, hematopoeese, iPSC, proteômica dirigida.

ABSTRACT

FERREIRA, Alexander Rodrigo. **The globin *switching* of the *in vitro* hematopoietic differentiation**. 2019. 102f. Dissertação (Mestrado em Oncologia Clínica, Células-Tronco e Terapia Celular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

There are several models seeking to reproduce normal and inefficient erythropoiesis *in vitro*. One of the biggest challenges lies in the development of adult-like erythroid cells with functional activity. The effectiveness of this differentiation can be monitored by the evaluation of morphological, immunophenotypic and gene and protein expression changes. Hemoglobins are globin chain tetramers directly related to the functional activity of the mature erythroid cell, functioning as important biomarkers of terminal erythroid differentiation. Throughout human development, different globins are expressed with distinct oxygen affinities. Initially, there is an expression predominance of embryonic globins, which are replaced by fetal and later by adults. This process is called globin *switching* and its regulation is not fully understood. The present study proposed to generate and characterize the *in vitro* hematopoietic / erythroid progenitors' differentiation from induced pluripotency stem cells (iPSC), K562 lineage and CD34⁺ progenitors and evaluate their globin *switching*. This process was monitored by morphological, immunophenotypic and gene expression analyzes. The differentiation of iPSC was performed using the embryoid body formation protocol and resulted in decreased expression of pluripotency markers and increase of CD34⁺, CD36⁺, CD71⁺, and CD235a⁺ and globins gene expression, however they were not able to form colonies in the methylcellulose assay. There was an increase in the of Band 3 positive cells frequency and an increment in epsilon globin gene expression during the K562 strain differentiation. The differentiation of CD34⁺ progenitors was efficient in generating terminally differentiated erythroid cells, mimicking the erythropoiesis stages. An increased CD36⁺, CD235a⁺, and Band 3⁺ expression was observed. There was an important change in the globins gene expression and on the *switching* regulators, being an important model for the study of this regulation process. In addition, a targeted proteomics method was developed for monitoring the globins expression profile that can be applied in *in vitro* erythroid differentiation protocols.

Keywords: Globin, switching, hematopoiesis, iPSC, targeted proteomics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Expressão gênica de globinas humanas durante o desenvolvimento.....	22
Figura 2: Fatores envolvidos no <i>switching</i> de globinas.....	29
Figura 3: Fluxograma com os passos e análises realizados neste projeto	36
Figura 4: Diferenciação hematopoética de células-tronco pluripotentes.	40
Figura 5: Diferenciação eritroide a partir de células CD34 ⁺	41
Figura 6: Estratégia de <i>gating</i> da citometria de fluxo	44
Figura 7: Morfologia de células-tronco pluripotentes.....	53
Figura 8: Morfologia de iPSC no dia zero de formação de corpos embrioides.....	54
Figura 9: Morfologia de corpos embrioides	55
Figura 10: Caracterização imunofenotípica da diferenciação hematopoética de iPSC (Fase 1).....	57
Figura 11: Caracterização imunofenotípica da diferenciação hematopoética de iPSC (Fase 2).....	58
Figura 12: Avaliação de potencial clonogênico por ensaio de metilcelulose	59
Figura 13: Expressão gênica de globinas na diferenciação hematopoética <i>in vitro</i> a partir de iPSC	60
Figura 14: Morfologia celular na segunda fase de diferenciação <i>in vitro</i> de progenitores eritroides.....	62
Figura 15: Morfologia celular durante a diferenciação eritroide <i>in vitro</i>	64
Figura 16: Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritroide a partir de progenitores CD34 ⁺	65
Figura 17: Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritroide a partir de progenitores CD34 ⁺	67
Figura 18: Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritroide <i>in vitro</i>	68
Figura 19: Comparação das eficiências de sondas de hidrólise	69
Figura 20: Rede de interação entre globinas e genes reguladores	70
Figura 21: Expressão genica de globinas.....	70
Figura 22: Reguladores do <i>switching</i> de globinas	72
Figura 23: <i>Heatmap</i> da expressão gênica de globinas e genes regulatórios	73
Figura 24: Análise de proteômica dirigida em amostras clínicas.....	76

Figura 25: Expressão gênica de globinas humanas em células K562 e de cordão umbilical.....	77
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos genes analisados por RT-PCR em tempo real	46
Tabela 2: Caracterização imunofenotípica da diferenciação hematopoética de iPSC (Fase 1).....	55
Tabela 3: Caracterização imunofenotípica da diferenciação hematopoética de iPSC (Fase 2).....	58
Tabela 4: Caracterização imunofenotípica ao final da Fase 2 da fase diferenciação hematopoética de iPSC.	59
Tabela 5: Descrição das proteínas analisadas.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGM	Aorta-gônada-mesonefros
APC	do inglês, <i>allophycocyanin</i>
ATAC-seq	do inglês, <i>assay for transposase-accessible chromatin using sequencing</i>
BEL-A	do inglês <i>Bristol Erythroid Line Adult</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>
CHD	do inglês, <i>chromodomain-helicase-DNA-binding protein</i>
Cq	Ciclo de quantificação
CRISPR	do inglês, <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Crs	Cromossomo
CTE	Células-tronco embrionárias
CTH	Células-tronco hematopoéticas
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimetilsufóxido
DNMT	do inglês, <i>DNA methyltransferase</i>
DNMT	do inglês, <i>DNA methyltransferases</i>
DTT	Ditiotreitol
EB	Corpos embrioides
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
EHMT	do inglês, <i>euchromatin histone methyltransferase</i>
EPO	Eritropoietina
FGF2	Fator de crescimento de fibroblasto 2
FITC	do inglês, <i>fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	do inglês, <i>forward scatter channel</i>
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocíticas
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina adulta
HbC	Hemoglobina C
HbS	Hemoglobina S falciforme
HbSC	Hemoglobina S e C
HbSS	Hemoglobina S em homozigose
HDAC	do inglês, <i>histone deacetylases</i>
HLA	do inglês, <i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
IAA	Iodoacetamida
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IMDM	<i>Iscoe's Modified Dulbecco's Medium</i>
INSERM	do francês, <i>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale</i>
INTS	do francês, <i>Institut National de la Transfusion Sanguine</i>

iPSC	Células-tronco de pluripotência induzida
KDM1A	do inglês, <i>Lysine Demethylase 1A</i>
LCR	do inglês, <i>Locus control region</i>
LMC	Leucemia mieloide crônica
LMPP	do inglês, <i>lymphoid-primed multipotent progenitor</i>
LRF	do inglês, <i>leukemia/lymphoma-related factor</i>
MACS	Seleção imunomagnética positiva
MBD	do inglês, <i>methyl-CpG-binding domain</i>
MEL	do inglês, <i>mouse erythroleukemia cells</i>
MGG	May-Grünwald-Giemsa
MRM	Monitoramento de reações múltiplas
NaB	Butirato de sódio
NuRD	do inglês, <i>Nucleosome Remodeling Deacetylase</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
PRMT	do inglês, <i>protein arginine methyltransferase</i>
PTM	Modificações pós traducionais
PVA	Polivinil álcool
PVDF	do inglês, <i>Polyvinylidene fluoride</i>
qPCR	do inglês, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
SCF	Fator de células-tronco
SDS	Sódio dodecil sulfato
SFM	Meio de diferenciação sem soro
SSC	do inglês, <i>side scatter channel</i>
TALEN	do inglês, <i>transcription activator-like effector nucleases</i>
TPO	Trombopoietina
URE	Unidades relativas de expressão
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

°C	graus Celsius
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
células/mL	células por mililitro
G	Gauge
mA	Miliampère
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
ng/mL	Nanograma por mililitro
RPM	Rotações por minuto
U/mL	Unidades por mililitro
x <i>g</i>	Força gravitacional
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
Δ e δ	Delta
ΔC _q	Variação de ciclo de quantificação
ε	Epsilon
ζ	Zeta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Hemoglobinas e hemoglobinopatias	19
1.1.1	O <i>switching</i> de globinas	21
1.1.2	Epidemiologia das hemoglobinopatias.....	22
1.1.3	Diagnóstico e tratamentos	22
1.2	Diferenciação hematopoética <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.....	25
1.3	Regulação do <i>switching</i> de globinas	26
1.4	Modelos para o estudo do <i>switching</i> de globinas	29
1.5	Justificativa do estudo	31
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo geral.....	34
2.2	Objetivos específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Delineamento experimental	36
3.2	Aspectos éticos.....	36
3.3	Diferenciação hematopoética <i>in vitro</i>	37
3.3.1	Células utilizadas na diferenciação <i>in vitro</i>	37
3.3.2	Teste de Mycoplasma spp	37
3.3.3	Diferenciação hematopoética <i>in vitro</i> de células-tronco de pluripotência induzida	38
3.3.3.1	Cultivo de células-tronco de pluripotência induzida	38
3.3.3.2	Adaptação ao repique enzimático com acutase.....	38
3.3.3.3	Formação de corpos embrioides e diferenciação mesodérmica.....	39
3.3.3.4	Maturação eritroide (Fase 2)	40
3.4	Diferenciação <i>in vitro</i> de progenitores eritroides e da linhagem K562	40

3.4.1	Caracterização morfológica	41
3.4.2	Avaliação do potencial clonogênico	42
3.4.3	Caracterização imunofenotípica da diferenciação <i>in vitro</i>	42
3.4.4	Análise da expressão gênica	44
3.5	Western blot	46
3.6	Padronização de análises de proteínas	48
3.6.1	Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de hemoglobinas.....	48
3.6.2	Proteômica dirigida	49
3.6.2.1	Desenvolvimento de método de monitoramento de múltiplas reações.....	49
3.6.2.2	Preparo de amostras e refino do método de MRM.....	49
3.7	Análises estatísticas	50
4	RESULTADOS.....	52
4.1	Diferenciação hematopoética de células-tronco de pluripotência induzida	52
4.1.1	Teste de Mycoplasma spp	52
4.1.2	Morfologia das células-tronco pluripotentes e isolamento enzimático.....	52
4.1.3	Morfologia e imunofenotipagem da diferenciação dos corpos embrioides..	53
4.1.4	Avaliação do potencial clonogênico e expressão gênica.....	59
4.2	Diferenciação in vitro de progenitores eritroides (CD34⁺) e da linhagem celular K562	61
4.2.1	Morfologia celular da diferenciação in vitro.....	62
4.2.2	Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritroide <i>in vitro</i>	64
4.3	Análise da expressão gênica	68
4.4	Padronização método de proteômica dirigida (MRM).....	73
5	DISCUSSÃO	80
5.1	Diferenciação hematopoética de células-tronco de pluripotência induzida	80

5.2	Diferenciação <i>in vitro</i> de progenitores eritroides (CD34 ⁺) e da linhagem celular K562	84
6	CONCLUSÕES.....	90
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
8	ANEXOS.....	101

Introdução

1 INTRODUÇÃO -

1.1 Hemoglobinas e hemoglobinopatias

As hemoglobinas são proteínas presentes nas hemácias e que são responsáveis pelo transporte de oxigênio (O_2) dos pulmões para os tecidos corpóreos e do dióxido de carbono para os pulmões. Essas moléculas localizam-se dentro das hemácias e são constituídas por quatro cadeias polipeptídicas globulares de globina, em geral, duas do tipo alfa (α -like) e duas do tipo beta (β -like). Esse tetrâmero ligado a um grupo heme, que contém um íon ferro metálico (Fe^{2+}), é responsável pelo transporte de O_2 (BEUTLER, 1997).

As cadeias de globina α -like podem ser alfa ou zeta e as β -like, beta, delta, épsilon, gama e são diferencialmente expressas durante o desenvolvimento humano e a mudança nesse perfil de expressão é denominada *switching*. Nas dez primeiras semanas do embrião humano há o predomínio da expressão das cadeias zeta (ζ) e épsilon (ϵ), e pequena produção de alfa (α), formando as hemoglobinas embrionárias Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$) e Portland ($\zeta_2\alpha_2$), moléculas com grande afinidade pelo oxigênio. A partir da décima semana de gestação, com o silenciamento dos genes épsilon e zeta, praticamente não há mais expressão dessas hemoglobinas, passando a produzir as cadeias alfa e gama em maior quantidade e alguma expressão de beta e delta. Há grande produção de hemoglobina fetal, também conhecida como HbF ($\alpha_2\gamma_2$) e início da produção de hemoglobina A₂ ou HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) e hemoglobina A ou HbA ($\alpha_2\beta_2$). Nesse momento, inicia-se a produção das hemoglobinas que estarão no indivíduo adulto. Após o nascimento há diminuição da expressão de HbF e aumento de Hb A que, hemoglobina que chega a mais de 95% no adulto (BEUTLER, 1997; SCHECHTER, 2008).

Mutações nos genes de alguma das globinas podem alterar as características morfológicas e funcionais das hemoglobinas, resultando em uma hemoglobinopatia. Essas desordens são monogênicas e hereditárias. No caso das talassemias, há diminuição da produção de globinas e, na doença falciforme, há expressão de hemoglobinas variantes. Ambos os quadros causam grande impacto na qualidade de vida dos pacientes (WILLIAMS; WEATHERALL, 2012).

No início do século XX, o médico americano James Herrick observou a presença de corpúsculos alongados e em forma de foice em pacientes com anemia severa (HERRICK, 1910), sendo por isso chamada anemia falciforme. Essa doença teve suas bases químicas e moleculares definidas mais de 4 décadas após os primeiros achados hematológico (INGRAM, 1956; PAULING; ITANO, 1949).

A hemoglobina S (HbS), é composta de duas cadeias alfa e duas beta mutadas (β^S) que é resultante da substituição de uma adenina por uma timina em um dos éxons do gene da cadeia da globina beta, o que leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da proteína (*c.20A>T, p.E6V*). A substituição de uma guanina por uma adenina nesse mesmo *códon* leva à globina C (β^C) (*c.19G>A, p. E6K*), e juntamente com cadeias alfa, a geração de hemoglobina C (HbC) (HAYNES et al., 2013).

As hemoglobinopatias podem estar presentes em homozigose, heterozigose ou heterozigose composta (ou homozigose. No primeiro caso, o indivíduo apresenta apenas um dos alelos mutados, podendo, por exemplo, ter um alelo normal e outro mutado. A classificação de traço falciforme (HbAS) é dada para pacientes que produzem tanto HbA, quanto HbS. No caso do traço C (HbAC), o indivíduo apresentará HbA e HbC. No caso de pacientes com hemoglobina SC (HbSC), eles expressam ambas as globinas mutadas. Quando em homozigose (HbSS, HbCC), os pacientes adultos apresentam apenas esse tipo de hemoglobina e não produzem HbA (HAYNES et al., 2013).

A redução dos níveis de cadeia alfa pode ser benéfica a pacientes com anemia falciforme. Estudos mostram que a herança associada de alfa talassemia está associada com um melhor prognóstico, com melhores índices hematológicos e menor número de internações (RUMANNEY et al., 2014).

Na doença falciforme, praticamente todos os órgãos são afetados e o paciente vive cronicamente com dor. Dentre as complicações crônicas estão a disfunção cognitiva, retinopatia, hipertensão pulmonar, cardiomegalia, úlceras cutâneas e crises vasclusivas de repetição. As complicações agudas podem variar desde acidentes vasculares cerebrais, passando por osteonecrose, síndrome torácica aguda, até problemas hepáticos, esplênicos e cardíacos (KATO et al., 2018).

1.1.1 O *switching* de globinas

Durante o desenvolvimento embrionário humano a hematopoese acontece em três ondas (BARMINKO; REINHOLT; BARON, 2016; COKIC et al., 2003). Na primeira, por volta da sexta semana de gestação, inicia-se com o aparecimento de progenitores da linhagem eritroide além da linhagem macrofágica e megacariocítica no saco vitelínico. Na segunda onda, ainda no saco vitelínico, ocorre transientemente o início da produção eritrocítica. Na terceira onda, há o início da produção das células-tronco hematopoéticas que vão para as principais artérias, para a placenta e para o embrião em desenvolvimento e em seguida para o fígado fetal e baço onde iniciam sua diferenciação os vários tipos celulares resultantes da hematopoese (COKIC et al., 2003). Ao final da gestação, a hematopoese passa a acontecer na medula óssea, que será o principal órgão hematopoético no adulto (CHANDRAKASAN; KAMAT, 2013; COKIC et al., 2003; KASSEBAUM et al., 2016; SCHECHTER, 2008).

Cada um dos sítios hematopoéticos apresenta um nicho diferente de proliferação para células-tronco-hematopoéticas, o que estimula a produção de hemoglobinas com diferentes afinidades ao oxigênio, conforme a necessidade, no decorrer do desenvolvimento embrionário.

Nas primeiras semanas de gestação, região I da **Figura 1**, há o predomínio da expressão de globinas embrionárias (épsilon e zeta), além da cadeia alfa e gama. Após a mudança do sítio hematopoético para o fígado fetal (região II), ocorre o término da expressão das globinas embrionárias e o aumento da das globinas alfa e gama, que darão origem à hemoglobina fetal e aumento da cadeia beta que, juntamente com a alfa, formam a hemoglobina A, a que predomina no adulto. A partir da trigésima semana (região III) com a mudança do sítio hematopoético para a medula óssea, há grande queda da globina gama e aumento da beta, além do início da produção da globina delta. A partir da décima quinta semana do nascimento (região IV), há expressão apenas de globinas alfa, beta e pequena quantidade de gama e delta, resultando em predomínio da presença de hemoglobina adulta e pouca produção da fetal e A₂ que é constituída por alfa e delta. Cada uma dessas permutações do perfil de expressão de globinas é conhecida como *switching*. Para a aplicabilidade clínica de células diferenciadas *in vitro*, de modo a reproduzir o padrão de expressão de globinas

observado *in vivo*, é necessário que exista uma maneira eficiente de quantificar as cadeias que serão produzidas durante a diferenciação.

Figura 1: Expressão gênica de globinas humanas durante o desenvolvimento

Adaptado de WOOD et al., 1976.

1.1.2 Epidemiologia das hemoglobinopatias

Dados epidemiológicos da organização mundial da saúde mostraram que pelo menos 5,2% da população mundial é portadora de um alelo para as principais hemoglobinas variantes e que há 1,1% de risco de terem filhos com alguma hemoglobinopatia e 2,7 a cada 1000 nascimento serão afetados (MODELL, 2008) e desses, quase metade possui anemia falciforme (VOS et al., 2015; WILLIAMS; WEATHERALL, 2012). Em algumas regiões do Brasil 3 a cada 1000 nativos possuem doença Falciforme e mais de 7% são heterozigotos (BRASIL, 2002). Mundialmente as hemoglobinopatias e anemias hemolíticas são responsáveis por 3,4% da mortalidade em crianças abaixo de cinco anos de idade e 6,4% na África (MODELL, 2008). O cenário do aumento do número de casos é alarmante e pode ultrapassar 400 mil novos casos em 2050 (PIEL et al., 2013).

1.1.3 Diagnóstico e tratamentos

A maior parte do diagnóstico para as hemoglobinopatias é realizada durante a triagem neonatal. Onde verifica-se a presença de hemoglobina anormal como a HbS, HbC, HbD, HbE ou HbJ e a análise da proporção entre os tipos de hemoglobinas (BRASIL, 2002).

No Brasil a triagem universal para Anemia Falciforme e outras hemoglobinopatias está prevista no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN),

criado pela portaria nº 822 de 06 de junho de 2001 (BRASIL, 2002), no entanto a cobertura efetiva desse programa é abaixo de 85% dos nativos (SILVA-PINTO et al., 2019).

Os métodos mais utilizados para esse propósito são a Eletroforese por Focalização Isoelétrica (FIE) e Cromatografia Líquida de Alta Resolução (HPLC) e ambos podem ser utilizados complementar ou isoladamente para a triagem inicial (BRASIL, 2002). Apesar disso, essas técnicas não conseguem identificar, a nível da expressão de proteínas, qual é a quantificação das cadeias de globinas em uma determinada amostra. Dentre as ferramentas utilizadas para detecção específica de proteínas estão: o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), *Western blot*, a Imunofenotipagem por citometria de fluxo e a espectrometria de massas (CHOU et al., 2015; HAYNES et al., 2013; OCHI et al., 2014; OLIVIER et al., 2016). Entretanto, apenas a última detecta a sequência da proteína *per si* sem a necessidade de anticorpos .

