**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA CLÍNICA,
CÉLULAS-TRONCO E TERAPIA CELULAR**

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

MARCOS ROBERTO PEDRON OLTRAMARI

**Efeito do derivativo de purina SR1 e do derivativo pirimidoindólico
UM171 na expansão de células-tronco e progenitoras hematopoéticas
na anemia aplástica adquirida**

Ribeirão Preto

2020

MARCOS ROBERTO PEDRON OLTRAMARI

**Efeito do derivativo de purina SR1 e do derivativo pirimidoindólico UM171
na expansão de células-tronco e progenitoras hematopoéticas
na anemia aplástica adquirida**

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

Área de Concentração: Células-tronco e Terapia
Celular

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado
De Saloma Rodrigues

Ribeirão Preto

2020

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Oltramari, Marcos Roberto Pedron.

Efeito do derivativo de purina SR1 e do derivativo pirimidoindólico UM171 na expansão de células-tronco hematopoéticas na anemia aplástica adquirida. Ribeirão Preto, 2020.

109 p. : il.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. Área de concentração: Células-tronco e Terapia Celular.

Orientador: Rodrigues, Rodrigo do Tocantins Calado De S.

1. Célula-tronco hematopoética. 2. SR1. 3. UM171. 4. Anemia aplástica.

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com apoio das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP)
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC)

Nome: OLTRAMARI, Marcos Roberto Pedron

Título: Efeito do derivativo de purina SR1 e do derivativo pirimidoindólico UM171 na expansão de células-tronco hematopoéticas na anemia aplástica adquirida.

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

Área de Concentração: Células-tronco e Terapia Celular

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*“Deus ao mar o perigo e o abismo deu,
Mas nele é que espelhou o céu”.*

Fernando Pessoa

Aos meus pais, Altamir e Arlete, com amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu guia e fortaleza em todos os momentos.

A todos os meus pacientes, de quem recebi toda a confiança e para quem entrego toda minha dedicação.

Ao meu orientador Rodrigo Tocantins Calado, agradeço a oportunidade, os incontáveis ensinamentos e toda a confiança em mim depositada. Ao seu lado, aprendi a ser mais paciente e a lidar com serenidade com os erros e obstáculos, procurando neles oportunidades de crescimento. Ao longo de 8 anos de convivência, minha admiração por sua competência, ética e dedicação só aumentaram.

Aos meus professores Roberto Passeto Falcão, Belinda Pinto Simões, Eduardo Rego e Luciana Corrêa Oliveira de Oliveira, que, junto de meu orientador, ensinaram-me a arte da Hematologia.

Aos meus professores Antônio Pazin Filho, Paulo Louzada Júnior e Sonir Roberto Rauber Antonini, que transformaram meu interesse por Clínica Médica em paixão.

Ao meu professor de Português, Literatura e Filosofia, Antônio Fernando Costa, que me ofereceu as principais ferramentas científicas, filosóficas e morais, sobre as quais eu pude organizar todo o conhecimento posteriormente adquirido.

A Maria Florência Tellechea e Bárbara Santana-Lemos, pelo incansável auxílio nas etapas mais penosas deste estudo. Seus ensinamentos de metodologia em cultivo celular foram essenciais para que eu pudesse trabalhar com confiança na bancada.

A Maristela Orellana, Priscila Scheucher, Josiane Schiavinato, Fernanda Borges da Silva, Patrícia de Cássia Ruy, Manuela Karloh, Amélia Góes Araújo, Rita de Cássia dos Santos e Virgínia Wagatsuma, que não mediram esforços para me ajudar nas diversas etapas do projeto.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Tatiana Dias Marconi Monteiro, André Guedes Vieira e Fernanda Bion, com quem tive a oportunidade e orgulho de construir uma linda equipe de transplante de medula óssea.

Aos meus queridos amigos Losaum, Arnold, Queca, Ziotti, Paulão e Daniel, meus irmãos de coração, pelo apoio inestimável.

A minha irmã Paulinha, minha melhor amiga e maior inspiração. O seu exemplo foi o meu principal impulso para concluir este trabalho.

A Camila, pelo amor incondicional. Compartilhar a vida contigo é meu maior privilégio.

Aos meus pais, minhas maiores referências e a quem dedico este trabalho, agradeço sinceramente por tudo.

RESUMO

OLTRAMARI, M. R. P. **Efeito do derivativo de purina SR1 e do derivativo pirimidoindólico UM171 na expansão de células-tronco hematopoéticas na anemia aplástica adquirida.** 2020. 109f. Tese de Doutorado - Faculdade Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto-SP, 2020.

A anemia aplástica adquirida (AAa) corresponde a uma doença caracterizada por falência da medula óssea devido à destruição imune das células-tronco e progenitoras hematopoéticas (CTPH). O tratamento de pacientes com esta enfermidade persiste desafiador devido tanto às complicações agudas da pancitopenia, quanto à história natural da doença e efeitos adversos das terapias vigentes. O transplante autólogo de células-tronco e progenitoras hematopoéticas (TCTH autólogo) expandidas *in vitro* poderia melhorar a resposta ao tratamento imunossupressor, adicionando baixa toxicidade ao mesmo. As condições usuais de cultivo para a expansão de CTPH *in vitro* promovem proliferação expressiva, porém acompanhada por aumento significativo da diferenciação celular. Destacam-se duas drogas (derivativo de purina SR1 e derivativo pirimidoindólico UM171) capazes de expandir células CD34⁺ humanas *in vitro*, com preservação das características de célula-tronco e indução mínima de diferenciação. Este estudo objetivou avaliar os efeitos de SR1 e UM171 em células CD34⁺ expandidas *in vitro* provenientes de amostras de aspirado de medula óssea de pacientes com AAa sobre a expressão imunofenotípica, potencial de formação de colônias, comprimento telomérico, desenvolvimento de alterações citogenéticas e perfil de expressão gênica. Para isso, utilizaram-se 22 amostras de aspirado de medula óssea: cinco, provenientes de indivíduos saudáveis (grupo controle); e dezessete, provenientes de pacientes portadores de AAa grave (grupo AA). Ao contrário de SR1, UM171 mostrou-se capaz, em ambos os grupos, de expandir as células CD34⁺, conter a diferenciação celular e, em especial, reter a expressão dos fenótipos mais primitivos Thy⁻CD49f⁺ e Thy⁺CD49f⁺, embora com maior potencial proliferativo em células do grupo controle. Alterações citogenéticas clonais, da expressão de genes relacionados ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas e encurtamento telomérico excessivo não foram observados com exposição a SR1 nem UM171. Este estudo demonstrou a propriedade de UM171 conter a diferenciação de células CD34⁺ expandidas *in vitro* de indivíduos com AAa sem acarretar transformação aberrante, conferindo segurança à translação destes resultados à pesquisa clínica.

Palavras-chave: Célula-tronco hematopoética. SR1. UM171. Anemia aplástica.

ABSTRACT

OLTRAMARI, M. R. P. **Effect of purine derivative SR1 and pyrimido-indole derivative UM171 in the expansion of hematopoietic stem and progenitor cells in acquired aplastic anemia.** 2020. 109pg. Thesis (Doctorate) - Ribeirão Preto Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto- SP, 2020.

Acquired aplastic anemia (aAA) is a disease characterized by bone marrow failure due to an immune destruction of hematopoietic stem and progenitor cells (HSPC). The treatment continues to be a challenge, not only because of the acute complications of pancytopenia but also to the natural history of the disease and adverse effects of the existing therapies. Autologous transplantation of *in vitro*-expanded hematopoietic stem and progenitor cells (autologous HSCT) may improve the response to immunosuppressive treatment, making it less toxic. The usual culture conditions for *in vitro* HSPC expansion promotes substantial proliferation, but accompanied by a significant increase in cell differentiation. Two small molecules, SR1 and UM171, stand out as being capable of expanding human CD34⁺ cells *in vitro*, preserving stemness with minimal differentiation. The aim of this study was to evaluate the effects of SR1 and UM171 in *in vitro*-expanded CD34⁺ cells from aAA-patient bone marrow aspirates, on immunophenotypic expression, colony forming potential, telomere length, cytogenetic and gene expression profile. To this end, 22 bone marrow aspirate specimens were used: five from healthy individuals (control group); and seventeen from severe aAA patients (group AA). In contrast to SR1, UM171 was capable, in both groups, of expanding CD34⁺ cells, suppressing cell differentiation and, in particular, retaining the expression of the more primitive phenotypes CD90⁺CD49f⁺ and CD90⁺CD49f⁺, although expansion effects were more pronounced in the control group. Excessive telomere shortening, clonal cytogenetic abnormalities, or altered transcriptomic profile of genes related to hematologic neoplasm development were not observed when cells were exposed to SR1 nor UM171. This study demonstrates UM171's property to suppress *in vitro*-expanded CD34⁺ cell differentiation from aAA patients, without inducing clonal transformation, thereby providing assurance to the translation of these results into clinical research.