As principais alternativas terapêuticas existentes para o tratamento das hemoglobinopatias são as transfusões crônicas, o uso da hidroxiuréia e o transplante alogênico de células-tronco hematopoéticas, no entanto, apenas a última é curativa (ANGELUCCI et al., 2014; BHATIA; WALTERS, 2008).

As transfusões o fazem ao transferir hemácias de doadores para pacientes com hemoglobinopatias, o que aumenta a concentração de hemoglobina funcionais para esses pacientes, no entanto, além da disponibilidade de sangue compatível, a prática recorrente de transfusões sanguíneas pode levar ao aumento no risco de aloimunização dos pacientes por antígenos eritrocitários incompatíveis, além de causar o acúmulo de ferro nos sangue e danos ao fígado (BAIOCHI; NARDOZZA, 2009; VICHINSKY et al., 1990).

A hidroxiuréia começou a ser utilizada como quimioterápico no início da década de 1960 devido ao seu potencial antitumoral (SILVA-PINTO et al., 2019; THURMAN et al., 1963) e posteriormente foi observado o seu efeito na indução da produção da hemoglobina fetal e do aumento do conteúdo hídrico das hemácias (volume corpuscular médio). Além de diminuir o número de neutrófilos e a adesão de hemácias ao endotélio e interromper a polimerização de HbS, reduzindo a severidade e frequência de eventos vasclusivos, melhorando a qualidade de vida e aumentando a sobrevida dos pacientes (COKIC et al., 2003; PLATT et al., 1984, 1994; SEGAL et al.,

2008). No entanto, ainda não se sabe os mecanismos exatos de atuação dessa droga e nem outros efeitos secundários de seu uso prolongado. Sabe-se que esse medicamento possui ação pleiotrópica e na inibição da fase S do ciclo celular (PLATT et al., 1984)

Novas drogas vem sendo desenvolvidas visando a reativação da expressão de hemoglobina fetal como os inibidores para os genes *LRF/LRF/ZBTB7A* e *BCL11A*, alguns em testes clínicos fase 2 (MAKIS et al., 2016; ORKIN; BAUER, 2019). Além dessas abordagens farmacológicas, outras drogas vem sendo desenvolvidas como os inibidores de DNA metiltransferase (DNMT) e de histona desacetilases (HDAC), derivados talidomídicos e até mesmo a metformina (PAIKARI; SHEEHAN, 2018)

Outras terapias vêm sendo desenvolvidas visando a indução de HbF por fatores de transcrição artificiais, alteração da estrutura da cromatina ou mesmo por edição gênica com lentivírus, CRISPR (do inglês, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), TALEN (do inglês, *transcription activator-like effector nucleases*) ou *zinc finger*. (PAIKARI; SHEEHAN, 2018). Um dos maiores entraves para a terapia gênica é o elevado custo, o que faz com que elas dificilmente atinjam as áreas mais necessitadas e com maiores incidências dessas doenças (ORKIN; REILLY, 2016)

O transplante de células-tronco hematopoéticas é o único tratamento curativo disponível para pacientes com hemoglobinopatias como talassemia e anemia falciforme. A taxa de sobrevida pós-transplante em indivíduos abaixo de 16 anos foi de 95% e esse valor passou para 80% para pacientes com idades maiores que 16 anos (CAPPELLI et al., 2016). Um dos grandes entraves para a realização desse tratamento é a falta de leitos em hospitais, grande dificuldade de encontrar doador com antígeno leucocitário (HLA) compatível e o risco inerente de morbidade e mortalidade do procedimento (BOLAÑOS-MEADE; BRODSKY, 2014; HSIEH et al., 2014; WALTERS et al., 1996; ZAIDMAN et al., 2016).

Visando superar essa barreira, a terapia celular com o uso de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) que sejam HLA compatíveis com o paciente mostram-se como alternativas para reduzir a necessidade de imunossupressores durante o tratamento (KAMAO et al., 2014; TAYLOR et al., 2012; TURNER et al., 2013). Essas células podem ser propagadas irrestritamente e diferenciadas quanto necessário, ao contrário de progenitores CD34⁺ (HUANG et al., 2015). As células eritroides têm como

principal função o transporte de oxigênio, e, para isso, necessitam possuir globinas. Dessa maneira, é importante que os níveis de globinas sejam avaliados. Para que possa existir uma terapia com o uso de progenitores hematopoéticos diferenciados *ex vivo* é fundamental que os níveis de globinas produzidos *in vitro* possam ser dosados durante o processo de diferenciação hematopoética e comparados ao que acontece *in vivo*. Para a aplicação desse tipo de progenitores na clínica, é fundamental que a regulação do *switching* de globinas seja avaliada em modelo *in vitro* de diferenciação eritroide e que apresente resultados robustos e reprodutíveis.

1.2 Diferenciação hematopoética *in vivo* e *in vitro*

No decorrer da embriogênese, há a formação de células do endotélio hemogênico (EHs), população de células endoteliais presentes no endotélio vascular e que faz parte do nicho necessário para o desenvolvimento de células-tronco hematopoéticas (CTH) com capacidade de autorrenovação e diferenciação via transição endotélio-hematopoética (KISSA; HERBOMEL, 2010). Essa CTH é inicialmente originada no endotélio da aorta-gônada-mesonefros (AGM) e é responsável pela produção de todas as células hematopoéticas desse indivíduo durante sua vida (IVANOV et al., 2014; RAFIL et al., 2013). Essas células apresentam expressão de CD31 (PECAM-1), CD34 e KDR, conforme se diferenciam, passam a expressar c-kit, (CD117), CD41 e CD45 (ANTAS et al., 2013). No entanto, a geração de progenitores hematopoéticos multipotentes (PHM) da eritropoese definitiva não está completamente elucidada (BAI et al., 2016).

A eritropoese é um processo finamente regulado que ocorre na medula óssea do adulto. As CTH (Lin⁻, CD34⁺, CD38⁻ CD90⁺ e CD45⁻) gradualmente se diferenciam em progenitores cada vez mais comprometidos com uma determinada linhagem hematopoética. Quando essa célula passa a não expressar CD90, ela é considerada um PHM. Em seguida há a fase em que esses progenitores proliferam sob ação de diversos fatores de crescimento. Esses estágios intermediários são dificilmente definidos uma vez que a diferenciação de tais progenitores é contínua. No entanto, dois estágios dessa diferenciação são amplamente caracterizados na literatura, as BFU-Es (do inglês, “burst-forming units-erythroid”) são definidos como CD45⁺, CD235⁻, IL-3R⁻, CD34⁺, CD36⁻, CD71^{low} e as CFU-E (do inglês, “colony-forming units-erythroid”)

são caracterizadas pela expressão de CD45⁺, CD235⁻, IL-3R⁻, CD34⁻, CD36⁺, CD71^{high} (LI et al., 2014). O primeiro grupo é dependente de SCF, mas não de EPO para a sua proliferação. Já no segundo, a adição de EPO é essencial para a obtenção de progenitores eritroides tardios funcionais. Esses progenitores gerados passam pela diferenciação eritroide terminal, apresentando mudanças morfológicas que facilitam a sua distinção (GAUTIER et al., 2016).

Inicialmente são gerados eritroblastos, seguidos pelos proeritroblastos (ProE), esses se diferenciam em eritroblastos basofílicos (Baso1 e Baso2), eritroblastos policromáticos (Poli), ortocromáticos (Orto) e reticulócitos (Ret). Nesse processo há a gradual redução do tamanho celular, compactação do núcleo, diminuição da relação núcleo citoplasma e produção de grandes quantidades de hemoglobina (Hb). A partir da fase de ProE, as células aumentam gradualmente a expressão de CD235a e do receptor de transferrina (CD71). Nessa fase, praticamente não há expressão de CD233 (Band3), que aumenta conforme os eritroblastos atingem os estágios finais da diferenciação. Nesse mesmo período há a diminuição gradual de moléculas de adesão como a integrina alfa 4 (CD49d) e de CD36 (HU et al., 2013). Ao final da maturação, os eritroblastos policromáticos expõem seu núcleo os quais são degradados por macrófagos nesse microambiente (nicho) e os Rets gerados terminam a sua maturação na circulação sanguínea, diminuindo seu volume pela liberação de exossomos e vesículas (GAUTIER et al., 2016; MANKELOW et al., 2015).

Nas células-tronco de pluripotência induzida (iPSC), inicialmente há a expressão de marcadores de pluripotência como NANOG, SOX2 e OCT3/4. Conforme as células se diferenciam, elas deixam de expressar tais marcadores. Antes da diferenciação eritroides de tais células, elas precisam passar por uma diferenciação prévia para células mesodérmicas. Isso é atingido por meio da exposição de tais células à fatores de crescimento como a proteína óssea morfogenética-4 (BMP4), o fator de células-tronco (SCF), o fator de crescimento fibroblastóide (FGF2) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (BAI et al., 2016).

1.3 Regulação do *switching* de globinas

A expressão dos genes *β-like* é controlada por diversos fatores, incluindo proteínas *trans*-reguladoras que atuam sobre regiões *cis*-reguladoras do DNA (**Figura**

2). Estudos de GWAS (do inglês, *genome-wide association studies*) encontraram grande associação entre Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês, *single nucleotide polymorphisms*) dos genes *BCL11A* e *HBS1L-MYB* e a elevada expressão de HbF. Juntos, esses polimorfismos respondem por cerca de 50% dos fatores hereditários do aumento de HbF (VINJAMUR; BAUER; ORKIN, 2018). O *HBS1L-MYB* é considerado um regulador essencial para a hematopoese e eritropoese, uma vez que a sua deleção impossibilita a diferenciação eritroide terminal (VEGIOPOULOS, 2006).

O *ZBTB7A* é um fator de transcrição do tipo *zinc finger*, conhecido como LRF (do inglês, *leukemia/lymphoma-related factor*) ou Pokemon. Ele é amplamente expresso em células hematopoéticas e está envolvido com seu desenvolvimento. O LRF/*ZBTB7A* se liga diretamente e reduz a acessibilidade à cromatina da região gênica da globina gama e é um alvo de *GATA1* (MAEDA et al., 2009).

A expressão de globinas em células eritroides chega a até 98% de todos os RNA mensageiros (mRNA) transcritos nessas células (BASTOS; VOLLOCH; AVIV, 1977). Essa elevada produção é garantida pela presença de uma região cis-regulatória de elementos potencializadores eritroides localizada de 6 a 20kb a montante (*upstream*) do gene *HBE1*, essa região é conhecida como LCR (do inglês, *locus control region*). A região LCR interage fisicamente com cada um dos promotores das globinas β -like pela ação de fatores de transcrição e complexos proteicos ligados à tal região ou ao gene. Tanto o fator de transcrição *KLF1* quanto *GATA1* interagem fisicamente com o LCR quanto com o promotor de cada um dos genes. Os cofatores *LDB1* e *LMO2* auxiliam na formação do *loop* com LCR e promotor, juntamente com *GATA 1*, *TAL1* e *CTCF*. Esses fatores são importantes tanto para a formação do *loop* de *HBG1/2* quanto de *HBB*. (VINJAMUR; BAUER; ORKIN, 2018).

O fator de transcrição eritroide *KLF1* (do inglês, *Krüppel-like factor 1*) também mostrou variantes relacionadas à maior expressão de HbF. Além disso, é considerado um regulador mestre da expressão gênica eritroide, uma vez que além da expressão de fatores de transcrição, atua na regulação da biossíntese de heme e da produção de proteínas do citoesqueleto, da membrana e de antígenos eritrocitário. Atua também na regulação de *BCL11A* e *ZBTB7A*. (NORTON et al., 2017; PERKINS et al., 2016).

A regulação epigenética também tem um importante papel no silenciamento de *HBG1/2* durante o desenvolvimento por meio de modificações na cromatina. Essas modificações incluem metilação de DNA e modificações como acetilação e metilação dos resíduos da cauda das histonas que são inseridas por enzimas conhecidas como “*writers*”. Essas modificações são “lidas” por enzimas denominadas “*readers*” que participam no recrutamento de complexos proteicos que fazem modificações na cromatina. As enzimas que removem essas marcas são conhecidas como “*erasers*”.

Estudos observaram que, em células eritroides maduras, os promotores de *HBG1* e *HBG2* apresentaram alta taxa de metilação em suas ilhas CpG e inibição de metiltransferases de DNA, que também levava ao aumento de HbF. As metilações no *locus HBG1/2* são reconhecidas pela proteína MBD (do inglês, *methylation-binding domain*) que ajudam no recrutamento do complexo silenciador NuRD (do inglês, *Nucleosome Remodeling Deacetylase*). Esse complexo é composto várias proteínas, entre elas as proteínas remodeladoras de cromatina dependentes de ATP (CHD3/4) e as histonas deacetilases (HDAC1/2) (VINJAMUR; BAUER; ORKIN, 2018).

Tanto o BCL11A quanto o ZBTB7A interagem direta e independentemente com o complexo NuRD (MASUDA et al., 2016). O BCL11A também interage com histona demetilases (KDM1A), que quando reprimidas, também levam à indução de HbF. As metiltransferases de histonas (EHMT1/2) e a proteína arginina metiltransferase (PRMT5) juntamente com a DNMT3A, participam no silenciamento de *HBG1/2* (XU et al., 2013).

Os fatores do desenvolvimento, também conhecidos como fatores heterocrônicos, participam da transição entre o período fetal e o adulto e podem interagir com os genes das globinas. Entre os fatores ligantes de RNA que tem importante função no período fetal estão o *LIN28* e o IGF2BP e para a na fase adulta, os microRNAs da família do *let-7*. Tanto a inibição de *let-7* quanto o aumento de seus alvos HMGA2, IGF2BP1/3 ou de *LIN28* estão associados ao aumento da expressão de HbF. Esses fatores do período fetal mostraram também inibir BCL11A (FERREIRA et al., 2018; VINJAMUR; BAUER; ORKIN, 2018)

Figura 2: Fatores envolvidos no *switching* de globinas

Os principais fatores da regulação do *switching* de *HBG1/2* estão descritos. Esse silenciamento é atingido pela combinação de múltiplos fatores. *BCL11A* e *ZBTB7A* são essenciais para tal silenciamento. Ambos atuam independentemente interagindo com o complexo NuRD. Além disso, *writers* e *erasers* de cromatina como EHMT, DNMT e KDM1A participam nesse processo. Fatores determinantes de linhagem como o KLF1 e HBS1L-MYB atuam indiretamente regulando a expressão ou repressão de genes como o BCL11A. Fatores do desenvolvimento como o *let-7*, *LIN28a/b* e *IGF2BP* auxiliam na promoção da transição do estágio fetal para o adulto. (Figura adaptada a partir de VINJAMUR; BAUER; ORKIN, 2018).

1.4 Modelos para o estudo do *switching* de globinas

Diversos foram os modelos que procuraram explicar os mecanismos moleculares da regulação de globinas. Desde células immortalizadas até modelos animais, no entanto, grande parte do entendimento desse processo veio dos estudos de associação genômica de larga escala realizados por pesquisadores americanos. Esse grupo associou polimorfismos no gene *BCL11A* à elevados níveis de expressão de hemoglobina fetal (BAUER et al., 2013).

Vários foram os estudos que utilizaram linhagens leucêmicas de camundongo, como a células MEL, sigla do inglês para *mouse erythroleukemia*, ou humanas como a K562, imortalizada a partir de células de paciente com leucemia mieloide crônica (LMC) (ANTONIOU, 1991; RUTHERFORD et al., 1981). Um dos maiores problemas do uso de tais células está no fato de elas serem imortalizadas, não possuírem o cariótipo normal e expressem principalmente globinas embrionárias e fetais e poucas globinas adultas e não sofrerem diferenciação eritroide normal (VINJAMUR; BAUER; ORKIN, 2018).

A linhagem HUDEP-2 teve grande impacto nos estudos de eritropoese *in vitro* pelo estudo do silenciamento e indução de *HBG1/2*. Essa linhagem foi imortalizada a partir de células progenitoras CD34⁺ de sangue de cordão umbilical e, apesar de serem imortalizadas, são capazes de passar pela diferenciação eritroide terminal (CANVER et al., 2015; KATSANTONI, 2019; KURITA et al., 2013; MASUDA et al., 2016)

Em 2017, o grupo inglês gerou a primeira linhagem eritroide adulta, a BEL-A (do inglês *Bristol Erythroid Line Adult*), a primeira linhagem a reproduzir todos os estágios da eritropoese terminal *in vitro*, incluindo os processos de enucleação, geração de reticulócitos funcionais e com mesma taxa de sobrevivência do que hemácias de doadores. (TRAKARNSANGA et al., 2017). Apesar disso, essas células ainda não são amplamente utilizadas.

Atualmente o “padrão ouro” para os estudos *in vitro* de diferenciação eritroide de expressão gênica de globinas e genes reguladores de seu *switching* é a diferenciação *in vitro* de células CD34⁺ primárias isoladas a partir de diversas fontes. Entre elas o sangue periférico, células retidas no sistema de leucorredução durante a doação de plaquetas, obtidas após a mobilização com drogas como G-CSF, isoladas do sangue de cordão umbilical ou mesmo da medula óssea (GIARRATANA et al., 2011; MIGLIACCIO et al., 2002).

Uma das principais vantagens do uso de tais células é o fato de elas possuírem cariótipo normal e serem capazes de se diferenciarem terminalmente *in vitro*. Quando cultivadas, essas células apresentam um maior nível basal de expressão de hemoglobina fetal e há variabilidade entre os níveis de expressão de doador para doador. Sua capacidade de proliferação é limitada, precisando ser isolada e cultivada a fresco, além de não serem facilmente criopreservadas, o que faz com que haja a

necessidade de um maior número amostral de doadores (VINJAMUR; BAUER; ORKIN, 2018).

Uma alternativa ao uso de tais células é o uso de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC), uma vez que podem ser propagadas irrestritamente e diferenciadas *in vitro*. Apesar disso, essas células são dificilmente diferenciadas e há o predomínio da expressão de globinas embrionárias e fetais (CATELLI, 2017; CUNHA et al., 2017; PAES, 2019; TRAKARNSANGA et al., 2017).

1.5 Justificativa do estudo

O uso de células-tronco pluripotentes como modelo de estudo para mimetizar a ontologia do desenvolvimento biológico normal e patológico é uma realidade em muitas áreas do conhecimento, incluindo a hematologia. Apesar disso, continua a busca por modelos *in vitro* que sejam mais representativos do que acontece em humanos.

A hematopoese foi um dos temas que recebeu grandes contribuições desse modelo de estudo para o entendimento do processo de gênese das células hematopoéticas terminalmente diferenciadas. Muitos são os modelos que buscam reproduzir *in vitro* esse processo biológico e alguns apresentam relativo sucesso. No entanto, os mecanismos moleculares da hematopoese e eritropoese ainda não estão completamente estabelecidos. Um dos maiores desafios está no desenvolvimento de células da linhagem eritroide semelhantes às do indivíduo adulto e com funcionalidade preservada. Uma maneira de acompanhar a eficácia desse processo é acompanhar a expressão de genes e proteínas considerados marcadores do estágio da diferenciação eritroide. As hemoglobinas são diretamente relacionadas à atividade funcional da célula eritroide madura, o transporte de oxigênio, sendo importantes biomarcadores da diferenciação eritroide terminal e seus estágios.

Neste estudo, em parceria com o pesquisador Dr. Vitor Marcel Faça, propusemos utilizar a abordagem de proteômica dirigida para a criação de um método semiquantitativo de espectrometria de massas para o monitoramento do perfil expressão das globinas alfa, beta, delta, épsilon, gama e zeta por monitoramento de reações múltiplas, no decorrer da diferenciação hematopoética *in vitro* a partir de células-tronco pluripotentes e progenitores CD34⁺. Essa abordagem utiliza peptídeos

únicos no proteoma humano e permitirá comparar a diferenciação *in vitro* ao seu estágio do desenvolvimento humano *in vivo* (**Figura 1**), além de ser uma abordagem para analisar a reprodutibilidade de experimentos de diferenciação hematopoética e eritroide *ex vivo*.

Esse estudo criou uma ferramenta para monitorar a diferenciação hematopoética *in vitro*, podendo ser utilizada para a criação de protocolos de diferenciação mais eficientes, robustos e reprodutíveis. Outra aplicação dessa ferramenta é para uso em testes diagnósticos de hemoglobinas variantes em pacientes com hemoglobinopatias, complementando as abordagens utilizadas em adultos e no teste do pezinho durante a triagem neonatal.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de globinas durante a diferenciação hematopoética *in vitro*.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar o protocolo de diferenciação hematopoética *in vitro* de células pluripotentes e progenitores eritroides;
- Comparar diversos modelos para o estudo do *switching* de globinas;
- Realizar a caracterização morfológica e imunofenotípica das células no decorrer da diferenciação *in vitro*;
- Avaliar a expressão de genes de pluripotência, da diferenciação hematopoética/eritroide e do *switching* de hemoglobinas durante o processo de diferenciação *in vitro*;
- Desenvolver e validar um método de identificação de globinas por espectrometria de massas.

Material e métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Delineamento experimental

Figura 3: Fluxograma com os passos e análises realizados neste projeto

3.2 Aspectos éticos

O uso das amostras biológicas presentes neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital as Clínicas de Ribeirão Preto, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP HCRP: 11395/2018) (**ANEXO A** – Parecer consubstanciado do CEP do HC-FMRP-USP). Todos os indivíduos foram devidamente informados sobre a pesquisa e quanto aos procedimentos de coleta e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

3.3 Diferenciação hematopoética *in vitro*

3.3.1 Células utilizadas na diferenciação *in vitro*

As duas linhagens de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) utilizadas neste trabalho foram geradas no Hemocentro de Ribeirão Preto e previamente caracterizadas em relação às características imunofenotípicas, expressão gênica e presença de células derivadas dos três folhetos embrionários em ensaios de formação de corpos embrioides (EBs) *in vitro* ou de teratomas *in vivo*. As linhagens foram obtidas após a reprogramação de células mononucleares (PBMC) do sangue periférico utilizando vetores não integrativos (CHOU et al., 2011). A linhagem denominada PBscd08 (originalmente denominada PBscd08cl02^{HU}), foi reprogramada a partir de amostras de sangue de paciente com anemia falciforme em uso de hidroxiuréia (REIS, 2017) e cedida pela Profa. Dra. Elisa Maria de Sousa Russo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, parecer do comitê de ética: 1.887.343. A linhagem PB12 foi reprogramada a partir de PBMC de doador saudável com perfil antigênico eritrocitário raro: O (ABO); C⁰, E⁰, c⁺, e⁺, cw⁰ (Rh); K⁰, kpa⁰ (Kell); S⁰, s⁺ (MNS); Jka⁺, Jkb⁰ (Kidd); Fya⁰, Fyb⁰ (Duffy); Dia⁰ (Diego); Lea⁰, Leb⁰ (Lewis) (CATELLI, 2017) e cedida pela Profa. Dra. Simone Kashima Haddad, do laboratório de biologia molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto. Essas duas células foram utilizadas em outros trabalhos do nosso centro, com o objetivo de entender a diferenciação hematopoética (PAES, 2019). Além das células pluripotentes, também foram utilizadas a linhagem K562 (ATCC[®] CCL-243[™]), imortalizada a partir de células de paciente com leucemia mieloide crônica (LMC) e células primárias (CD34⁺) isoladas a partir de sistema de leucorredução descartados após o procedimento de doação de plaquetas em nosso centro ou isolados a partir do excedente da doação por aférese de progenitores hematopoéticos após mobilização com G-CSF.

3.3.2 Teste de *Mycoplasma spp*

Os sobrenadantes de cultura das linhagens foram avaliados quanto à presença de *Mycoplasma spp*. As amostras foram submetidas ao teste colorimétrico *MycoAlert[™] Mycoplasma Detection* (Lonza) que detecta a atividade de enzimas provenientes de *Mycoplasma*. Além disso, controles positivo e negativo foram

utilizados no ensaio, no qual a razão é $> 1,2$ para o controle positivo, e $< 1,0$, controle negativo.

3.3.3 Diferenciação hematopoética *in vitro* de células-tronco de pluripotência induzida

3.3.3.1 Cultivo de células-tronco de pluripotência induzida

As iPSCs utilizadas neste estudo foram congeladas em soro fetal bovino Hyclone (GE Healthcare Life Science) contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). Após o descongelamento, foram cultivadas sobre a matriz Geltrex (0,15 mg/mL) (ThermoFisher Technologies) em meio de cultura mTeSR 1 (StemCell Technologies) suplementado com butirato de sódio (NaB) (0,25 mM) (Sigma-Aldrich) e diariamente trocado. As colônias de células-tronco pluripotentes foram repicadas por mais de sete passagens com a adição ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) (0,5 mM) (ThermoFisher Technologies), sempre que necessário, em geral a cada 4 dias. As células foram mantidas em incubadora a 37°C, 5% CO₂ e 85% de umidade.

3.3.3.2 Adaptação ao repique enzimático com acutase

O repique das colônias com a enzima Stempro® accutase® (Thermofisher Technologies) foi realizado para facilitar a dissociação das células para contagem, análise imunofenotípica por citometria de fluxo e no início da diferenciação hematopoética. Para diminuir as taxas de apoptose, utilizou-se o Y-27632 dicloridrato (10 µM) (Tocris), inibidor de uma enzima Rho quinase (WATANABE et al., 2007). Após essa dissociação, as células foram cultivadas novamente em meio mTeSR 1 sobre matriz de Geltrex ou utilizadas para análises de citometria de fluxo ou expressão gênica.

Antes do início da diferenciação hematopoética, as células foram repicadas com acutase por mais de sete passagens. Esse processo faz com que as células com maior capacidade de individualização e reagregação sejam selecionadas, resultando na formação de corpos embrioides mais homogêneos.

3.3.3.3 Formação de corpos embrioides e diferenciação mesodérmica

No início da diferenciação, as células foram tratadas novamente com a enzima Stempro® accutase®. Após a contagem em câmara de Neubauer e corante azul de Trypan, foram plaqueadas de 2000 e 4000 células para cada um dos 60 poços centrais das placas de 96 poços de baixa aderência com fundo em U (Corning) em 50 µL de meio de diferenciação suplementado com as citocinas da fase 1 (**Figura 4**). Para evitar a evaporação exacerbada de meio, os demais poços foram preenchidos com tampão fosfato salino (PBS) 1x, contendo 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8 mM de Na₂HPO₄ e 2 mM de Kh₂PO₄, pH 7,4.

A primeira fase da diferenciação foi realizada utilizando apenas o meio de diferenciação comercial STEMdiff® APEL® 2 (StemCell Technologies) e na fase de maturação foi utilizado tanto sob esse meio quanto no meio de diferenciação sem soro (SFM), do inglês “*Serum Free Medium*” preparado *in house* contendo: 50% IMDM (Thermofisher Technologies), 50% Ham’s F12 (Thermofisher Technologies), 1% lipídios definidos (Thermofisher Technologies), 1% (v/v) insulina-transferrina-selênio-etanolamina (ITS-X) (Thermofisher Technologies), glutamax 2 mM (Thermofisher Technologies), 1-tioglicerol 450 µM (Sigma-Aldrich), ácido ascórbico 50 µg/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), βFGF (10 ng/mL) (R&D) e Y-27632 dicloridrato (10 µM) (Tocris). As placas foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos com intuito aumentar a agregação das células individualizadas. Essas células foram cultivadas nas condições anteriormente citadas.

Houve adição de meio suplementado com as citocinas: BMP4 (10 ng/mL), βFGF (10 ng/mL), VEGF (D2: 20 ng/mL; D5: 10 ng/mL) (PeproTech), SCF (100 ng/mL e 50 ng/mL) (PeproTech) nos dias 2 e 5, respectivamente, como representado na **Figura 4**.

Figura 4: Diferenciação hematopoética de células-tronco pluripotentes.

A figura evidencia as duas fases do protocolo de diferenciação hematopoética, na primeira há a indução da linhagem mesodérmica e na segunda, a maturação eritroide das células.

3.3.3.4 Maturação eritroide (Fase 2)

Ao final da primeira fase da diferenciação hematopoética, as células foram submetidas à maturação, que visa a produção de globinas. As células foram plaqueadas em placas tratadas com gelatina 0,1% (m/v) em água (Stemcell Technologies) em uma concentração de 10^5 células por mililitro.

Os meios utilizados anteriormente na diferenciação dos corpos embrioides foram agora suplementados com holotransferrina (500 μ g/mL) (Sigma-Aldrich), IL-3 (10 ng/mL), eritropoetina (EPO) (3 U/mL) e SCF (50 ng/mL) (PeproTech) e foi adicionado juntamente com as células à placas previamente tratadas com gelatina (Stemcell Technologies). Esse meio foi trocado a cada 2 ou 3 dias e as células foram mantidas até o dia 11 de diferenciação. Nos dias 2 e 4 da fase de maturação, as células presentes no sobrenadante foram coletadas e encaminhadas para a imunofenotipagem e expressão gênica. No dia 11 dessa fase, todas as células dos poços, após tratamento com acutase, foram coletadas para essas mesmas análises.

3.4 Diferenciação *in vitro* de progenitores eritroides e da linhagem K562

Após a assinatura do termo de consentimento, os doadores de plaquetas autorizaram o uso do sangue retido no sistema de leucorredução utilizado durante o procedimento de doação. As células mononucleares do sangue retido no sistema de leucorredução foram isoladas por gradiente de Ficoll-Paque™ (GE Healthcare). Em seguida, as células CD34⁺ foram isoladas por seleção imunomagnética positiva (MACS) (Miltenyi Biotec), expandidas e diferenciadas em cultivo em suspensão. A pureza do isolamento de células CD34⁺ foi avaliada por citometria de fluxo.

O protocolo para a diferenciação eritroide dessas células foi adaptado em duas fases (FREYSSINIER et al., 1999; GAUTIER et al., 2016; HU et al., 2013; OLIVIER et al., 2016). Na primeira fase, as células CD34⁺ foram cultivadas por 7 dias em meio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (ThermoFisher Scientific) suplementado com 15% (v/v) de substituto do soro BIT9500 (Stem Cell Technologies), 100 U/mL de penicilina e estreptomicina (ThermoFisher Scientific), 0,25 µg/mL de anfotericina B (ThermoFisher Scientific), 2mM GlutaMax (ThermoFisher Scientific), 100 ng/mL SCF, 100 ng/mL interleucina 6 (IL-6) e 10 ng/mL interleucina 3 (IL-3) (Milenyi Biotec) mantendo-se uma concentração celular de 5×10^5 células/mL. Na segunda fase, as células foram cultivadas por períodos de até 20 dias no meio anteriormente descrito com a substituição do IL-6 por 2 U/mL de eritropoetina (EPO) (Peprotech) sendo as células mantidas a 1×10^6 células/mL. O cultivo foi realizado durante toda a diferenciação a 37°C, 5% CO₂ e 85% de umidade. A representação esquemática desse protocolo de diferenciação está representada na **Figura 5**. A linhagem K562 foi submetida ao mesmo protocolo, visando a obtenção de maiores concentrações de globinas embrionárias (UCHIDA et al., 2018)

Figura 5: Diferenciação eritroide a partir de células CD34⁺.

Fase 1			Fase 2		
D0	D7	D4	D8	D12	
IMDM, 15% (v/v) BIT9500, 100 U/mL penicilina-estreptomicina, 2 mM GlutaMax					
SCF (100 ng/mL), IL-3 (10 ng/mL) e IL-6 (100 ng/mL)			EPO (3 U/mL), SCF (100 ng/mL), IL-3 (10 ng/mL)		

Fases do protocolo de diferenciação eritroide. Na primeira há a indução da proliferação dos progenitores eritroides (CD36⁺) e na segunda a diferenciação terminal das células com aumento da expressão de marcadores eritroides e expressão de globinas (GAUTIER et al., 2016)

3.4.1 Caracterização morfológica

A avaliação morfológica das células em cultura foi realizada em microscópio invertido Zeiss AXIO (Carl Zeiss) sob contraste de fase. Em seguida, determinados campos foram selecionados utilizando o *software Zen 2012* (Carl Zeiss).

Foi realizado também a centrifugação de 50000 células em um volume de 100µL em lâminas não tratadas. Essa centrifugação foi realizada a 300 RPM por 5 minutos na centrífuga Cytospin 3 (ThermoFisher Scientific). Após secagem em temperatura ambiente essas células foram coradas com coloração de May-Grünwald-

Giemsa (MGG) (PIATON et al., 2015). As lâminas foram analisadas por microscopia de campo claro em microscópio Zeiss Axioscop 2 (Carl Zeiss) e *software* AxioVision (Carl Zeiss).

3.4.2 Avaliação do potencial clonogênico

Para avaliar o potencial clonogênico das células pluripotentes após a diferenciação hematopoética fez-se o cultivo (em triplicata) em meio semissólido MethoCult® H4435 (StemCell Technologies) suplementado com 3 U/mL de eritropoetina (EPO) (Peprotech). As células coletadas foram contadas e plaqueadas em meio semissólido em uma concentração de concentração de 10^4 células/mL. A mistura de células, EPO e meio semissólido foi homogeneizada e distribuída em placas de 34 mm com o auxílio de seringa de 3 mL e agulha de 16G. As células foram incubadas a 37°C, 5% CO₂ e 85% de umidade por 14 dias. Após esse período as células foram fotografadas. Esse ensaio foi realizado para avaliar o potencial clonogênico da linhagem PB12 e PBscd08 e utilizou-se as células mononucleares do sangue de cordão umbilical e placentário como controle positivo da formação de colônias.

3.4.3 Caracterização imunofenotípica da diferenciação *in vitro*

Para a imunofenotipagem celular durante a diferenciação, utilizou-se anticorpos monoclonais de camundongos com especificidade humana. Para otimizar a compensação das fluorescências nos experimentos longitudinais, utilizou-se o kit *BD™CompBeads Set Anti-Mouse* (BD Biosciences) que é constituído dois tipos micropartículas de poliestireno, uma que se liga em qualquer cadeia leve Kappa das imunoglobulinas murinas (positiva) e outra que não possui tal capacidade (negativa). Como controle negativo de cada experimento, utilizou-se células não marcadas com anticorpos.

Para os experimentos de diferenciação de células-tronco pluripotentes foram utilizados os seguintes anticorpos anti-marcadores de superfície produzidos em camundongos: anti-CD31 FITC, anti-CD34 PE, anti-CD36 FITC, anti-CD43 FITC, anti-CD45 APC ou PerCP, anti-CD49d APC, anti-CD71 APC, anti-CD73 FITC, anti-CD105 PerCP, anti-CD144 PE, anti-CD235a FITC ou PerCP (Glicoforina A) e anti- CD324 PE.

Além disso utilizou-se os anticorpos intracelulares anti-NANOG FITC e anti-POU5F1 PE (OCT3/4).

Para os experimentos de diferenciação de progenitores eritroide e da linhagem celular K562 foram utilizados os anticorpos de superfície produzidos em camundongos: anti-CD34 PE, anti-CD36 FITC, anti-CD49d APC, anti-CD71 APC, anti-CD233 (Band3) PE, clone BRIC 6 (Bristol, UK), anti-CD235a FITC (todos os anticorpos utilizados são da BD Biosciences com exceção do CD233). A avaliação da pureza das células CD34+ foi realizada com a marcação com anticorpos anti-CD34 que ligassem em sítios diferentes da proteína dos utilizados durante a marcação com *beads*.

A anexina V FITC foi utilizada para a avaliação dos níveis de apoptose e o 7 aminoactinomicina D (7AAD), para a avaliação da morte celular. Utilizou-se aproximadamente 1×10^5 células por tubo que, após a lavagem com PBS 1x, a um volume de 200 μ L foi adicionado de 0,5 a 5 μ L de cada anticorpo monoclonal específico conjugado com fluorocromo (BD Biosciences) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Após esse período, a suspensão de células foi lavada com solução de PBS 1x e ressuspendida com 200 μ L dessa mesma solução.

As aquisições foram realizadas em citômetro BD FACSCalibur™ (BD Biosciences), BD FACS Aria I (BD Biosciences) ou BD FACS Aria Fusion (BD Biosciences) por meio do *software* BD CellQuest™ Pro, versão 6 ou BD FACSDiva™, versão 8.0. Para cada imunofenotipagem foram adquiridos de 10 a 50 mil eventos na *gate* de remoção de *dublets* após a seleção da população interesse no gráfico de tamanho e complexidade interna. As análises apresentadas neste relatório foram realizadas utilizando o *software* FCS Express 6.06.0022 (DeNovo Software) e a compilação dos dados foi realizada no *software* Graphpad Prism 8.1.1 (Graphpad).

A partir do gráfico de *foward scatter channel* (FSC) versus *side scatter channel* (SSC), foi feita uma *gate* na população de eventos de interesse G1 **Figura 6**. Dessa *gate* foram removidas as células não individualizadas (*dublets*, aglomerados ou detritos), fazendo uma *gate* no gráfico *foward scatter channel* (FSC-W) versus *foward scatter channel* (FSC-A) G2 **Figura 6**. Dentro da população viva (7AAD negativa) G3 **Figura 6**, foram gerados os histogramas com a porcentagem de expressão celular para cada marcador de superfície e sobrepostos com seu respectivo isotipo por *overlay*.

Para as análises da cascata de diferenciação, após a remoção dos *doubblets*, considerou-se apenas as células 7AAD negativa, dessa *gate*, foram consideradas as células positivas para o CD235a, a glicoforina A (GPA) G4 (**Figura 6**), e dessas, a relação entre CD49d e Band 3.

Figura 6: Estratégia de *gating* da citometria de fluxo

A partir da gate G1 foi removido os *doubblets* (G2), selecionado apenas as células vivas (G3) e positivas para a glicoforina A (G4), dessa *gate* analisou-se a relação de CD49d e Band 3.

3.4.4 Análise da expressão gênica

O RNA total das amostras resultantes da diferenciação *in vitro* de células-tronco pluripotentes foram extraídas utilizando o reagente de *TRIzol*[®] (ThermoFisher Scientific) e tratadas com DNase Turbo (ThermoFisher Scientific) conforme as recomendações do fabricante, visando remover DNA genômico. O RNA das amostras diferenciadas a partir de células CD34 positivas ou da linhagem K562 (ATCC[®] CCL-243[™]) foi extraído com o *RNeasy mini kit* (Qiagen) e tratadas em coluna com kit RNase free DNase (Qiagen), ambos conforme as recomendações do fabricante. Após extraídas, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em equipamento NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific), onde também foi avaliada a pureza das amostras considerando as relações de absorbância entre os comprimentos de onda de 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280}).

Utilizou-se 500 ng de RNA de cada amostra para a síntese do cDNA utilizando o kit *High capacity* (ThermoFisher Scientific), em um volume de 20 μ L, conforme as recomendações do fabricante. Utilizou-se ciclagem de 60 minutos a 37°C, 5 minutos a 95°C, seguido de incubação a 4°C em termociclador *Veriti Thermo Cycler* (ThermoFisher Scientific).

Para a avaliação da eficiência das sondas de hidrólise utilizadas nas análises da expressão gênica a partir de progenitores e escolha da melhor diluição do cDNA, foi realizada uma diluição seriada com fator (1:5) de uma mistura inicial com o cDNA de

todas as amostras a serem analisadas. Utilizando cinco pontos da diluição a partir de 500 ng de RNA convertido em cDNA (1/5, 1/25, 1/125, 1/625 e 1/3125), respectivamente nas concentrações (100, 20, 4, 0,8 e 0,16 ng), foi realizada, em triplicata, a avaliação da eficiência de todas as sondas utilizadas.

O cDNA foi diluído (1:25) e utilizado nas reações de volume final de 10µL de PCR quantitativo em tempo real utilizando sondas de hidrólise TaqMan® (ThermoFisher Scientific) em placa de 96 poços e em termociclador em sistema 7500 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) ou QuantStudio 5 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific).