Keywords: Hematopoietic stem cell. SR1. UM171. Aplastic anemia.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - anemia aplástica

AAa - anemia aplástica adquirida

ATG - globulina anti-timocítica (do inglês *anti-thymocyte globulin*)

BFU-E - unidade formadora de colônia eritroide precoce (do inglês *burst forming unit erythroid*)

c-MPL - proteína da leucemia mieloproliferativa (do inglês *myeloproliferative leukemia clade*)

cDNA - DNA complementar

CDC42 - proteína de controle de divisão celular 42 (do inglês *cell division control protein 42*)

CFU - unidade formadora de colônia (do inglês *colony forming unit*)

CFU-GEMM - unidade formadora de colônia granulócito-monócito-eritrócito-megacariócito (do inglês *colony forming unit granulocyte-erythrocyte-monocyte-megakaryocyte*)

CFU-GM - unidade formadora de colônia granulócito-monócito (do inglês *colony forming unit granulocyte-monocyte*)

CNV - variação no número de cópias (do inglês *copy number variation*)

CSA - ciclosporina

CTH - célula-tronco hematopoética

CTH-LD - célula-tronco hematopoética de longa duração

CTH-CD - célula-tronco hematopoética de curta duração

CTN - células totais nucleadas

CTPH - célula-tronco e progenitora hematopoética

DECH - doença do enxerto contra o hospedeiro

DMSO - dimetilsulfóxido

EPAG - eltrombopague

EPCR - receptor endotelial de proteína C (do inglês *endothelial protein C receptor*)

EPO - eritropoetina

FLT3L - ligante de tirosino-quinase 3 FMS relacionado (do inglês *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*)

G-CSF - fator estimulador de colônias de granulócitos (do inglês *granulocyte colony stimulating factor*)

HCFMRP-USP - Hospital da Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

HCT-CI - índice de comorbidades para o transplante de células-tronco hematopoéticas (do inglês *hematopoietic cell transplantation comorbidity index*)

HIF-1 α - fator induzível por hipóxia-1 alfa (do inglês *hypoxia-inducible factor-1 alpha*)

HIF-1 β - fator induzível por hipóxia-1 beta (do inglês *hypoxia-inducible factor-1 beta*)

HLA - antígeno leucocitário humano (do inglês *human leukocyte antigen*)

HPN - hemoglobinúria paroxística noturna

IFN- γ - interferon-gama (IFN- γ)

IL-6 - interleucina 6

LMA - leucemia mieloide aguda

MHC - complexo principal de histocompatibilidade (do inglês *major histocompatibility complex*)

NK - do inglês *natural killer*

PAR1 - receptor ativado por protease-1 (do inglês *protease activated receptor-1*)

PCR - reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PMP - progenitor multipotencial

PROCR - receptor de proteína C (do inglês *protein C receptor*)

ROS - espécies reativas de oxigênio (do inglês *reactive oxygen species*)

SCUP - sangue de cordão umbilical e placentário

SMD - síndrome mielodisplásica

SNP-A - do inglês *single nucleotide polymorphism array*

STAT3 - transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (do inglês *signal transducer and activator of transcription 3*)

TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido

TGF- β - fator de crescimento transformante- β (do inglês *transforming growth factor- β*)

TNF- α - fator de necrose tumoral alfa (do inglês *tumor necrosis factor- α*)

TPO - trombopoetina

TPO-R - receptor de trombopoetina

Treg - T regulatório

UFC - unidade formadora de colônia

6pLOH - perda de heterozigosidade do braço curto do cromossomo 6 (do inglês *6p loss of heterozygosity*)