As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 poços seladas com filme óptico (ThermoFisher Scientific) com a ciclagem a seguir: 2 ciclos iniciais de desnaturação, 50°C por 2 minutos, seguido de 95°C por 10 minutos. Foram realizados 45 ciclos com um passo de desnaturação, 95°C por 15 segundos, e outro de anelamento e extensão, 60°C por 1 minuto. As reações de amplificação foram conduzidas no equipamento 7500 Real Time PCR (ThermoFisher Scientific) ou QuantStudio 5 Real-Time PCR System. As sondas utilizadas na reação de PCR em tempo real estão listadas na **Tabela 1**.

Como genes de referência (endógenos) foi utilizada a média geométrica da expressão de beta-actina (*ACTB*), beta-2-microglobulina (*B2M*) e *FBXL12*, genes que apresentaram a menor variação de ciclo de quantificação (C_q) entre as amostras do estudo. A normalização da reação foi realizada pela média geométrica C_q de amplificação desses três genes endógenos (VANDESOMPELE et al., 2002). As quantificações relativas da expressão gênica das iPSCs foram realizadas pelo cálculo de unidades relativas de expressão (URE) (ALBESIANO et al., 2003). Para as demais amostras submetidas à diferenciação eritroide utilizou-se o método de quantificação da curva relativa (PFAFFL, 2001).

O aplicativo de quantificação relativa da plataforma ThermoFisher Connect foi utilizado para a análise da expressão gênica por *heatmap*. Considerou-se a distância Euclidiana, agrupamento pela média de *linkage* e o ΔC_q utilizando a média geométrica dos genes de referência (D'HAESELEER, 2005; VANDESOMPELE et al., 2002). Os C_q s foram corrigidos pela eficiência de cada gene (KUBISTA; SINDELKA, 2007). A amostra

E12Ph2D0 foi considerada como amostra de referência. Os ΔR_N superiores aos das curvas padrão de cada gene foram considerados como não amplificados.

Tabela 1: Relação dos genes analisados por RT-PCR em tempo real

Símbolo	Nome*	Código de acesso†
<i>ACTB</i>	<i>Actin beta</i>	Hs03023880_g1
<i>B2M</i>	<i>Beta-2-Microglobulin</i>	4326319E
<i>BCL11A</i>	<i>BAF chromatin remodeling complex subunit BCL11A</i>	Hs01093197_m1
<i>FBXL12</i>	<i>F-box and leucine-rich repeat protein 12</i>	Hs01556373_m1
<i>GATA1</i>	<i>GATA binding protein 1</i>	Hs01085823_m1
<i>HBA1/2</i>	<i>Hemoglobin subunit alfa 1/2</i>	Hs00361191_g1
<i>HBB</i>	<i>Hemoglobin subunit beta</i>	Hs00758889_s1
<i>HBD</i>	<i>Hemoglobin subunit delta</i>	Hs00426283_m1
<i>HBE1</i>	<i>Hemoglobin subunit epsilon 1</i>	Hs00362216_m1
<i>HBG1/2</i>	<i>Hemoglobin subunit gamma 1/2</i>	Hs00361131_g1
<i>HBS1L</i>	<i>HBS1 like translational GTPase</i>	Hs04188641_g1
<i>HBZ</i>	<i>Hemoglobin, zeta</i>	Hs00923579_m1
<i>HDAC1</i>	<i>Histone deacetylase 1</i>	Hs02621185_s1
<i>HPRT1</i>	<i>Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	4326321E
<i>KLF1</i>	<i>Kruppel like factor 1</i>	Hs00610592_m1
<i>NANOG</i>	<i>Nanog homeobox</i>	Hs02387400_g1
<i>OCT3/4</i>	<i>POU class 5 homeobox 1</i>	Hs01895061_u1
<i>RNF7</i>	<i>Ring finger protein 7</i>	Hs00762035_s1
<i>RUNX1</i>	<i>RUNX family transcription factor 1</i>	Hs01021970_m1
<i>RUNX2</i>	<i>RUNX family transcription factor 2</i>	Hs00231692_m1
<i>SOX6</i>	<i>SRY-box 6</i>	Hs00264525_m1
<i>LRF/ZBTB7A</i>	<i>Zinc finger and BTB domain containing 7A</i>	Hs00792219_m1

†Disponível em <http://www.lifetechnologies.com>

*Os nomes dos genes serão mantidos em inglês, seguindo a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*)

3.5 Western blot

Aproximadamente um milhão de células resultantes de cada dia analisado da diferenciação hematopoética *in vitro* de progenitores eritroide foi submetido à três ciclos de lavagem com PBS 1x e centrifugação à 200 x *g* e congelados em freezer -80°C até a data de preparo das amostras.

Para a extração de proteínas, o *pellet* foi ressuspendido em 100 µL de tampão contendo 8M de ureia, 0,1M de tris, 5% (v/v) de coquetel inibidor de protease (Sigma-Aldrich) e 1 mM de ortovanadato de sódio como inibidor de fosfatases (Sigma-Aldrich).

Essas células foram submetidas a três ciclos de 5 minutos de sonicação seguida de 5 minutos de incubação em gelo. Após esse processo, o extrato celular foi submetido à centrifugação a $20.000 \times g$ por 30 minutos. O extrato celular foi cuidadosamente coletado sem o contato com o pellet no fundo do tubo. As amostras foram diluídas 1:200, 1:100 e 1:50 e quantificadas em triplicata pelo método de Bradford segundo recomendações do fabricante (Bio-Rad).

Trinta microgramas de extrato proteico foram misturados a 8 μL de tampão de amostra (Laemmli) concentrado 5x contendo Tris-HCl 62,5 mM, pH6,8, 25% (v/v) glicerol, 2% SDS (m/v), 0,01% (m/v) azul de bromofenol e 5% (v/v) β -mercaptoetanol e completado com o tampão tris/ureia para o volume de 40 μL . Todo o volume de cada amostra foi aplicado em gel de gradiente de poliacrilamida 4-20% ou a 12% com gel de empilhamento de 4% foram submetidos à eletroforese em tampão de corrida, pH 8,3, contendo 25 mM de Tris, 193 mM de glicina e 0,1% (m/v) de SDS por 60 minutos sob tensão de máxima de 100 V e corrente de 18 mA. Essa voltagem foi alterada para 36 mA e por outros 90 minutos.

Em seguida, as amostras foram transferidas para membranas de PVDF (GE Healthcare). Essas membranas foram tratadas por 5 minutos com metanol absoluto e lavadas com tampão de transferência (*Towbin buffer*), pH 8,3 contendo 25 mM de Tris, 192 mM de glicina, 20% (v/v) metanol. A transferência aconteceu a 70 V por 120 minutos. A membrana foi incubada com solução de *ATX Ponceau S red staining* (Fluka analytical) por um minuto para verificar a eficiência da transferência.

Após lavagem das membranas com a solução de transferência, elas foram cortadas em tamanho adequado com o auxílio de uma lâmina de bisturi. O bloqueio foi feito por uma hora em solução de leite desnatado 5% (m/v) em tampão salino (*Tris-buffered saline*), TBS-T, a uma concentração final de 20 mM de Tris, 150 mM de NaCl e 0,1% (v/v) Tween 20, pH 7,5. As membranas foram incubadas separadamente a 4°C em plataforma agitada (15 RPM/min) por 16 horas com solução de anticorpos monoclonais murinos com afinidade às proteínas humanas anti-GAPDH (2,0 mg/mL), anti-HBA1, clone 4F9 (0,5 mg/mL), anti-HBB, clone 2H3 (0,2 mg/mL) e anti-HBZ (1,0 mg/mL) em solução de bloqueio com concentração de anticorpos de 1:5000 (0,4 $\mu\text{g/mL}$), 1:5000 (0,1 $\mu\text{g/mL}$), 1:1000 (0,2 $\mu\text{g/mL}$), e 1:1000 (1 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Os anticorpos

anti-HBA1 e anti-HBB foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha e Dra. Karina Kirschner Lopes Teixeira da Universidade Federal de São Carlos.

Os anticorpos primários diluídos foram guardados em freezer -20°C para usos posteriores. A membrana foi lavada 4 vezes com tampão TBS-T a temperatura ambiente em plataforma agitada. Após esse processo, a membrana foi incubada por uma hora com o anticorpo secundário anti-*mouse*, conjugado com peroxidase de rábano (HRP), do inglês, *hourseradish peroxidase*, produzido em *donkey* (Santa Cruz Biotechnology) (0,4 mg/mL) e com diluição 1:3000 em TBS-T. As membranas foram reveladas por protocolo de quimioluminescência com o reagente comercial *Amersham ECL Western Blotting Detection* (GE Healthcare) as imagens foram adquiridas em fotodocumentador *ChemiDoc XRS+ system* (Bio-rad) com o software *Image Lab versão 5.2.1 build 11* (Bio-rad).

A remoção dos anticorpos das membranas (*stripping*) foi realizada com dois ciclos de incubação por 10 minutos em solução de *stripping* contendo 200 mM de glicina, 0,1% (m/v) de SDS e 1% (v/v) Tween 20, pH 2,2, dois ciclos de 10 minutos de lavagem com PBS 1x e dois ciclos de 5 minutos de lavagens com TBS-T 1x antes do bloqueio com leite desnatado 5% (m/v) (Bio-Rad) em TBS-T e continuação do protocolo de *western blotting*.

3.6 Padronização de análises de proteínas

3.6.1 Cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de hemoglobinas

A caracterização do perfil de hemoglobinas das amostras de sangue periférico de indivíduos adulto controle e pacientes com doença falciforme foi realizada por cromatografia líquida de troca catiônica de alta resolução (CE-HPLC) em sistema Variant™ II TURBO (Bio-rad), com fase estacionária negativamente carregada. Esse sistema é completamente automatizado e é utilizado rotineiramente na quantificação de hemoglobinas (Hb), HbA, HbA₂, HbF e algumas outras Hb recombinantes. Para as análises descritas neste trabalho utilizou-se o *Variant II β -Thalassemia Short Program Reorder Pack* (Bio-rad) de acordo com as especificações do fabricante. Esse kit quantifica os níveis e porcentagens de HbA₂ e HbF e detecta as variantes de hemoglobinas mais comuns em até 6,5 minutos.

3.6.2 Proteômica dirigida

3.6.2.1 Desenvolvimento de método de monitoramento de múltiplas reações

Para cada uma das proteínas estudadas fez-se a digestão triptica *in silico* de sua sequência proteica e com base nos dados obtidos na plataforma PeptideAtlas (DESIERE, 2006), foram selecionados manualmente os peptídeos únicos no proteoma humano e dentro desses, aqueles que eram mais observados experimentalmente.

Os peptídeos únicos foram inseridos no programa Skyline (EGERTSON et al., 2015; MACLEAN et al., 2010) versão 3.7.0.10940 para a criação de um método e posterior a análise de peptídeos únicos por espectrometria de massas. Foram utilizadas duas bibliotecas espectrais humanas disponíveis no banco de dados do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia, do inglês “*National Institute of Standards and Technology (NIST)*” para obter-se, *in silico*, o tempo e intensidade esperados de cada peptídeo a ser utilizado. Realizou-se a digestão triptica *in silico*, pode-se verificar se esses peptídeos eram realmente únicos nesse proteoma. Em seguida, selecionou-se peptídeos entre 6 e 25 resíduos, evitando modificações pós traducionais (PTM), metionina e triptofano (oxidação) e cisteínas que poderiam apresentar alquilação incompleta, e esses resíduos poderiam dificultar as análises posteriores.

O método gerado analisou as cadeias de globina humana (alfa (α) beta (β), beta mutada β^S (c.20A>T, p.E6V) e β^C (c.19G>A, p. E6K), delta (δ), gama (γ^A e γ^G), epsilon (ϵ) e zeta (ζ).

3.6.2.2 Preparo de amostras e refino do método de MRM

Utilizando sangue periférico de indivíduos controle e pacientes com doença falciforme, quantificou-se o extrato total de proteínas, ele foi reduzido, alquilado e digerido com tripsina.

As amostras foram individualmente preparadas segundo o estabelecido no Laboratório de Proteômica do Câncer da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) (GRASSI et al., 2017). Foram separadas alíquotas de 100 μ g de proteína total após quantificação pelo método de Bradford ou do ácido bicinchônico (BCA) foram diluídas, em 50 μ L de solução a 8 M de ureia, Tris-HCl a 0,1 M, pH 8,5. Os resíduos de cisteína da amostra foram reduzidos com 50 μ g de ditioneitol (DTT) a 37°C por 30 minutos e em seguida foram alquilados com 250 μ g de iodoacetamida (IAA), também

por 30 minutos, sem exposição à luz. Essa solução proteica foi diluída em 740 µL de solução Tris-HCl 0,2 M, pH 8,0, foi adicionado 4 µg de tripsina (Sigma) e deixado por 16 horas à 37 °C sob agitação de 450 RPM. Após esse período, as amostras foram inseridas nas colunas Oasis HLB (Waters) de acordo com as recomendações do fabricante. A solução contendo os peptídeos tripticos foi eluída em acetonitrila 70 % (v/v) contendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico e secada em SpeedVac (ThermoScientific). Logo antes das análises de espectrometria de massas por monitoramento de reações múltiplas (MRM), os peptídeos foram ressuspensos em acetonitrila 5% acetonitrila Fluka + 0,1 % ácido fórmico até atingirem a concentração de 2 µg/µL de solução de peptídeos.

As amostras de peptídeos tripticos foram injetadas em duplicata no espectrômetro *LC-MS/MS Xevo TQs system* (Waters) e a separação cromatográfica foi realizada em cromatógrafo líquido de ultra performance (UPLC) I-class (Waters), coluna C18 gradiente linear de acetonitrila de 5 a 30% por 25 minutos. Para cada um dos peptídeos utilizou-se de 3 a 5 transições.

3.7 Análises estatísticas

Para as análises estatísticas foi utilizado o software GraphPad Prism, versão 8.1.1. A verificação de diferenças entre os grupos foi realizada pela análise da variância (ANOVA) de uma via seguida do teste de comparações múltiplas de Tukey, considerando-se alfa de 0,05. Considerou-se a diferença significativa quando a diferença entre as médias apresentou $P < 0,05$.

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Diferenciação hematopoética de células-tronco de pluripotência induzida

4.1.1 Teste de *Mycoplasma spp*

Esse teste foi realizado no sobrenadante de cultura das linhagens de células-tronco pluripotentes (PBscd08 e PB12), sempre cultivadas na ausência de antibióticos, visando descartar uma possível contaminação com *Mycoplasma spp*. As amostras foram submetidas ao teste colorimétrico *MycoAlert™ Mycoplasma Detection* (Lonza) que detecta a atividade de enzimas provenientes de *Mycoplasma*. Ambas as amostras analisadas, tiveram seus sobrenadantes de cultura considerados negativos para o *Mycoplasma* no início e no final do experimento, uma vez que a apresentaram razão inferior a 1,0.

4.1.2 Morfologia das células-tronco pluripotentes e isolamento enzimático

Neste estudo, foi realizada a diferenciação hematopoética a partir de duas linhagens de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC): uma linhagem gerada a partir de células de doador saudável, a PB12 e outra a partir de paciente com mutação na cadeia da beta globina que resulta na anemia falciforme, a PBscd08. As duas linhagens foram geradas por protocolo não integrativo com o uso de vetores episomais. Trabalhos anteriores mostraram que as linhagens em questão apresentavam morfologia semelhante mesmo após mais de 20 passagens com EDTA (CATELLI, 2017; PAES, 2019; REIS, 2012).

Neste estudo, ambas as linhagens foram cultivadas sobre matriz Geltrex (ThermoFisher Technologies) e em meio mTeSR1 sem adição de antibióticos e suplementado com fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) e fator de crescimento “transformante” do tipo β (TGF β). Elas mantiveram a morfologia de células pluripotentes, crescendo em colônias com mais de 1000 μm e com bordas bem definidas durante mais de sete passagens (**Figura 7 A e D**). Durante a cultura, apenas a linhagem PBscd08 apresentou pontos de diferenciação celular (focos) como morfologia não pluripotente, os quais foram removidos manualmente em condições estéreis sob microscópio em fluxo laminar horizontal.

Após a expansão das iPSC por mais de sete passagens com EDTA, as células foram submetidas a repique com a enzima acutase (Stempro® accutase®) por outras sete passagens. Vinte e quatro horas após tal dissociação das células foi possível verificar a mudança na morfologia celular (**Figura 7 B e E**), com o aumento do número de células alongadas (fibroblastoide), no entanto, logo voltam a se agregar e crescer em colônias menores. A etapa de adaptação é um passo essencial a ser realizado antes da diferenciação de corpos embrioides (EB), uma vez que seleciona as células com maior sobrevivência em estágio individualizado. Isso aumenta a eficiência de agregação e consequentemente, da formação de EBs em condições de baixa aderência da placa.

Figura 7: Morfologia de células-tronco pluripotentes

Linhagens iPSC PB12 e PBscd08 com morfologia pluripotente (A e D), 24 horas após o repique enzimático (B e E) e 72 horas após o repique enzimático com *Stempro® accutase®* (C e F). Na identificação das linhagens estão indicados o número total de passagens e o número de passagens com a enzima (P-P) (aumento de 40x)

4.1.3 Morfologia e imunofenotipagem da diferenciação dos corpos embrioides

Depois da fase de adaptação das iPSC ao isolamento enzimático, foram realizados experimentos de formação de corpos embrioides apenas utilizando o meio comercial de diferenciação hematopoética *STEMdiff® APEL® 2* suplementado com as citocinas da fase 1 de diferenciação (**Figura 4**), uma vez que trabalhos anteriores mostraram baixa eficiência de formação de EB em culturas com SFM (PAES, 2019).

Na fase 1, os corpos embrioides foram cultivados por 15 dias conforme o esquema representado na **Figura 4**. Observou-se que as células se agregaram e

formaram estruturas tridimensionais, os corpos embrioides. Essa estrutura 3D cria um microambiente (nicho) onde há interação entre diversos tipos celulares em diferenciação e que pode favorecer a indução hematopoética quando submetida a meio suplementado para tal fim.

Visando a formação de corpos embrioides, cada uma das linhagens foi tratada com acutase e aproximadamente 4000 células vivas foram plaqueadas em cada um dos 60 poços centrais de 4 placas baixa aderência com 96 poços e fundo em U. As placas foram centrifugadas para aumentar a eficiência de agregação celular e de formação de corpos embrioides (**Figura 8**). Para a linhagem PBscd08 foram plaqueadas 3600 células vivas por poço, enquanto na PB12, foram 4400.

Figura 8: Morfologia de iPSC no dia zero de formação de corpos embrioides

Linhagens iPSC PBscd08 (A) e PB12 (B) logo após a centrifugação de células na placa em fundo em U. Na identificação das linhagens estão indicados o número total de passagens e o número de passagens com a enzima (P-P) e o dia da formação de corpos embrioides (aumento de 40x).

A cada dois ou três dias, adicionou-se 50 µL de meio de diferenciação suplementado com as citocinas da fase 1 e filtrado em filtro de 0,22 µm. Ambas as linhagens apresentaram formação de EBs uniformes em todos os poços a partir de 48h e com crescimento semelhante entre si e entre linhagens celulares estudadas (**Figura 9**). A partir do oitavo dia de diferenciação da linhagem PB12, observou-se um aumento de células na periferia dos EBs, aderidas ao fundo do poço e no sobrenadante (**Figura 9 E e F**), isso foi observado na maioria dos corpos embrioides dessa linhagem.

Figura 9: Morfologia de corpos embrioides

Linhas iPSC PBscd08 (A-C) e PB12 (D-F). Aumento gradual do tamanho dos EBs ao longo da diferenciação, respectivamente nos dias D5 (A e D), D8 (B e E) e D14 (C e F). Na identificação das linhagens estão indicados os dias da formação de corpos embrioides (aumento de 40x).

Durante ambas as fases, as células foram caracterizadas quanto à expressão de marcadores de superfície e/ou intracelulares por citometria de fluxo. Os dados estão resumidos nas **Tabela 2**. Para as análises imunofenotípicas, parte dos corpos embrioides foi tratada com acutase. As linhagens PBscd08 e PB12 foram caracterizadas quando a expressão de marcadores intracelulares de pluripotência (NANOG e OCT3/4) ao final da adaptação à acutase, início da diferenciação (D0) e no oitavo dia de diferenciação (D8) (**Figura 10 A e B**).

Tabela 2: Caracterização imunofenotípica da diferenciação hematopoética de iPSC (Fase 1).

Marcador	PBscd08			PB12		
	D0	D8	D14	D0	D8	D14
NANOG	62.7	2.5	-	88.9	1.6	-
OCT3/4	66.4	0.1	-	87.3	1.7	-
CD34	7.9	4.7	17.7	1.7	6.0	5.0
CD36	0.3	1.3	1.8	0.5	1.2	0.1
CD43	16.3	1.9	1.9	3.	8.2	0.2
CD45	0.5	0.9	0.4	0.3	5.4	20.2
CD71	73.8	34.0	67.6	71.2	55.3	93.2
CD235a	36.2	0.9	3.3	24.0	20.5	1.1

Observou-se a diminuição de marcadores de pluripotência (NANOG e OCT3/4) entre os dias zero e oito para as duas linhagens. A expressão de NANOG nas linhagens

PBscd08 e PB12 foi de 63% e 89%, no dia zero; e 2,5% e 1,65% no dia 8, respectivamente (**Figura 10 A**). Já o OCT3/4 foi de 67% e 87% no dia zero para 0,4% e 1,74% no oitavo dia (**Figura 10 B**).

Além desses marcadores, foi analisada a expressão dos marcadores hematopoéticos de superfície CD34, CD36, CD43, CD45, CD71 e CD235a nas mesmas duas linhagens no início da diferenciação (D0), no oitavo dia (D8) e ao final da primeira fase (D14) (**Figura 10 C e D**).

Houve diferença do padrão de expressão de marcadores entre as células estudadas. A expressão de CD34 ao longo desses três dias analisados foi respectivamente 7,9%, 4,7% e chegando a 17,8% no dia catorze da diferenciação da PBscd08 e 1,7%, 6% e 5% para a PB12.

O marcador CD36 não variou ao longo da primeira fase desse estudo e estava expresso em valores próximos de zero, 0,3%, 1,2% e 1,8% na primeira linhagem e 0,5%, 1,2% e 0,1% na segunda. O CD43 estava expresso em 16,3% no dia zero e 1,9% nos dias oito e catorze na PBscd08 e 3,5%, 8,2% e 0,2% na PB12. O CD45 praticamente não variou na primeira linhagem (0,5%, 0,9% e 0,4%), enquanto os valores passaram de 0,3% no dia zero para 5,5% no oitavo dia e 20,2% ao final da primeira fase de diferenciação da PB12.

O CD71 esteve expresso em pelo menos 60% das células durante toda essa fase, passando de 74% para 34% e 68% na PBscd08 e 71,3%, 55,3% e 93% ao final dessa fase de diferenciação da PB12.

A expressão de CD235a estava em 36% no dia zero e passou 0,9% e 3,3% nos demais dias na PBscd08 enquanto manteve-se por volta de 20% nos dois primeiros dias analisados e caiu para 1,1% na PB12.

Figura 10: Caracterização imunofenotípica da diferenciação hematopoética de iPSC (Fase 1)

Linhagens iPSC PBscd08 (A e C) e PB12 (B e D). Porcentagem de células positivas para os marcadores NANOG, OCT3/4 no início da diferenciação e no dia 8 após o cultivo com meio *STEMdiff® APEL® 2*. Avaliação dos marcadores hematopoéticos de superfície CD34, CD36, CD43, CD45, CD71 e CD235a ao início (D0), no dia 8 (D8) e ao final da primeira fase de cultivo (D14).

A primeira fase da diferenciação transcorreu dentro do esperado, apesar de haver pouco enriquecimento de marcadores eritroides como CD43 e CD34.

Após os 15 dias da primeira fase desse protocolo, iniciamos a segunda etapa, a de maturação eritroide, onde houve a introdução da eritropoetina (EPO). Nessa fase os corpos embrioides foram tratados com acutase e as células foram plaqueadas sob gelatina em placas de 24 poços a uma concentração de 1×10^5 células/mL.

A partir desse ponto, foi adicionado ao meio de cultura, holotransferrina, IL-3, EPO e SCF e trocado a cada dois ou três dias. Logo no segundo dia (D2) após a troca de meio, observou-se que poucas células estavam aderidas à matriz e havia uma alta concentração de células no sobrenadante, essas células foram submetidas à análise imunofenotípica (**Figura 11**). No quarto (D4) e décimo primeiro dia (D11) foi analisado o total de células de um dos poços da diferenciação. As células foram coletadas em todos os pontos da segunda fase tanto para a citometria de fluxo quanto para análises de expressão gênica.

Foi observado uma grande expressão de glicoforina A (CD235a) nos três dias analisados da segunda fase. As duas linhagens celulares apresentaram CD71 e menos de 5% de CD36 como está representado na **Figura 11** e resumido na **Tabela 3**. As células em meio SFM apresentaram maior expressão de CD235a, no entanto, no final do experimento, essa expressão não se manteve na linhagem PBscd08.

Tabela 3: Caracterização imunofenotípica da diferenciação hematopoética de iPSC (Fase 2)

Marcador (%)	PBscd08						PB12					
	STEMdiff APEL 2			SFM			STEMdiff APEL 2			SFM		
	D2	D4	D11	D2	D4	D11	D2	D4	D11	D2	D4	D11
CD36	26.6	1.3	0.5	5.3	2.2	0.1	2.2	0.1	2.6	0.1	2.2	2.4
CD71	2.4	20.9	30.3	1.1	15.2	53.5	17.4	34.7	21.8	16.6	27.1	20.2
CD235a	81.6	96.9	26.8	91.7	97.2	7.8	48.9	88.5	40.1	95.3	94.9	88.4

Figura 11: Caracterização imunofenotípica da diferenciação hematopoética de iPSC (Fase 2)

Expressão dos marcadores eritroides CD36, CD71 e CD235a nas duas linhagens de iPSC nos dois meios estudados.

Com a troca de meio a cada 2 ou 3 dias, a maior parte das células permaneceu aderida à placa e adquiriu morfologia endotelial e fibroblastoide até o final do experimento. Visando entender o comprometimento celular das amostras linhagens diferenciadas *in vitro*, analisamos marcadores endoteliais e mesenquimais, como o

PECAM-1 (CD31), CD73, CD105, VE-Caderina (CD144) e a E-caderina (CD324). Observou-se alta expressão de CD105 em ambas as linhagens nos dois meios de cultura analisados conforme representado na **Tabela 4**.

Tabela 4: Caracterização imunofenotípica ao final da Fase 2 da fase diferenciação hematopoética de iPSC.

Marcador	PBscd08		PB12	
	STEMdiff APEL 2	SFM	STEMdiff APEL 2	SFM
CD31	1.7	3.5	6.2	10.5
CD73	23.7	5.1	16.8	15.6
CD105	62.4	99.8	65.6	38.1
CD144	3.1	1.1	6.7	6.2
CD324	13.1	10.6	7.6	17.4

4.1.4 Avaliação do potencial clonogênico e expressão gênica

Após a primeira fase de indução mesodérmica, as células em diferenciação foram plaqueadas a uma concentração de 1×10^4 células/m em meio semissólido MethoCult® H4435 (StemCell Technologies) suplementado com 3 U/mL de EPO. Essas células foram mantidas por 14 dias e as colônias foram avaliadas por microscopia de campo claro em microscópio invertido.

Observou-se que as células em diferenciação não apresentaram potencial de formação de colônias de progenitores eritroides, granulocíticos ou megacariocíticos e que o PBMC de sangue de cordão foi capaz de formar colônia eritroide do tipo BFU-E (**Figura 12**). Imagens representativas de um experimento de diferenciação, em triplicata.

Figura 12: Avaliação de potencial clonogênico por ensaio de metilcelulose

As linhagens PBscd08 (A) e PB12 (B) após 14 dias da diferenciação hematopoética não apresentaram potencial clonogênico. O PBMC (C) de sangue de cordão umbilical e placentário após 14 dias de cultivo foi capaz de formar colônias eritroides.

Após a extração de RNA e tratamento com DNase, apenas as amostras dos dias D0, D2 e D4 da fase 2 da diferenciação hematopoética de iPSC apresentaram quantidades suficientes para a transcrição reversa e análises da expressão gênica.

Observou-se que no dia zero da diferenciação, essas células não apresentavam produção de globinas, no entanto, após a indução, passaram a expressar os genes de tais globinas, principalmente os da cadeia alfa (*HBA1/2*), epsilon (*HBE1*) e gama (*HBG1/2*), atingindo respectivamente picos de valores de 53, 41 e 685 URE para a PBscd08 no quarto dia e 30, 60 e 320 URE na PB12 no segundo dia de diferenciação. Essa mesma linhagem também mostrou expressão de *HBD* e *HBB* (**Figura 13**).

Figura 13: Expressão gênica de globinas na diferenciação hematopoética *in vitro* a partir de iPSC

Expressão gênica das globinas alfa 1/2, beta, delta, epsilon, gama 1/2 e zeta. Ambas as linhagens apresentaram expressão gênica de globinas, principalmente a cadeia gama.

4.2 Diferenciação *in vitro* de progenitores eritroides (CD34⁺) e da linhagem celular K562

Frente às dificuldades encontradas anteriormente por nosso grupo na diferenciação hematopoética das iPSC, decidiu-se avaliar o *switching* de globinas na diferenciação eritroide a partir de progenitores eritroides (CD34⁺) provenientes de fontes distintas. Uma alternativa foi o uso de progenitores retidos no sistema de leucorredução durante a doação por aférese de plaquetas ou isolados a partir do excedente da doação por aférese de progenitores hematopoéticos após mobilização com G-CSF.

Em colaboração com o Prof. Dr. Wassim El Nemer, realizamos, no período de 16 de abril a 04 de maio de 2018, um treinamento focado nessa abordagem de diferenciação e caracterização celular de modo semelhante ao realizado por Gautier e colaboradores (GAUTIER et al., 2016). Ele foi realizado em uma das unidades do Instituto Nacional de Pesquisa Médica e de Saúde, INSERM (UMR_S 1134) no Laboratório de Biologia Integrada de Glóbulos Vermelhos, do Instituto Nacional de Transfusão Sanguínea (INTS), Paris, França. Em seguida, o protocolo foi implementado e validado em nosso laboratório.

Esse protocolo consiste em duas fases (**Figura 5**), na primeira há a expansão, durante sete dias, de progenitores eritroides (CD36⁺) e a diminuição da frequência de CD34⁺ com o cultivo em meio suplementado com IL-3, IL-6 e SCF. A segunda fase pode ser realizada pelo tempo necessário para se observar a enucleação, em geral, de 12 a 15 dias. Nessa fase há a troca da IL-6 pela eritropoetina (EPO) e a manutenção das concentrações de IL-3 e SCF.

Neste trabalho, os experimentos E12, E13 e E14 foram realizados com células CD34⁺ isoladas a partir de sistemas de leucorredução de três doadores de plaquetas e o E16 foi isolado a partir do excedente da doação por aférese de progenitores hematopoéticos.

4.2.1 Morfologia celular da diferenciação *in vitro*

Ao longo dos quinze dias da segunda fase da diferenciação eritroide desses progenitores, observou-se a gradual diminuição do raio das células e a intensificação da coloração avermelhada a partir do oitavo dia dessa fase. Isso foi observado nos três experimentos independentes mostrados neste trabalho (E12, E13 e E16), como o está representado na **Figura 14**. O mesmo não aconteceu com a morfologia da linhagem celular K562, uma vez que se manteve inalterada ao longo do protocolo.

Figura 14: Morfologia celular na segunda fase de diferenciação *in vitro* de progenitores eritroides

Diferenciação a partir de células CD34⁺ isoladas de três indivíduos (E12, E13 e E16) e a linhagem comercial K562. Diminuição do raio das células primárias e intensificação da coloração vermelha (Aumento de 63x).

Visando verificar a mudança de morfologia das células em nível citológico, utilizou-se a coloração de May-Grünwald-Giemsa (MGG), uma mistura de dois corantes neutros. O corante de May-Grünwald é composto pelo corante ácido (eosina) e básico (azul de metileno). O corante de Giemsa é composto apenas de azul de

metileno. Essa marcação é amplamente utilizada na hematologia e permite a diferenciação entre as fases da diferenciação hematopoética.

Neste trabalho, isolamos células para a centrifugação sobre lâmina e posterior coloração com MGG. Esse processo foi realizado no início da segunda fase da diferenciação (D0), quarto, oitavo e décimo segundo dia da diferenciação **Figura 15**.

Ao final da primeira fase do protocolo de diferenciação eritroide (D0) até o quarto dia da segunda fase, a maior parte das células apresentavam morfologia de proeritroblastos (ProE) com citoplasma basofílico com intensa coloração e grande relação núcleo citoplasma. É possível também verificar a presença de eritroblastos basofílicos (baso 1 e 2).

No oitavo dia da diferenciação, há predomínio de eritroblastos poli e ortocromáticos. Os policromáticos apresentam menor coração basofílica do citoplasma, já os ortocromáticos, apresentam cromatina mais compactada. Ambos os estágios apresentam menor relação núcleo/citoplasma. Além disso, é possível verificar a presença de eritroblasto basofílicos e alguns reticulócitos. No décimo segundo dia, o predomínio é de eritroblastos ortocromáticos com alguns policromáticos. Houve pouca mudança da morfologia da K562 ao longo da diferenciação. Observou-se o aparecimento de eritroblastos policromáticos além dos basofílicos.

Figura 15: Morfologia celular durante a diferenciação eritroide *in vitro*

Coloração de May-Grunwald Giemsa (MGG). Imagem representativa da segunda fase de diferenciação eritroide *in vitro*. Diminuição da relação núcleo-citoplasma. (Aumento de 63x).

4.2.2 Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritroide *in vitro*

Após o isolamento de células CD34 positivas por coluna imunomagnética, obtivemos mais de 80% de pureza para esse marcador para todos os progenitores isolados neste trabalho. Ao final da primeira fase do protocolo de diferenciação eritroide de progenitores CD34⁺, foi avaliada a expressão de marcadores de superfície CD34, CD36, CD45, CD49d, CD71, CD233 e CD235a. A maior parte das análises dos experimentos mostrados neste trabalho foi realizada nos dias D0, D4, D8 e D12 da segunda fase de diferenciação.

Ao longo da primeira fase de diferenciação houve uma redução significativa da expressão do antígeno de progenitores hematopoéticos (CD34) de tal forma que, nos experimentos E12, E13 e E14 (**Figura 16 A**), passou de mais de 80% após o isolamento para aproximadamente 50% após os sete dias da primeira fase de diferenciação e menos de 2% ao final da segunda fase. No experimento E16 (**Figura 16 B**), a diminuição da expressão de CD34 foi mais lenta quando comparado às linhagens

anteriores e a linhagem K562 não apresentou mais de 3% de expressão durante toda a diferenciação (**Figura 16 C**).

Observou-se aumento da expressão da glicoproteína plaquetária 4 (CD36) ao longo da segunda fase de diferenciação nos experimentos E12, E13, E14 e E16 (**Figura 16 D e E**) e houve menos de 3% de células positivas para esse marcador na linhagem de leucemia (**Figura 16 F**).

Houve diminuição da porcentagem de células positivas para o receptor de transferrina (CD71) entre os dias D0 e D4 e entre os dias D4 e D8 e D12, apenas na diferenciação dos progenitores isolados a partir de sistema de leucorredução (**Figura 16 G**). Não houve variação no experimento E16 (**Figura 16 H**). Na linhagem K562 (**Figura 16 I**) houve diminuição apenas entre os dias zero e quarto e o quarto e oitavo e décimo segundo.

Figura 16: Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritroide a partir de progenitores CD34⁺.

Expressão dos marcadores de superfície CD34, CD36 e CD71 ao longo de 12 dias de diferenciação. A, D e G são representativos da diferenciação de progenitores eritroides isolados de sistema de leucorredução de

paquetaferese. B, E e H, foram isolados a partir de progenitores mobilizados com G-CSF. C, F e I, são relativos à linhagem K562.

Observou-se um aumento significativo na porcentagem de células positivas para a glicoforina A (CD235a) nos primeiros dias da diferenciação, ultrapassando 80% de células positivas no oitavo dia em todos os experimentos realizados. Houve diferença entre os dias zero e o oitavo, décimo segundo e décimo quinto dia (**Figura 17 A e B**). A linhagem K562, que não mostrou variação nesse marcador ao longo da diferenciação, permanecendo com mais de 95% de células positivas durante o experimento (**Figura 17 C**).

Não houve diferença na porcentagem de células positivas para a integrina alfa4 (CD49d) ao longo da diferenciação. Ao final da primeira fase de diferenciação, cerca de 100% das células na *gate* estudada apresentavam expressão, esse valor passou para valores próximos de 90% no oitavo dia e voltou a aumentar nos dias subsequentes, no entanto, não houve diferença (**Figura 17 D**). No experimento E16, não houve variação na expressão de CD49d ao longo da diferenciação, mantendo mais de 95% de expressão desse marcador (**Figura 17 E**). A linhagem K562 não expressou mais de 15% desse marcador durante o processo (**Figura 17 F**).

Foi analisada também a expressão da proteína Band 3, importante proteína do grupo sanguíneo Diego. Nos experimentos E12, E13 e E14, houve um aumento gradual da expressão desse marcador ao longo da diferenciação. Houve diferença entre os dias zero e quatro e os dias 12 e 15 (**Figura 17 G**). Isso não aconteceu no E16 (**Figura 17 H**). A partir do oitavo dia de diferenciação da K562, houve mais de 90% de expressão desse marcador enquanto comparados com os 15% nos quatro primeiros dias da segunda fase (**Figura 17 I**).

Figura 17: Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritroide a partir de progenitores CD34⁺

Expressão dos marcadores de superfície CD235a, CD49d e Band 3 ao longo de 12 ou 15 dias de diferenciação. A, D e G são representativos da diferenciação de progenitores eritroides isolados de sistema de leucorredução de paquetaferese. B, E e H, foram isolados a partir de progenitores mobilizados com G-CSF. C, F e I, são relativos à linhagem K562.

A expressão dos marcadores CD49d e Band3 (CD233) dentro da população de células glicoforina A (CD235a) positivas está representada na **Figura 18**. Observa-se incremento gradual na expressão CD235a e de CD233, com a diminuição de CD49d conforme as células entram nos estágios finais da diferenciação e iniciam, em alguns casos, a enucleação. Essa mudança morfológica é evidenciada na coloração com MGG (**Figura 15**).

Figura 18: Caracterização imunofenotípica da diferenciação eritroide *in vitro*

A) Avaliação do aumento de glicoforina A (GPA). B) Variação dos marcados CD49d e Band3 em células viáveis e GPA positivas ao longo de 15 dias da segunda fase do protocolo de diferenciação de progenitores eritroides.

4.3 Análise da expressão gênica

O RNA das amostras diferenciadas a partir de células CD34 positivas ou da linhagem K562 (ATCC® CCL-243™) foi extraído com o *RNeasy mini kit* e tratadas em coluna com *kit RNase free DNase*, ambos conforme as recomendações do fabricante. Após extraídas, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em equipamento NanoDrop 2000c, onde também foi avaliada a pureza das amostras considerando as relações de absorbância entre os comprimentos de onda de 260nm e 280nm (A_{260}/A_{280}).

Partindo de 500 ng de RNA de cada amostra foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit *High capacity* (ThermoFisher Technologies), em um volume de 20 μ L, conforme as recomendações do fabricante. Utilizou-se ciclagem de 60 minutos a 37°C, 5 minutos a 95°C, seguido de incubação a 4°C em termociclador *Veriti Thermo Cycler*.

Para a avaliação da eficiência das sondas de hidrólise utilizadas nas análises da expressão gênica a partir de progenitores e escolha da melhor diluição do cDNA, foi realizada em uma diluição seriada com fator (1:5) de uma mistura inicial com o cDNA de todas as amostras a serem analisadas. A avaliação da eficiência de todas as sondas utilizadas foi realizada em triplicata. As eficiências variaram entre 83 e 97% e as curvas de amplificação e a concentração de cDNA (**Figura 19**) (PFAFFL, 2001).