7-AAD - 7-amino-actinomicina D

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mensuração da viabilidade celular de amostra do paciente AA6, antes da expansão em meio de cultivo. Nesta amostra 86,5% das células foram consideradas viáveis.43
- Figura 2 - Mensuração da pureza de células CD34⁺ de amostra do paciente AA6, após separação em coluna imunomagnética, antes da expansão em meio de cultivo. Nesta amostra 96,8% das células foram consideradas CD45⁺CD34⁺. 43
- Figura 3 - Painel imunofenotípico de amostra pré-expansão em meio de cultivo líquido do controle C1. 46
- Figura 4 - Comprimento telomérico ao diagnóstico dos pacientes incluídos no estudo em comparação à coorte de indivíduos saudáveis, de acordo com a idade. Todos os pacientes apresentavam comprimento telomérico acima do percentil 10, com exceção de AA4, com comprimento telomérico no percentil 7. 56
- Figura 5 - Número absoluto de células totais nucleadas (CTN), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais. A, grupo controle (n=5). B, grupo AA (n=11): B1, subgrupo AA-Rdx (n=5); B2, subgrupo AA-RP (n=3); B3, subgrupo AA-RC (n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 58
- Figura 6 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo controle, n=5). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 59
- Figura 7 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo AA, n=11). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 59
- Figura 8 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁻45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo controle, n=5). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 60
- Figura 9 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁻45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo AA, n=9). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 60
- Figura 10 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺7-10⁻45RA⁻135⁺ (A), CD34⁺38⁺7-10⁻45RA⁺135⁺ (B) e CD34⁺38⁺7-10⁻45RA⁻135⁻ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo controle, n=5). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 61
- Figura 11 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺7-10⁻45RA⁻135⁺ (A), CD34⁺38⁺7-10⁻45RA⁺135⁺ (B) e CD34⁺38⁺7-10⁻45RA⁻135⁻ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo AA, n=9). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 61

- Figura 12 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA Rdx, n=5). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1..... 62
- Figura 13 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA RP, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1..... 62
- Figura 14 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA RC, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 62
- Figura 15 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁻45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA-Rdx, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1..... 63
- Figura 16 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁻45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA-RP, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1..... 63
- Figura 17 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁻45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA-RC, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1..... 63
- Figura 18 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺7⁻10⁻45RA⁺135⁺ (A), CD34⁺38⁺7⁻10⁻45RA⁺135⁺ (B) e CD34⁺38⁺7⁻10⁻45RA⁺135⁻ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA Rdx, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 64
- Figura 19 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺7⁻10⁻45RA⁺135⁺ (A), CD34⁺38⁺7⁻10⁻45RA⁺135⁺ (B) e CD34⁺38⁺7⁻10⁻45RA⁺135⁻ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA RP, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1..... 64
- Figura 20 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺7⁻10⁻45RA⁺135⁺ (A), CD34⁺38⁺7⁻10⁻45RA⁺135⁺ (B) e CD34⁺38⁺7⁻10⁻45RA⁺135⁻ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA RC, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1..... 64
- Figura 21 - Análise imunofenotípica comparativa do compartimento tronco entre os subgrupos, após duas semanas de cultivo em meio líquido de amostra do paciente AA5. 65
- Figura 22 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (grupo controle, n=5). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1. 66

Figura 23 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (grupo AA, n=9). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1. 66

Figura 24 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (subgrupo AA Rdx, n=4). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1. 67

Figura 25 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (subgrupo AA RP, n=2). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1. 67

Figura 26 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (subgrupo AA RC, n=3). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1. 67

Figura 27 - Fotomicrografias de unidades formadoras de colônia BFU-E (1), CFU-GM (2) e CFU-GEMM (3) originadas de semeadura de células CD34⁺ expandidas em meio de cultivo líquido por uma semana na presença de SR1 e UM171 (subgrupo COMBI), derivadas de amostras de medula óssea de C1 (A), AA2-Rdx (B) e AA4-RC (C). Aumento de 40x. 68