Figura 19: Comparação das eficiências de sondas de hidrólise

O cDNA foi diluído (1:25) e utilizado nas reações de volume final de 10 μ L de PCR quantitativo em tempo real utilizando sondas de hidrólise TaqMan® (ThermoFisher Scientific) em placa de 96 poços e no termociclador *QuantStudio 5 Real-Time PCR System*. As reações foram realizadas em duplicatas em placas de 96 poços. Como genes de referência (endógenos) foi utilizada a média geométrica da expressão de β -actina, β 2-microglobulina e FBXL12, genes que apresentam a menor variação de ciclo de quantificação (C_q) entre as amostras do estudo (VANDESOMPELE et al., 2002). Para as amostras submetidas à diferenciação eritroide utilizou-se o método de quantificação da curva relativa (PFAFFL, 2001).

Visando entender as vias que foram ativadas para a variação da expressão de globinas (*switching*) ao longo da segunda fase de diferenciação, analisou-se importantes genes regulatórios desse processo. Na **Figura 20**, evidencia-se as interações conhecidas experimentalmente ou em bancos de dados, bem como as interações preditas ou observadas na literatura.

Figura 20: Rede de interação entre globinas e genes reguladores

Relação entre globinas e genes reguladores do *switching* (SZKLARCZYK et al., 2015).

Todas as amostras estudadas mostraram, em diferentes graus, mudança de padrão de expressão de globinas ao gênica ao longo dos dias da segunda fase da diferenciação *in vitro* (**Figura 21**).

Figura 21: Expressão genica de globinas

Expressão relativa das globinas alfa (*HBA1/2*), beta (*HBB*), delta (*HBD*), epsilon (*HBE1*), gama (*HBG1/2*) e zeta (*HBZ*) ao longo da segunda fase de diferenciação eritroide.

No décimo segundo dia da diferenciação, a globina alfa (*HBA2*) estava mais de 420x mais expressa no E16 do que no início da segunda fase. A globina beta (*HBB*) e

delta (*HBD*) estavam respectivamente 160 e 12 vezes mais expressa no E12 nesse mesmo período. A globina epsilon (*HBE1*) aumentou menos de 4 vezes no E16 e dobrou sua expressão na linhagem K562. Houve redução dessa globina em E12 e E13.

Não houve um padrão de resposta entre os progenitores isolados e diferenciados *in vitro*. Células isoladas de indivíduos diferentes apresentaram diferentes respostas ao mesmo estímulo realizado na diferenciação (**Figura 21** e **Figura 22**).

Ao final da segunda fase de diferenciação, no E12 observou-se um aumento da expressão de *HBA1/2* (300x), *HBB* (160x), *HBD* (11x), *HBE1* (8x) e *HBZ* (22x), juntamente com aumento da expressão de *BCL11A* (6x), *LRF/ZBTB7A* (16x), *KLF1* (9x), *GATA1* (2x), *RUNX2* (2,5x) e *SOX6* (480x). Houve diminuição dos níveis de *HBE1* (5x), *HDAC1* (4x), *HBS1L-MYB* (2x) e *RUNX1* (17x) (**Figura 21** e **Figura 22**).

Para diferenciação do E13, a expressão de *HBA1/2* aumentou quase 46 vezes, *HBB* (10x), *HBD* (4x), *HBG2* (4x) e *HBZ* (2x), enquanto a expressão de *BCL11A* (2x), *LRF/ZBTB7A* (2x), *KLF1* (2x), *GATA1* (3x), *RUNX2* (1,5x) e a de *SOX6* (43x). Houve diminuição dos níveis de *HBE1* (2x), *HDAC1* (3x), *HBS1L-MYB* (2x), *GATA1* (1,5x) e *RUNX1* (9x) (**Figura 21** e **Figura 22**).

Já o experimento E16, apresentou aumento expressão de *HBA1/2* de mais de 420x, *HBB* (46x), *HBD* (9x), *HBE1* (4x), *HBG1/2* (87x) e *HBZ* (112x). A expressão de *BCL11A* estava aumentada em 16x, *HDAC1* (8x), *LRF/ZBTB7* (8x), *KLF1* (50x), *HBS1L-MYB* (15x), *GATA1* (7x), *RUNX1* (3x), *RUNX2* (3x) e o *SOX6* estava 15 mil vezes aumentado (**Figura 21** e **Figura 22**).

Na linhagem K562 houve um aumento de *HBA1/2* (1,5x), *HBB* (2x), *HBE1* (2x), *HBG1/2* (1,5x) e *HBZ* (1,7x). Houve diminuição da expressão de *BCL11A* (3x), *HDAC1* (1,4x), *GATA1* (1,5x), *RUNX1* (2,4x) e *SOX6* (1,3x) (**Figura 21** e **Figura 22**).

Figura 22: Reguladores do *switching* de globinas

Expressão relativa de genes reguladores da expressão de globinas durante a diferenciação eritroide.

O aplicativo de quantificação relativa da plataforma *ThermoFisher Connect* foi utilizado para a análise da expressão gênica por *heatmap*. Considerou-se a distância Euclidiana, agrupamento pela média de *linkage* e o ΔCq utilizando a média geométrica dos três genes de referência (D'HAESELEER, 2005; VANDESOMPELE et al., 2002). Os Cq s foram corrigidos pela eficiência de cada gene (KUBISTA; SINDELKA, 2007). A amostra E12Ph2D0 foi escolhida como amostra de referência para as comparações relativas longitudinais. Os ΔR_N superiores aos das curvas padrão de cada gene foram considerados como não amplificados **Figura 23**.

Observa-se que houve um claro agrupamento entre as amostras da linhagem K562 e as diferenciadas a partir de progenitores $CD34^+$. Neste grupo houve agrupamento no dia zero e quarto dia, no entanto, nos dias 8 e 12 das três amostras diferenciadas isso não aconteceu. Há semelhança entre o padrão de expressão gênica

dos experimentos E12 e E13 com uma evidente diferença para o E16 representado na **Figura 23**.

Nos dias iniciais da segunda fase de diferenciação, observou-se a diminuição da expressão da globina epsilon, *SOX6*, *BCL11A* e *LRF/ZBTB7A* e aumento de níveis de expressão de globina alfa, gama, *RUNX1*. Nos dias finais da diferenciação houve aumento da expressão da globina gama e alfa, *RUNX1*, *GATA1* e *KLF1*, juntamente com diminuição da expressão da globina delta, *BCL11A*, *HDAC1* e *SOX6*.

Figura 23: *Heatmap* da expressão gênica de globinas e genes regulatórios

Expressão relativa de genes reguladores da expressão de globinas durante a diferenciação eritroide. A cor vermelha representa aumento de expressão enquanto a cor azul, diminuição. Os valores de expressão podem ser comparados entre amostras e entre genes.

4.4 Padronização método de proteômica dirigida (MRM)

Foi realizada a análise *in silico* e tabulação de informações relevantes sobre as globinas. Entre essas características, estão: nome do gene, nome da proteína, organismo estudado, similaridade entre as proteínas, sequência Fasta, posição da proteína onde há ligação de metal (Fe), tecido onde são encontradas, função, fase do desenvolvimento onde são encontradas, interações entre as subunidades da estrutura, envolvimento dessas proteínas em doenças e se há modificações pós-traducionais.

Para cada uma das proteínas estudadas fez-se a digestão trípica *in silico* de sua sequência proteica e com base nos dados obtidos na plataforma PeptideAtlas

(DESIERE, 2006). Foram selecionados manualmente os peptídeos únicos no proteoma humano e dentro desses, aqueles que eram mais observados experimentalmente e depositados na base de dados. Para cada peptídeo único obteve-se o seu código de acesso, sequência, média do peso molecular, número de experimentos em que foi observado, ponto isoelétrico e hidrofobicidade (SSRCalc) (DESIERE, 2006; KROKHIN, 2006; UNIPROT CONSORTIUM, 2019).

A **Tabela 5** mostra o nome do gene, símbolo, código do Uniprot e número de peptídeos únicos obtidos na análise pré-refinamento.

Tabela 5: Descrição das proteínas analisadas.

Nome †	Gene/ Símbolo	UniProt *	Número de peptídeos únicos
<i>Hemoglobin subunit alpha1/2</i>	<i>HBA1/2</i>	P69905	5
<i>Hemoglobin subunit beta</i>	<i>HBB</i>	P68871	4
<i>Mutant hemoglobin beta chain</i>	<i>HbS</i>	Q6V0K9	1
<i>Mutant hemoglobin beta chain</i>	<i>HbC</i>	DQ126305	1
<i>Hemoglobin subunit delta</i>	<i>HBD</i>	P02042	4
<i>Hemoglobin subunit epsilon</i>	<i>HBE1</i>	P02100	8
<i>Hemoglobin subunit gamma 1/2</i>	<i>HBG1/2</i>	P69892 P69891	8
<i>Hemoglobin subunit zeta</i>	<i>HBZ</i>	P02008	10
<i>BAF chromatin remodeling complex subunit BCL11A</i>	<i>BCL11A</i>	Q9H165	5
<i>Zinc finger and BTB domain containing 7^a</i>	<i>ZBTB7A</i>	O95365	3
<i>HBS1 like translational GTPase</i>	<i>HBS1L</i>	Q9Y450	10

*Disponível em <http://www.uniprot.org/uniprot/>

† Os nomes dos genes serão mantidos em inglês, seguindo a nomenclatura HUGO (*Human Genome Organization*).

Após a criação do método, realizamos testes com as amostras selecionadas, avaliamos os resultados, removemos os peptídeos com baixa performance no espectrômetro, refinamos o método e selecionamos os melhores tempos de eluição de cada peptídeo de cada proteína. Esse método foi refinado utilizando-se amostras sabidamente contendo globinas em análises de HPLC. Nessa etapa, buscando a maior sensibilidade do teste, selecionando os peptídeos com os melhores sinais, as melhores transições, carga, energia de colisão e tempos de eluição.

Os métodos para análises de globinas (normais e mutadas) e proteínas reguladoras foram refinados em processo reiterativo com o uso de amostras que sabidamente continham tais proteínas. Os resultados estão mostrados na **Figura 24 D a F**, mostrando que o método foi eficiente para distinguir as amostras testadas quanto à presença ou ausência das proteínas normais ou mutadas. As globinas alfa, delta e a gama estavam presentes em todas as amostras (**Figura 24 A-C**). A globina beta

normal (HBB) (**Figura 24 D**) estava presente nas amostras HbAA e HbAS com picos de intensidades superiores a 10^6 e com transições com mesmo tempo de eluição e pico bem definido. Observou-se a presença dessa globina também nas amostras HbSS e HbSC, no entanto, com intensidade de 10^3 e picos bem definidos (**Figura 24 G-I**). Isso se deve por esses pacientes terem recebido transfusões de sangue a pelo menos duas semanas antes da coleta do material utilizado neste experimento. Isso foi verificado pela presença de baixos níveis HbA nos testes de HPLC realizados nessas amostras.

Para experimentos posteriores, utilizamos apenas amostras de pacientes com mais de três semanas pós-transfusão. A globina mutada (HBS) foi encontrada apenas nas amostras com as cadeias S, como era de se esperar, sendo encontrada nas amostras HbSS, HbAS e HbSC (**Figura 24 E**). Na amostra HbAA, não foi encontrada tal globina e o pico observado não ficou bem delimitado e com transições no mesmo tempo de eluição, mostrando a sua ausência. A globina com a mutação C (HBC) foi encontrada apenas nas amostras HbSC e HbCC (**Figura 24 F**). Nas demais amostras, os picos apresentaram-se pouco intensos e sem transições e picos bem definidos, evidenciando a ausência de tal proteínas nas demais amostras. Esses resultados foram realizados pelo menos em testados em triplicata biológica e experimental. As globinas gama (1 e 2), fazem parte da hemoglobina fetal e foram avaliadas nas mesmas amostras. Observou-se picos com maior intensidade (10^6) nas amostras dos pacientes HbSS e HbSC, uma vez que ambas possuíam mais hemoglobina fetal do que as demais, como verificada por HPLC.

Obteve-se resultados para as globinas HBA1/2, HBB, HbS, HbC, HBD, HBG1/2, no entanto, o refino do método para as globinas embrionárias epsilon e zeta ainda precisa ser realizado.

Figura 24: Análise de proteômica dirigida em amostras clínicas

Os gráficos de barra mostram os níveis de globinas nas amostras analisadas. a), b) e c) mostram a área total dos picos respectivamente das globinas α , δ , γ^A . d), e) e f) mostram os resultados para as globinas β , β^S e β^C respectivamente. g) a i) mostram a intensidade dos picos por transições e tempo de eluição das globinas.

Uma vez que as globinas embrionárias são dificilmente encontradas em amostras de sangue periférico, procuramos maneiras alternativas para encontrar essas globinas embrionárias a fim de refinar o método também para essas globinas. Uma alternativa foi o uso de células diferenciadas *in vitro* (Figura 14, Figura 21 e Figura 23). Para isso realizamos análise *in silico* de dados da enciclopédia de elementos do DNA, do inglês, *Encyclopedia of DNA Elements* (ENCODE) (KUNDAJE et al., 2015) e analisamos a expressão gênica entre aproximadamente 60 tipos diferentes de células humanas em um total de mais de 100 conjuntos de dados. Os dados de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) mostraram que as células do cordão umbilical podem ser uma fonte para as globinas *HBA1/2*, *HBB* e *HBG1/2*. Além disso, a linhagem celular K562, linhagem derivada da medula óssea de paciente com leucemia mieloide crônica, apresenta grande expressão genes da eritropoese, incluindo a globina *HBA1*, *HBG1/2*, *HBE1*, além de expressar globina *HBZ* (Figura 21

e **Figura 25**), o que faria dessa célula uma excelente candidata a fonte de globinas HBE1 e HBZ para utilizarmos no refino do método de espectrometria.

Figura 25: Expressão gênica de globinas humanas em células K562 e de cordão umbilical.

Expressão de globinas na linhagem K562 e em sangue de cordão umbilical. Expressão de *HBA1*, *HBE1*, *HBG1*, *HBG2* e *HBZ* na linhagem K562 e *HBA1*, *HBA2*, *HBG1* e *HBG2* nas células isoladas de cordão umbilical.

Os experimentos com a linhagem linfoblástica K562 foram adaptados do protocolo estabelecido por Uchida e colaboradores, uma vez que mostraram alta produção de globinas embrionárias nessa linhagem submetida à diferenciação *in vitro* (UCHIDA et al., 2018). Este achado confirma os dados depositados em bancos de RNA-seq, os quais mostram a expressão das globinas *HBA1*, *HBE1*, *HBG1*, *HBG2* e *HBZ* nessa linhagem celular. A abordagem com o uso de células diferenciadas *in vitro* a partir de progenitores eritroides CD34⁺ também pode ser uma alternativa para a obtenção de tais globinas (**Figura 14**, **Figura 21** e **Figura 23**).

O presente método desenvolvido é semiquantitativo e pode ser utilizado para avaliação de globinas presentes em amostras resultantes da diferenciação hematopoética/eritroide *in vitro*. Como perspectiva dessa etapa pretendemos torná-lo quantitativo absoluto. Para isso, os peptídeos selecionados *in silico* precisam ser validados empiricamente, considerando as melhores energias, transições e tempo de eluição. Com isso, apenas os peptídeos com o melhor desempenho precisam ser sintetizados com marcação isotópica. Esses peptídeos serão usados para a posterior construção da curva de quantificação absoluta das proteínas analisadas.

No decorrer do estudo, tivemos intercorrências com o espectrômetro triplo quadrupolo *LC-MS/MS Xevo TQs system* (Waters) e duas bombas de vácuo aguardam manutenção. Estamos em contato com outros centros para realizarmos os experimentos de proteômica dirigida nas amostras resultantes das diferenciações eritroides *in vitro* apresentadas neste trabalho. Obtivemos expressão de HBB por *Western blot* (dados não mostrados), no entanto os experimentos serão repetidos para essa e as demais globinas.

Discussão

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou o perfil de globinas durante a diferenciação hematopoética *in vitro*. Para tanto, duas linhagens de iPSC foram diferenciadas *in vitro* em progenitores hematopoéticos, bem como a linhagem K562 e as células CD34⁺ isoladas de quatro doadores foram diferenciadas na série eritroide. Esses modelos podem contribuir no entendimento da regulação do *switching* de globinas na diferenciação eritroide terminal e gerar *insights* para a modulação de níveis de globinas e possíveis aplicações translacionais.

5.1 Diferenciação hematopoética de células-tronco de pluripotência induzida

Após o descongelamento e expansão, as iPSC, previamente geradas pelo grupo, apresentaram tamanho reduzido e crescimento em forma de colônias refringentes e com bordas bem definidas, como mostrado na (Figura 7 A e B) (CATELLI, 2017; PAES, 2019; REIS, 2012, 2017). Durante essa fase, células com morfologia diferenciada (fibroblastóide) foram removidas manualmente, visando a manutenção da homogeneidade das células e do aspecto pluripotente (CHATTERJEE et al., 2016).

O cultivo dessas linhagens foi realizado sob matriz Geltrex em meio mTeSR1 com adição de NaB. Esse composto orgânico de cadeia curta possui propriedade de inibição das histonas deacetilases (HDACs), levando à hiperacetilação de histonas e ao aumento da proliferação e autorregeneração celular (BOFFA et al., 1978). Para diminuir as taxas de apoptose, durante os repiques com acutase utilizou-se o Y-27632 dicloridrato, um inibidor seletivo da enzima Rho quinase p160 (WATANABE et al., 2007).

Antes da formação de corpos embrioides, realizou-se o repique enzimático das iPSC por mais de sete passagens. Isso faz com que as células sejam individualizadas mais facilmente e aumentem seu potencial de expansão e reagregação em até cinco vezes (NG et al., 2008a, 2008b). Neste trabalho, foi adotado o repique com acutase ao invés da TrypLE, uma vez que ambas apresentaram efeito semelhante na desagregação e individualização celular e no número de células viáveis após o repique. As células modificaram sua morfologia no dia seguinte após o repique enzimático, no

entanto voltavam a reagrupar em colônias (BAJPAI et al., 2008; BEERS et al., 2012; FISCHER et al., 2018).

Ao longo dessa adaptação, estudos anteriores mostraram que na PB12, antes da etapa de adaptação, a expressão de OCT3/4 e NANOG eram de 89,9% e 90,4%, respectivamente. Após quinze passagens, das quais cinco foram enzimáticas, esses valores passaram para 73% e 77,2% (CATELLI, 2017). Paes (2018), evidenciou que essa diferença pode acontecer em detrimento do uso de células em passagens menores e com menor número de passagens enzimáticas. Em nosso trabalho, após sete passagens com repique enzimático, esses valores foram 87,3% e 88,9% (**Tabela 2**), similar à imunofenotipagem inicial.

O estudo que gerou a linhagem PBscd08, derivada paciente falciforme, mostrou 92% de expressão de OCT3/4 e 93% de NANOG (CUNHA et al., 2017). Em nosso estudo, após a adaptação ao repique enzimático esses valores foram respectivamente para 62,7% e 66,4% (**Tabela 2**). Como observou-se maior frequência de diferenciação espontânea em tal linhagem durante o repique com EDTA e Stempro® accutase®, isso pode levar à diminuição de tais marcadores de pluripotência (BOYER et al., 2005).

Para a diferenciação hematopoética de tais células, optou-se pelo protocolo utilizado por Paes (2018), adaptado a partir de Ng et al. (2008) e Ye et al. (2014). Esse protocolo também é conhecido por *SpinEB* que utiliza a centrifugação de um número determinado de células em placa de 96 poços com baixa aderência e em meio livre de soro e suplementado com determinadas citocinas para a formação de estruturas tridimensionais (3D). Essas estruturas são denominadas corpos embrioides e visam mimetizar o microambiente *in vivo* pós implantação embrionária. Quando sob estímulos mesodérmicos e endodérmicos, transientemente aumenta a expressão de genes relacionados à embriogênese primitiva e posteriormente à mesoderme e endoderme (NG, 2005).

Neste trabalho, utilizou-se o meio comercial *STEMdiff® APEL® 2* suplementado com citocinas que favorecem o comprometimento mesodérmico e a posteriormente a diferenciação hematopoética. Ambas as linhagens foram capazes de formar corpos embrioides 24h após a centrifugação conforme descrito anteriormente por Ng et al. (2008) e Paes (2018). Observou-se um aumento do raio dos corpos embrioides ao longo da diferenciação (**Figura 9**), conforme descrito por NG et al. (2008). Além disso,

observou-se na linhagem PB12 o aparecimento de células refringentes ao redor do EB aderido, como o observado por Huang et al. (2015).

A imunofenotipagem das células diferenciadas *in vitro* foi realizada após a dissociação dos EBs com acutase. Nessa primeira fase as células dos EBs em formação foram analisadas nos dias D0, D8 e D14. Avaliou-se a expressão dos marcadores intracelulares NANOG e OCT3/4 (**Figura 10 A e B**) e dos extracelulares CD34, CD36, CD43, CD45, CD71 e CD235a (**Figura 10 C e D**). Os marcadores de pluripotência diminuíram para valores inferiores a 2,5% no oitavo dia da diferenciação em corpos embrioides, como o observado por Paes et al. (2018). Na linhagem PBscd08, foi observado o aumento de CD34 a valores que ultrapassaram 17% ao final dessa fase, semelhante aos 20% observados por Bai et al. (2016). Na PB12, esse valor não chegou a 6% no mesmo período, no entanto, houve aproximadamente 20% de células CD45 positivas e mais de 90% das células expressaram CD71. Foi possível observar a expressão de CD71 e CD235a desde o dia zero da diferenciação, evidenciando que a série de repique enzimáticos pode ter causado diferenciação espontânea de tais célula. Parte das células resultantes dessa fase de diferenciação foi destinada à ensaio de formação de colônias em metilcelulose, no entanto, só observamos colônias em nosso controle positivo (**Figura 12**).

Na segunda fase dessa diferenciação (**Figura 4**), parte dos EBs de cada linhagem foi dissociada com Stempro® accutase® e plaqueada em placas de 24 poços e cultivados separadamente com *STEMdiff® APEL® 2* ou SFM suplementado com as respectivas citocinas. Nessa fase, a imunofenotipagem foi realizada no dia D2, D4 e D11, como mostrado na **Figura 11**. A individualização das células EBs resultou em um conjunto de células crescendo em monocamada. No D2, observou-se grandes quantidades de células no sobrenadante e essas foram caracterizadas por citometria de fluxo. Nesse momento, mais de 25% das células da linhagem PBscd08 expressavam CD36 quando cultivadas em meio base *STEMdiff® APEL® 2* e 5% quando em SFM, diferente do observado por Paes et al. (2019). Nos demais dias analisados toda a população celular foi analisada após dissociação com a Stempro® accutase®. Observamos o aumento da porcentagem de células CD71⁺ e CD235a⁺ em ambos os meios de cultivo, no entanto, o pico de expressão do primeiro marcador aconteceu no décimo primeiro dia da diferenciação para a linhagem PBscd08 e no oitavo da PB12.

Já o segundo marcador teve seu pico no D8 da PBscd08 e D4 da PB12. Paes e colaboradores (2019) mostraram que, no D11 da fase de maturação, 66,17% das células PBscd08 cultivadas em SFM eram CD71⁺ enquanto nosso experimento obteve-se 54%. Esse mesmo trabalho analisou a diferenciação a partir do oitavo dia e não obteve mais de 26% de células CD235a⁺ independentemente o meio utilizado. Outros pesquisadores mostraram valores próximos a 90% da expressão de CD235a (BAI et al., 2016; HUANG et al., 2015). Neste trabalho observou-se valores acima de 90% desse marcador até o quarto dia e aproximadamente 27% no D11, similar ao obtido por Paes et al. (2018). Isso evidencia que a maior parte das células possa ter sido diferenciada nos dias iniciais da fase de maturação e passado para o sobrenadante que foi descartado durante as trocas de meio, como observado por Costa e colaboradores (2016). Isso leva a observarmos menores valores da expressão desse marcador.

Em ambas as linhagens observamos a expressão de *HBG1/2*, *HBA1/2* e *HBE1* (**Figura 13**) evidenciando a expressão de globinas embrionárias e fetais, como amplamente descrito na diferenciação eritroide *in vitro* a partir de iPSC (DIAS et al., 2011; FERREIRA, 2015; HUANG et al., 2015; PAES et al., 2017; TAKAYAMA et al., 2008; UCHIDA et al., 2017)

Observamos grande diminuição da expressão de CD235a ao final da segunda fase da diferenciação da linhagem PBscd08 em ambos os meios e da PB12 quando em cultivo com *STEMdiff*[®] *APEL*[®] 2. Isso não foi observado na cultura da PB12 com SFM.

Como descrito anteriormente, nessa fase a maior parte das células permaneceu aderida às placas. Tais células apresentaram morfologia endotelial e fibroblastoide e por isso, analisamos a frequência de marcadores endoteliais, epiteliais e mesenquimais por citometria de fluxo (**Tabela 4**).

Ao final da diferenciação *in vitro*, as células a partir da linhagem PBscd08 em cultivo com *STEMdiff*[®] *APEL*[®] 2 apresentaram a expressão dos marcadores mesenquimais CD31 (2%), CD73 (23%), CD105 (62%) e CD144 (3%) e o CD324 (13%), marcador de células epiteliais. Essa mesma linhagem apresentou aproximadamente 4% de CD31, 5% de CD73, 100% de CD105, 1% de CD144 e 11% de CD324 quando cultivada com o meio base SFM. Já a PB12 em cultivo com *STEMdiff*[®] *APEL*[®] 2

apresentou 6% de CD31, 17% de CD73, 66% de CD105, 7% de CD144 e 8% de CD324. Enquanto em SFM apresentou respectivamente 11%, 16%, 38%, 7% e 17% (**Tabela 4**). Isso evidencia que tais células não apresentam potencial hemogênico CD34⁺CD31⁺,CD144⁺, CD41⁻, CD43⁻, CD73⁻ (BAI et al., 2016)

Bai e colaboradores (2013, 2016) mostraram a importância de células semelhantes às do endotélio hemogênico (EH) no desenvolvimento *in vitro* de progenitores hematopoéticos multipotentes e de células-tronco hematopoéticas. Ao final dessa diferenciação obtivemos uma população heterogênea de células que não se assemelha às do EH, mas que possui expressão de marcadores estromais e endoteliais (CRISAN et al., 2008; YU et al., 2013).

Mesmo obtendo a expressão gênica de globinas nas células diferenciadas neste trabalho, optamos em utilizar progenitores eritroides CD34⁺ isolados de indivíduos saudáveis para a realização da avaliação mais completa da eritropoese *in vitro* e do *switching* de globinas. Os experimentos de diferenciação hematopoética a partir de iPSC precisam ser reproduzidos visando a confirmação dos resultados obtidos neste trabalho, uma vez que foram encontradas dificuldades na diferenciação hematopoética e eritroide das iPSCs *in vitro*.

5.2 Diferenciação *in vitro* de progenitores eritroides (CD34⁺) e da linhagem celular K562

O treinamento realizado na instituição francesa nos permitiu implantar o protocolo de diferenciação eritroide *in vitro* a partir de células CD34⁺ e sua caracterização em nosso centro. Esse protocolo consiste basicamente em duas fases e foi adaptado de vários protocolos da literatura (**Figura 5**) (FREYSSINIER et al., 1999; GAUTIER et al., 2016; HU et al., 2013). Na primeira, há o cultivo das células CD34⁺ em meio suplementado com SCF, IL-3 e IL6, fazendo com que haja proliferação da população de progenitores CD36⁺, em sua maioria CFU-E, que dependem de EPO para a sua diferenciação. Na segunda fase, acontece a diferenciação eritroide terminal, com o aumento da expressão de CD235a e Band3 e a produção de globinas.

Diferentemente do realizado por Gautier et al. (2016), neste trabalho não foi realizado a separação de células CD36⁺ ao final da primeira fase de diferenciação, o que resultou em uma menor sincronização de estágios de diferenciação.

Neste trabalho, analisamos a segunda fase da diferenciação eritroide dos progenitores CD34⁺ isoladas a partir de sistemas de leuorredução de três doadores de plaquetas e do excedente de uma doação por aférese de progenitores hematopoéticos mobilizados por fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF). Para tais análises, considerou-se as amostras ao início da segunda fase (D0), D4, D8 e D12 de tal diferenciação.

Em todos os experimentos, com exceção da K562, observou-se a intensificação da coloração avermelhada das células em cultura (hemoglobinizacão), juntamente com a redução do raio celular (**Figura 14**) e o aumento da proporção de eritroblastos poli e ortocromáticos e poucos reticulócitos (**Figura 15**), processos que foram amplamente relatados na literatura (DORN et al., 2015; GAUTIER et al., 2016; GIARRATANA et al., 2011; KODIPPILI et al., 2010; UCHIDA et al., 2018). As células diferenciadas a partir de células CD34⁺ isoladas de ambas as fontes não apresentaram diferenças morfológicas. As células passam sucessivamente pelos estágios de eritroblasto basofílico primário e tardio, eritroblasto policromático, ortocromático, reticulócitos e eritrócito (HU et al., 2013). Esses estágios podem ser melhor observados com a coloração das células em lâmina. Com o passar da diferenciação há aumento das formas mais tardias da diferenciação eritroide.

As diferenças entre as fontes de CD34⁺ começaram a ser mais claramente identificadas durante a caracterização imunofenotípica (**Figura 16**), uma vez que as células se comportaram de maneira diferente sob os mesmos estímulos. Enquanto a frequência de células CD34⁺ ao final da primeira fase da diferenciação dos progenitores isolados dos doadores de plaquetas era próxima aos 50% (**Figura 16 A**), na do indivíduo mobilizado com G-CSF (E16) esse valor estava próximo aos 100% (**Figura 16 B**). Enquanto no primeiro grupo, no quarto dia havia menos de 5% de células CD34⁺, apenas atingiu tais níveis no décimo segundo dia. No entanto, não houve diferença na frequência de células dependentes de EPO (CD36⁺) entre esses dois grupos, sugerindo diferenças apenas nos estágios iniciais da diferenciação eritroide. Como ainda há grande expressão de CD36, essas células provavelmente precisariam ficar mais tempo em cultura para atingir estágios mais tardios da diferenciação.

Estudos transcriptômicos mostraram uma maior frequência de células-tronco hematopoética mais primitivas e progenitores multipotentes na circulação sanguínea de indivíduos mobilizados com G-CSF ou Plerixafor do que os que não receberam tal tratamento (LIDONNICI et al., 2017). O que pode levar a uma diferenciação mais lenta do E16 quando comparada com os outros experimentos.

Ao longo da diferenciação também foi observado um gradual aumento da frequência total de células glicoforina A (CD235a⁺) e Band3 (**Figura 17**), semelhante ao obtido por Gautier et al. (2016), onde a partir do quarto dia é observada sua expressão. A partir da fase de proeritroblasco, há o aumento da expressão de CD235a e Band3 na superfície das células associada à diminuição da frequência de CD49d⁺. A combinação desses fatores (**Figura 18**) em conjunto com a análise morfológica (**Figura 15**) é importante para o monitoramento da eritropoese terminal (HU et al., 2013; LOKEN et al., 1987; LUDWIG et al., 2019).

Esses marcadores foram recentemente utilizados para a seleção de população celulares e realização de análises em larga escala como transcriptômica (RNA-seq), proteômica e epigenômica através da avaliação da acessibilidade da cromatina (ATAC-seq) dos estágios da diferenciação (GAUTIER et al., 2016; LUDWIG et al., 2019).

Neste trabalho, analisamos a expressão gênica das seis principais globinas humanas (**Figura 21**) e a regulação de nove importantes genes reguladores do processo de *switching* da globina gama (**Figura 22**). As expressões gênicas foram corrigidas pela eficiência de cada sonda de hidrólise (PFAFFL, 2001) e analisada em relação à média geométrica dos três genes de referência menos variáveis dentre as amostras estudadas (VANDESOMPELE et al., 2002).

Resultados de Gautier et al. (2016) combinando proteômica e transcriptômica descreveram os 20 genes (mRNA) e proteínas mais expressas durante da diferenciação eritroide *in vitro* a partir de progenitores CD34⁺. Nossos resultados corroboram com a literatura de modo que também se observa um aumento da expressão de *HBA1/2*, *HBB*, *HBD* e *HBG1/2*, conforme as células se aproximam da diferenciação terminal. A linhagem K562 apresentou um aumento discreto na expressão das globinas embrionárias o que já foi previamente descrito na literatura (RUTHERFORD et al., 1981; UCHIDA et al., 2018).

Nos amostras do experimento E16, obtivemos grande expressão de globinas *HBG1/2* e *HBZ*, evidenciando o estágio mais primitivo dos progenitores isolados a partir da mobilização com G-CSF (LIDONNICI et al., 2017). Nessas mesmas amostras observamos intensa expressão da *HDAC1*, o que diminuiria a acetilação de histonas e com isso, o fechamento da cromatina, apesar disso, observamos um aumento da expressão de genes como o *BCL11A* e *LRF/ZBTB7A*, o que pode ser explicado pela ativação de outras vias da regulação de tais genes (XU et al., 2010).

Observamos grande expressão de *SOX6* em todas as diferenciações a partir de progenitores *CD34⁺*. Isso foi observado por outros pesquisadores que o papel desse gene na diferenciação eritroide terminal. Conforme há o aumento da expressão de *SOX6*, há aumento na frequência de células *CD235a⁺* e diminuição das populações *CD34⁺* (CANTU et al., 2011). Esse mesmo estudo mostrou como a indução de *SOX6* acelerava a diferenciação eritroide e obtenção de eritroblastos ortocromáticos tanto em progenitores isolados do sangue de cordão como na linhagem K562. Infelizmente, tivemos problemas na coloração das células do experimento E16 e não pudemos mostrar a acelerada taxa de diferenciação.

Esse mesmo gene possui um importante papel no silenciamento das globinas embrionárias atuando por ligação ao promotor dessas globinas. Há evidências de que isso também aconteça com o silenciamento da globina gama em ação cooperativa ao *BCL11A* (COHEN-BARAK et al., 2007; XU et al., 2010).

Apesar de os mecanismos moleculares da repressão de HbF ainda não terem sido completamente esclarecidos, pesquisadores observaram que o fator de transcrição *LRF/ZBTB7A* ocupa o gene da globina gama e mantém a densidade de nucleossomos necessária para o seu silenciamento. Tanto o *BCL11A* quanto o *LRF/ZBTB7A* atuam independentemente e juntamente com o complexo NuRD, reprimindo a expressão de globina fetal (MASUDA et al., 2016)

Norton e colaboradores mostraram que tanto o *BCL11A* quanto o *ZBTB7A* são alvos diretos do *KLF1* e que a repressão desse gene está associada à reativação da hemoglobina fetal. Os autores argumentam que esse pode ser um novo alvo para uma possível inibição farmacológica e reativação da hemoglobina fetal em pacientes com β -talassemia ou na doença falciforme (NORTON et al., 2017; ZHOU et al., 2010).

A **Tabela 5** mostra também, além das globinas estudadas, três genes (*BCL11A*, *ZBT7A* e *HBS1L-MYB*) importantes para a regulação da hemoglobina fetal (MASUDA et al., 2016) e por sua vez, para o entendimento do *switching* das globinas durante os estágios da diferenciação eritroide. Para avaliar a rede de interações proteína-proteína, incluindo diretas (físicas), como indiretas (função) e entre as globinas e as proteínas, utilizamos o banco de dados *STRING* v10 (SZKLARCZYK et al., 2015) e a rede formada está evidenciada na **Figura 20**. A proteína KLF1 também mostrou-se um poderoso ativador eritroide e na regulação da expressão de hemoglobina fetal (WIENERT et al., 2017) e será adicionada em experimentos futuros.

Nosso estudo mostrou (**Figura 23**) que, apesar da diferença entre as amostras estudadas, houve um padrão temporal de expressão gênica de globinas e reguladores do *switching* de globinas, de modo que células no dia zero da segunda fase de diferenciação foram agrupados juntos, o mesmo aconteceu para o dia quatro. Não houve agrupamento entre os dias 8 e 12 da diferenciação provavelmente em decorrência da diferença de graus de diferenciação terminal nas amostras estudadas (GIARRATANA et al., 2011).

A complexidade do *switching* de globinas tem sido o alvo de múltiplos estudos e reuniões científicas internacionais realizadas há mais de 40 anos, apesar disso ainda não há consenso sobre os mecanismos exatos de sua regulação. Atualmente, a maior parte dos grupos de pesquisas utilizam abordagens multi-ômicas para investigar os pormenores da diferenciação eritroide terminal e *switching* de globinas. Houve grande aprendizado com estudos genômicos de associação, no entanto, eles não são suficientes para abordar tal assunto. Estudos que combinem análises genômicas, transcriptômicas, proteômicas e epigenômicas são formas mais completas para entender a dinâmica temporal da diferenciação eritroide e *switching* de globinas.

Estudos em modelos como os utilizados neste trabalho podem ser de grande valia para auxiliar no esclarecimento de mecanismos específicos da diferenciação eritroide e *switching* de globinas, mesmo não representando o problema em toda sua complexidade. Dessa forma, protocolos de proteômica dirigida bem estabelecidos podem auxiliar no refinamento da compreensão da regulação do *switching* de globinas e na avaliação da reprodutibilidade metodológica de tais modelos de diferenciação *in vitro*.

Conclusões

6 CONCLUSÕES

Este trabalho padronizou e implementou, no Hemocentro de Ribeirão Preto, um protocolo de diferenciação eritroide *in vitro* a partir de progenitores CD34⁺ e sua caracterização morfológica e imunofenotípica. Além de desenvolver um método semiquantitativo de proteômica dirigida para monitorar o perfil e *switching* de globinas em amostras clínicas ou durante a diferenciação hematopoética e eritroide *in vitro* a partir de iPSC e de progenitores eritroides.

- O método de diferenciação *in vitro* de iPSC apresentou baixa eficiência na geração de progenitores eritroides, no entanto, apresentou marcadores imunofenotípicos dessa diferenciação e expressão gênica de globinas.
- O protocolo de diferenciação *in vitro* de progenitores CD34⁺ mostrou-se um modelo bastante útil no estudo da diferenciação eritroide terminal e da regulação do *switching* de globinas.
- O método semiquantitativo de proteômica dirigida foi eficiente e mais sensível que o HPLC na discriminação das globinas fetais e adultas presentes nas amostras de pacientes com doença falciforme e indivíduos controles. O método ainda precisa ser refinado para as globinas embrionárias.
- A diferenciação da linhagem K562 mostrou-se uma fonte alternativa de globinas embrionárias.

Referências
Bibliográficas

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBESIANO, E. et al. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone. **Blood**, v. 102, n. 9, p. 3333–9, 1 nov. 2003.
- ANGELUCCI, E. et al. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. **Haematologica**, v. 99, n. 5, p. 811–820, 1 maio 2014.
- 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.
- ANTONIOU, M. Induction of Erythroid-Specific Expression in Murine Erythroleukemia (MEL) Cell Lines. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 7, p. 421–34, 1991.
- 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. 1065–76, maio 2016.
- BAIOCHI, E.; NARDOZZA, L. M. M. Aloimunização. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v. 31, n. 6, p. 311–9, jun. 2009.
- BAJPAI, R. et al. Efficient propagation of single cells accutase-dissociated human embryonic stem cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 5, p. 818–827, maio 2008.
- BARMINKO, J.; REINHOLT, B.; BARON, M. H. Development and differentiation of the erythroid lineage in mammals. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 58, n. 4, p. 18–29, maio 2016.
- BASTOS, R. N.; VOLLOCH, Z.; AVIV, H. Messenger RNA population analysis during erythroid differentiation: A kinetical approach. **Journal of Molecular Biology**, v. 110, n. 2, p. 191–203, fev. 1977.
- BAUER, D. E. et al. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. **Science**, v. 342, n. 6155, p. 253–257, 2013.
- BEERS, J. et al. Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. **Nature Protocols**, v. 7, n. 11, p. 2029–2040, 25 nov. 2012.
- BEUTLER, E. Disorders of Hemoglobin. In: HARRISON, TINSLEY RANDOLPH, FAUCI, A. S. (Ed.). **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 14. ed. [s.l.] McGraw-Hill, 1997. p. 1406.
- BHATIA, M.; WALTERS, M. C. Hematopoietic cell transplantation for thalassemia and sickle cell disease: past, present and future. **Bone Marrow Transplantation**, v. 41, n. 2, p. 109–117, 3 jan. 2008.
- BOFFA, L. C. et al. Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. **The Journal of biological chemistry**, v. 253, n. 10, p. 3364–6, 25 maio 1978.
- BOLAÑOS-MEADE, J.; BRODSKY, R. A. Blood and marrow transplantation for sickle cell disease: Is less more? **Blood Reviews**, v. 28, n. 6, p. 243–248, nov. 2014.