Figura 28 - Imagem representativa da análise citogenética convencional e por SNP-A do caso AA7, subgrupo SR1, demonstrando um cariótipo masculino normal. O sinal localizado no topo dos painéis representa o valor do número de cópias (NC). E o localizado na base, os dados do genótipo ou frequência dos alelos A e B. 69

Figura 29 - Imagem representativa ampliada da análise por SNP-A do cromossomo 4 do caso AA7, subgrupo SR1, sem alterações detectadas. O sinal no topo do painel representa o número de cópias (NC). E o localizado na base, os dados do genótipo ou frequência dos alelos A e B. 70

Figura 30 - Delta: diferença de comprimento telomérico medido pela razão T/S por qPCR entre o valor basal pré-expansão e os valores após duas semanas de expansão em meio de cultivo líquido (n=3). Final: comprimento telomérico medido pela razão T/S por qPCR dos valores após duas semanas de expansão em meio de cultivo líquido (n=3). 70

Figura 31 - Interação de proteínas com expressão significativamente alterada pela exposição a SR1 (A) e UM171 (B) em relação a DMSO. Destacam-se a hipoexpressão de CYP2J2 e CYP4F2 mediada por SR1; e a hiperexpressão de PROCR, por UM171. 71

Figura 32 - Mapa de calor mostrando a expressão de genes alvo do receptor de aril-hidrocarboneto. Nota-se padrão de inibição de SR1 sobre estes genes. Escala de expressão em *log 2-fold change*. 71

Figura 33 - Mapa de calor mostrando a expressão de genes relacionados à diferenciação das linhagens megacariocítica, eritroide e granulocítica-monocítica. Escala de expressão em *log 2-fold change*.72

Figura 34 - Mapa de calor mostrando a expressão de genes relacionados ao complexo da telomerase. Escala de expressão em *log 2-fold change*. 73

Figura 35 - Mapa de calor mostrando a expressão de genes associados ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas. Escala de expressão em *log 2-fold change*. 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas dos grupos experimentais. N/A, não se aplica. #, estudo não realizado. *, paciente portador de anemia aplástica adquirida recém-diagnosticado. ¶, amostras coletadas do mesmo indivíduo em diferentes momentos do seu seguimento. HPN: hemoglobinúria paroxística noturna. 57

Tabela 2 - Estatística descritiva dos grupos experimentais. DP, desvio padrão. N/A, não se aplica..... 58

Tabela 3 - Análise citogenética convencional comparativa entre os subgrupos, após duas semanas de cultivo em meio líquido, das amostras dos pacientes AA7, AA8, AA10 e AA11. 68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Biologia da célula-tronco hematopoética.....	20
1.2 Falência da célula-tronco hematopoética: anemia aplástica	24
1.3 Expansão de células-tronco hematopoéticas <i>in vitro</i>	33
1.3.1 SR1	33
1.3.2 UM171.....	36
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	41
3.1 Definição dos grupos experimentais	41
3.2 Considerações éticas	42
3.3 Coleta e armazenamento de aspirado de medula óssea	42
3.4 Purificação e cultura de células CD34⁺	42
3.5 Análise imunofenotípica	44
3.6 Ensaio de formação de colônias.....	45
3.7 Citogenética Convencional.....	47
3.8 <i>Single Nucleotide Polymorphism Array</i> (SNP-A)	47
3.9 Mensuração do comprimento telomérico	48
3.10 Sequenciamento do RNA (RNA-seq)	49
3.11 Análise estatística.....	51
4. RESULTADOS	52
4.1 Análise imunofenotípica	52
4.2 Ensaio de formação de colônias.....	54
4.3 Avaliação citogenética e SNP-A.....	54
4.4 Comprimento telomérico	55
4.5 RNA-seq.....	55
5. DISCUSSÃO	75
6. CONCLUSÃO.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
8. ANEXOS.....	100

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biologia da célula-tronco hematopoética

A célula-tronco hematopoética (CTH) é definida por sua capacidade de se diferenciar em todas as linhagens sanguíneas e por se autorrenovar, sustentando assim a hematopoese ao longo da vida de um organismo. Além disso, deve exercer estas funções a um nível clonal ou de célula única, de modo a se excluir o fato de que uma população com expressão homogênea de marcadores imunofenotípicos seja funcionalmente heterogênea e composta por células progenitoras em diferentes estágios de maturação. Apenas uma em 1×10^6 de células de medula óssea humana é considerada célula-tronco hematopoética transplantável (WANG; DOEDENS; DICK, 1997), e esta raridade, bem como a dificuldade de purificá-la do total de células diferenciadas são importantes obstáculos no estudo de sua biologia (DOULATOV et al., 2012).

O avanço no desenvolvimento de modelos de xenotransplante tem permitido o melhor isolamento e caracterização das CTH humanas nas duas últimas décadas. Em experimentos de transplante singênico em camundongos, células-tronco hematopoéticas de longa duração (CTH-LD) têm sido historicamente definidas por sua capacidade de manutenção da enxertia multilinhagem após doze semanas do transplante. Células capazes de gerar todas as linhagens mas com condição apenas transitória de enxertia são caracterizadas como células-tronco hematopoéticas de curta duração (CTH-CD) ou progenitores multipotenciais (PMP). Mesmo assim, o acompanhamento da enxertia por períodos mais prolongados tem revelado a existência de CTH intermediárias, que se extinguem entre três e seis meses pós-transplante, apresentando comportamento distinto de CTH-CD e CTH-LD (BENVENISTE et al., 2010).

A delimitação destes marcos temporais para CTH humanas em xenotransplante é ainda mais difícil. Isto porque, nesta modalidade, a produção de diferentes tipos celulares é temporalmente restrita. Eritroblastos, por exemplo, são encontrados na medula óssea apenas entre duas e quatro semanas após o transplante, habitualmente não persistindo depois; reconstituição tímica não é observada até doze semanas do transplante; e linfócitos T aparecem ainda mais tarde no sangue periférico. Por tudo isso, o período de 12 semanas adotado no passado para diferenciação da enxertia transitória da perene tem sido substituído por períodos mais longos, especialmente após o advento de modelos de xenotransplante mais robustos, que permitem o acompanhamento de autorrenovação e diferenciação multilinhagem de transplantes de célula única por até oito meses, definindo, desta forma, critérios mais estritos para enxertia de longa duração (GLIMM et al., 2001; NOTTA et al., 2011; DOULATOV et al., 2012).

A purificação de CTH humanas requer a detecção simultânea de vários marcadores imunofenotípicos. O antígeno de membrana CD34, expresso em menos de 5% de todas as células hematopoéticas, foi o primeiro marcador descoberto a enriquecer células-tronco e progenitoras hematopoéticas (CTPH) (CIVIN et al., 1984), fato confirmado em inúmeros estudos clínicos (VOGEL et al., 2000). Embora ensaios de xenotransplante sugiram que CTH CD34⁻ possam existir, cálculos de frequência estimam que mais de 99% das CTH expressam este marcador (BHATIA et al., 1998; ISHII et al., 2011). Entretanto, CD34 é expresso tanto em CTH quanto em células progenitoras mais diferenciadas, o que motivou a busca por outros marcadores. Baum et al. (1992) identificaram CD90 (Thy). Em combinação com CD34, este fenótipo caracterizava uma pequena população celular capaz de reter a maior parte do potencial multilinhagem (MURRAY et al., 1995). Em seguida, CD45RA e CD38 foram identificados como marcadores de células progenitoras mais diferenciadas, enriquecendo as CTH negativamente (LANSDORP; SUTHERLAND; EAVES, 1990; BHATIA et al., 1997; CONNEALLY et al., 1997; MAZURIER et al., 2003; MAJETI; PARK; WEISSMAN, 2007).

Notta et al. (2011), por meio de ensaio de diluição limitante, compararam a frequência de CTH dentro das populações celulares CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺ (Thy⁺) e CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻ (Thy⁻), derivadas de sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP) e observaram frequência de 5% e 1% de CTH-LD nos fenótipos Thy⁺ e Thy⁻, respectivamente, concluindo que, apesar de a expressão de CD90 enriquecer a população para CTH, atividade de enxertia de longa duração persistia no fenótipo Thy⁻, o que demonstra uma heterogeneidade deste compartimento, composto por uma pequena fração de CTH-LD e uma grande fração de PMP.

Na busca de um novo marcador de superfície celular para melhor purificar as CTH, os autores compararam a expressão diferencial de várias