- BOYER, L. A. et al. Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947–956, set. 2005.
- BRASIL. **Manual de normas Técnicas e rotinas operacionais do programa nacional de triagem neonatal - Programa Nacional de Triagem Neonatal**. 1. ed. Brasília: Ministério da saúde: Editora MS, 2002.
- CANTU, C. et al. Sox6 enhances erythroid differentiation in human erythroid progenitors. **Blood**, v. 117, n. 13, p. 3669–3679, 31 mar. 2011.
- CANVER, M. C. et al. BCL11A enhancer dissection by Cas9-mediated in situ saturating mutagenesis. **Nature**, v. 527, n. 7577, p. 192–197, 2015.
- CAPPELLI, B. et al. Sickle cell disease: an international survey of results of HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v. 129, n. 11, p. 1548–1556, 2016.
- CATELLI, L. F. **Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (hiPSCs) a partir de células somáticas de indivíduos com fenótipo de interesse para transfusões sanguíneas**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 14 nov. 2017.
- CHANDRAKASAN, S.; KAMAT, D. An Overview of Hemoglobinopathies and the Interpretation of Newborn Screening Results. **Pediatric Annals**, v. 42, n. 12, p. 502–508, 1 dez. 2013.
- CHATTERJEE, I. et al. Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell Culture Methods and Induction of Differentiation into Endothelial Cells. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1357, p. 311–27, 2016.
- 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. 518–29, mar. 2011.
- CHOU, Y. et al. Pharmacological Induction of Human Fetal Globin Gene in Hydroxyurea-Resistant Primary Adult Erythroid Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 35, n. 14, p. 2541–2553, 15 jul. 2015.
- COHEN-BARAK, O. et al. Stem cell transplantation demonstrates that Sox6 represses epsilon y globin expression in definitive erythropoiesis of adult mice. **Experimental hematology**, v. 35, n. 3, p. 358–67, mar. 2007.
- COKIC, V. P. et al. Hydroxyurea induces fetal hemoglobin by the nitric oxide-dependent activation of soluble guanylyl cyclase. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 2, p. 231–239, 15 jan. 2003.
- COSTA, E. DE B. O. **Eficiente produção *in vitro* de células-tronco/progenitoras hematopoéticas a partir da diferenciação de células-tronco embrionárias humanas**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 30 mar. 2017.
- CRISAN, M. et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 3, p. 301–313, set. 2008.
- CUNHA, L. et al. Induced Pluripotent Stem Cell for the Study and Treatment of Sickle Cell Anemia. **Stem cells international**, v. 2017, p. 7492914, 26 jul. 2017.
- D'HAESELEER, P. How does gene expression clustering work? **Nature Biotechnology**, v. 23, n. 12, p. 1499–1501, dez. 2005.
- DESIERE, F. The PeptideAtlas project. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D655–D658, 1 jan.

2006.

DIAS, J. et al. Generation of Red Blood Cells from Human Induced Pluripotent Stem Cells. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 9, p. 1639–1647, set. 2011.

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.

EGERTSON, J. D. et al. Multiplexed peptide analysis using data-independent acquisition and Skyline. **Nature protocols**, v. 10, n. 6, p. 887–903, jun. 2015.

FERREIRA, A. F. et al. Hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells – considering the role of microRNA as a cell differentiation regulator. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 4, p. jcs203018, 15 fev. 2018.

FERREIRA, A. R. **Avaliação do perfil de expressão gênica de globinas na diferenciação hematopoética in vitro**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), 2015.

FISCHER, B. et al. A complete workflow for the differentiation and the dissociation of hiPSC-derived cardiospheres. **Stem Cell Research**, v. 32, n. August, p. 65–72, out. 2018.

FREYSSINIER et al. Purification, amplification and characterization of a population of human erythroid progenitors. **British Journal of Haematology**, v. 106, n. 4, p. 912–922, set. 1999.

GAUTIER, E.-F. et al. Comprehensive Proteomic Analysis of Human Erythropoiesis. **Cell Reports**, v. 16, n. 5, p. 1470–1484, ago. 2016.

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

GRASSI, M. L. et al. Proteomic analysis of ovarian cancer cells during epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by epidermal growth factor (EGF) reveals mechanisms of cell cycle control. **Journal of proteomics**, v. 151, p. 2–11, 16 jan. 2017.

HAYNES, C. A. et al. HPLC–ESI-MS/MS analysis of hemoglobin peptides in tryptic digests of dried-blood spot extracts detects HbS, HbC, HbD, HbE, HbO-Arab, and HbG-Philadelphia mutations. **Clinica Chimica Acta**, v. 424, p. 191–200, set. 2013.

HERRICK, J. B. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. **Archives of Internal Medicine**, v. VI, n. 5, p. 517, 1 nov. 1910.

HSIEH, M. M. et al. Nonmyeloablative HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for severe sickle cell phenotype. **JAMA**, v. 312, n. 1, p. 48–56, 2 jul. 2014.

HU, J. et al. Isolation and functional characterization of human erythroblasts at distinct stages: implications for understanding of normal and disordered erythropoiesis in vivo. **Blood**, v. 121, n. 16, p. 3246–3253, 18 abr. 2013.

HUANG, X. et al. Production of Gene-Corrected Adult Beta Globin Protein in Human Erythrocytes Differentiated from Patient iPSCs After Genome Editing of the Sickle Point Mutation. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 33, n. 5, p. 1470–9, maio 2015.

INGRAM, V. M. A Specific Chemical Difference Between the Globins of Normal Human and Sickle-Cell Anæmia Hæmoglobin. **Nature**, v. 178, n. 4537, p. 792–794, out. 1956.

- IVANOV, A. et al. Identification of the niche and phenotype of the first human hematopoietic stem cells. **Stem cell reports**, v. 2, n. 4, p. 449–56, 8 abr. 2014.
- KAMAO, H. et al. Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Sheets Aiming for Clinical Application. **Stem Cell Reports**, v. 2, n. 2, p. 205–218, fev. 2014.
- KASSEBAUM, N. J. et al. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 315 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE), 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet**, v. 388, n. 10053, p. 1603–1658, 8 out. 2016.
- KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 18010, 15 jun. 2018.
- KATSANTONI, E. Omics Studies in Hemoglobinopathies. **Molecular Diagnosis and Therapy**, v. 23, n. 2, p. 223–234, 2019.
- KISSA, K.; HERBOMEL, P. Blood stem cells emerge from aortic endothelium by a novel type of cell transition. **Nature**, v. 464, n. 7285, p. 112–115, 14 mar. 2010.
- KODIPPILI, G. C. et al. Analysis of the kinetics of band 3 diffusion in human erythroblasts during assembly of the erythrocyte membrane skeleton. **British journal of haematology**, v. 150, n. 5, p. 592–600, set. 2010.
- KROKHIN, O. V. Sequence-specific retention calculator. Algorithm for peptide retention prediction in ion-pair RP-HPLC: application to 300- and 100-Å pore size C18 sorbents. **Analytical chemistry**, v. 78, n. 22, p. 7785–95, 15 nov. 2006.
- KUBISTA, M.; SINDELKA, R. The Prime Technique. **G.I.T. Laboratory Journal**, v. 9–10, p. 33–35, 2007.
- KUNDAJE, A. et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. **Nature**, v. 518, n. 7539, p. 317–330, 18 fev. 2015.
- KURITA, R. et al. Establishment of Immortalized Human Erythroid Progenitor Cell Lines Able to Produce Enucleated Red Blood Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e59890, 22 mar. 2013.
- LI, J. et al. Isolation and transcriptome analyses of human erythroid progenitors: BFU-E and CFU-E. **Blood**, v. 124, n. 24, p. 3636–45, 4 dez. 2014.
- LIDONNICI, M. R. et al. Plerixafor and G-CSF combination mobilizes hematopoietic stem and progenitors cells with a distinct transcriptional profile and a reduced in vivo homing capacity compared to plerixafor alone. **Haematologica**, v. 102, n. 4, p. e120–e124, 2017.
- LOKEN, M. R. et al. Flow cytometric analysis of human bone marrow: I. Normal erythroid development. **Blood**, v. 69, n. 1, p. 255–63, jan. 1987.
- LUDWIG, L. S. et al. Transcriptional States and Chromatin Accessibility Underlying Human Erythropoiesis. **Cell Reports**, v. 27, n. 11, p. 3228–3240.e7, jun. 2019.
- MACLEAN, B. et al. Skyline: an open source document editor for creating and analyzing targeted proteomics experiments. **Bioinformatics**, v. 26, n. 7, p. 966–968, 1 abr. 2010.
- MAEDA, T. et al. LRF is an essential downstream target of GATA1 in erythroid development and regulates BIM-dependent apoptosis. **Developmental cell**, v. 17, n. 4, p. 527–40, out. 2009.

- MAKIS, A. et al. 2017 Clinical trials update in new treatments of β -thalassemia. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 11, p. 1135–1145, nov. 2016.
- MANKELOW, T. J. et al. Autophagic vesicles on mature human reticulocytes explain phosphatidylserine-positive red cells in sickle cell disease. **Blood**, v. 126, n. 15, p. 1831–1834, 8 out. 2015.
- MASUDA, T. et al. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin. **Science**, v. 351, n. 6270, p. 285–289, 15 jan. 2016.
- MIGLIACCIO, G. et al. In Vitro Mass Production of Human Erythroid Cells from the Blood of Normal Donors and of Thalassemic Patients. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 28, n. 2, p. 169–180, mar. 2002.
- MODELL, B. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 2008, n. 6, p. 480–487, 1 jun. 2008.
- NG, E. S. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. **Blood**, v. 106, n. 5, p. 1601–1603, 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. 768–76, 2008a.
- NG, E. S. et al. Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells as Spin Embryoid Bodies and a Description of the Hematopoietic Blast Colony Forming Assay. In: **Current Protocols in Stem Cell Biology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008b. p. 1–23.
- NORTON, L. J. et al. KLF1 directly activates expression of the novel fetal globin repressor ZBTB7A/LRF in erythroid cells. **Blood Advances**, v. 1, n. 11, p. 685–692, 25 abr. 2017.
- OCHI, K. et al. Multicolor Staining of Globin Subtypes Reveals Impaired Globin Switching During Erythropoiesis in Human Pluripotent Stem Cells. **STEM CELLS Translational Medicine**, v. 3, n. 7, p. 792–800, jul. 2014.
- OLIVIER, E. N. et al. High-Efficiency Serum-Free Feeder-Free Erythroid Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Using Small Molecules. **Stem cells translational medicine**, v. 5, n. 10, p. 1394–1405, out. 2016.
- ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Emerging Genetic Therapy for Sickle Cell Disease. **Annual Review of Medicine**, v. 70, n. 1, p. 257–271, 27 jan. 2019.
- ORKIN, S. H.; REILLY, P. Paying for future success in gene therapy. **Science**, v. 352, n. 6289, p. 1059–1061, 27 maio 2016.
- PAES, B. **Geração de célulastronco/progenitoras hematopoéticas e progenitores eritroides a partir de células-tronco de pluripotência induzida derivadas de pacientes com anemia falciforme**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 15 fev. 2019.
- PAES, B. C. M. F. et al. Ten years of iPSC: clinical potential and advances in vitro hematopoietic differentiation. **Cell Biology and Toxicology**, v. 33, n. 3, p. 233–250, 30 jun. 2017.
- PAIKARI, A.; SHEEHAN, V. A. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**, v. 180, n. 2, p. 189–200, 2018.

- PAULING, L.; ITANO, H. A. Sick cell anemia, a molecular disease. **Science (New York, N.Y.)**, v. 109, n. 2835, p. 443, 29 abr. 1949.
- PERKINS, A. et al. Krüppeling erythropoiesis: an unexpected broad spectrum of human red blood cell disorders due to KLF1 variants. **Blood**, v. 127, n. 15, p. 1856–62, 14 abr. 2016.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e – 45, 1 maio 2001.
- PIATON, E. et al. Recommandations techniques et règles de bonne pratique pour la coloration de May-Grünwald-Giemsa : revue de la littérature et apport de l'assurance qualité. **Annales de Pathologie**, v. 35, n. 4, p. 294–305, ago. 2015.
- PIEL, F. B. et al. Global epidemiology of sickle haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. **The Lancet**, v. 381, n. 9861, p. 142–151, jan. 2013.
- PLATT, O. S. et al. Hydroxyurea enhances fetal hemoglobin production in sickle cell anemia. **The Journal of clinical investigation**, v. 74, n. 2, p. 652–6, ago. 1984.
- 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.
- RAFII, S. et al. Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. **Blood**, v. 121, n. 5, p. 770–80, 31 jan. 2013.
- REIS, L. C. J. **Geração de células de pluripotência induzida (iPS) humanas utilizando vetores lentivirais e determinação do perfil de integração lentiviral**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 28 nov. 2012.
- REIS, L. C. J. **Células-tronco pluripotentes induzidas para o estudo e tratamento da anemia falciforme**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 26 jul. 2017.
- RUMANNEY, M. B. et al. The Co-Inheritance of Alpha-Thalassemia and Sickle Cell Anemia Is Associated with Better Hematological Indices and Lower Consultations Rate in Cameroonian Patients and Could Improve Their Survival. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e100516, 30 jun. 2014.
- RUTHERFORD, T. et al. Embryonic erythroid differentiation in the human leukemic cell line K562. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 1, p. 348–52, 1 jan. 1981.
- SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927–3938, 15 nov. 2008.
- SEGAL, J. B. et al. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell disease. **Evidence report/technology assessment**, n. 165, p. 1–95, mar. 2008.
- SILVA-PINTO, A. et al. The Neonatal Screening Program in Brazil, Focus on Sickle Cell Disease (SCD). **International Journal of Neonatal Screening**, v. 5, n. 1, p. 11, 26 jan. 2019.
- SZKLARCZYK, D. et al. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D447–52, jan. 2015.
- TAKAYAMA, N. et al. Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors. **Blood**, v. 111, n. 11, p.

5298–5306, 1 jun. 2008.

TAYLOR, C. J. et al. Generating an iPSC Bank for HLA-Matched Tissue Transplantation Based on Known Donor and Recipient HLA Types. **Cell Stem Cell**, v. 11, n. 2, p. 147–152, ago. 2012.

THURMAN, W. G. et al. A phase I study of hydroxyurea. **Cancer chemotherapy reports**, v. 29, p. 103–7, maio 1963.

TRAKARNSANGA, K. et al. An immortalized adult human erythroid line facilitates sustainable and scalable generation of functional red cells. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 14750, 14 abr. 2017.

TURNER, M. et al. Toward the Development of a Global Induced Pluripotent Stem Cell Library. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 4, p. 382–384, out. 2013.

UCHIDA, N. et al. Efficient Generation of β -Globin-Expressing Erythroid Cells Using Stromal Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Sickle Cell Disease. **STEM CELLS**, v. 35, n. 3, p. 586–596, mar. 2017.

UCHIDA, N. et al. High-level embryonic globin production with efficient erythroid differentiation from a K562 erythroleukemia cell line. **Experimental hematology**, v. 62, p. 7–16.e1, jun. 2018.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic acids research**, v. 47, n. D1, p. D506–D515, 8 jan. 2019.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 18 jun. 2002.

VEGIOPOULOS, A. Coordination of erythropoiesis by the transcription factor c-Myb. **Blood**, v. 107, n. 12, p. 4703–4710, 15 jun. 2006.

VICHINSKY, E. P. et al. Alloimmunization in Sickle Cell Anemia and Transfusion of Racially Unmatched Blood. **New England Journal of Medicine**, v. 322, n. 23, p. 1617–1621, 7 jun. 1990.

VINJAMUR, D. S.; BAUER, D. E.; ORKIN, S. H. Recent progress in understanding and manipulating haemoglobin switching for the haemoglobinopathies. **British journal of haematology**, v. 180, n. 5, p. 630–643, mar. 2018.

VOS, T. et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **The Lancet**, v. 386, n. 9995, p. 743–800, 22 ago. 2015.

WALTERS, M. C. et al. Barriers to bone marrow transplantation for sickle cell anemia. **Biology of blood and marrow transplantation: journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 2, n. 2, p. 100–4, 8 maio 1996.

WATANABE, K. et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. **Nature biotechnology**, v. 25, n. 6, p. 681–6, 27 jun. 2007.

WIENERT, B. et al. KLF1 drives the expression of fetal hemoglobin in British HPFH. **Blood**, v. 130, n. 6, p. 803–807, 2017.

WILLIAMS, T. N.; WEATHERALL, D. J. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 2, n. 9, p. a011692, 1 set. 2012.

- WOOD, W. G. et al. Switch from foetal to adult haemoglobin synthesis in normal and hypophysectomised sheep. **Nature**, v. 264, n. 5588, p. 799–801, dez. 1976.
- XU, J. et al. Transcriptional silencing of {gamma}-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. **Genes & development**, v. 24, n. 8, p. 783–98, 15 abr. 2010.
- XU, J. et al. Corepressor-dependent silencing of fetal hemoglobin expression by BCL11A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 16, p. 6518–6523, 2013.
- 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.
- YU, H.-K. et al. Characterization of CD45-/CD31+/CD105+ Circulating Cells in the Peripheral Blood of Patients with Gynecologic Malignancies. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 19, p. 5340–5350, 1 out. 2013.
- ZAIDMAN, I. et al. Allogeneic Stem Cell Transplantation in Congenital Hemoglobinopathies Using a Tailored Busulfan-Based Conditioning Regimen: Single-Center Experience. **Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation**, v. 22, n. 6, p. 1043–1048, jun. 2016.
- ZHOU, D. et al. KLF1 regulates BCL11A expression and γ - to β -globin gene switching. **Nature Genetics**, v. 42, n. 9, p. 742–744, 1 set. 2010.

Anexos

8 ANEXOS

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

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

Ofício Nº 3455/2018
CEP/MGV

RIBEIRÃO PRETO, 06 DE DEZEMBRO DE 2018

PREZADOS SENHORES,

O TRABALHO INTITULADO “ESTUDO DE PREGENITORES ERITROIDES E RETICULÓCITOS HUMANOS NA ANEMIA FALCIFORME”, FOI ANALISADO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SUA 482ª REUNIÃO ORDINÁRIA, REALIZADA EM 03/12/2018 E ENQUADRADO NA CATEGORIA: **APROVADO**, BEM COMO O TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, DE ACORDO COM O PROCESSO HCRP Nº 11395/2018.

DE ACORDO COM CARTA CIRCULAR Nº 003/2011/CONEP/CNS, DATADA DE 21/03/2011, O SUJEITO DE PESQUISA OU SEU REPRESENTANTE, QUANDO FOR O CASO, DEVERÁ RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APONDO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA DO REFERIDO TERMO; O PESQUISADOR RESPONSÁVEL DEVERÁ DA MESMA FORMA, RUBRICAR TODAS AS FOLHAS DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – TCLE – APONDO SUA ASSINATURA NA ÚLTIMA PÁGINA DO REFERIDO TERMO.

ESTE COMITÊ SEGUE INTEGRALMENTE A RESOLUÇÃO Nº 466/12 CNS/MS.
LEMBRAMOS QUE DEVEM SER APRESENTADOS A ESTE CEP, O RELATÓRIO PARCIAL E O RELATÓRIO FINAL DA PESQUISA.
ATENCIOSAMENTE.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
COORDENADORA DO COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA DO HCRP E DA FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
PROFª. DRª. SIMONE KASHIMA HADDAD
JONATHAN MILHOMENS DOS SANTOS LIMA (ORIENTANDO)
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto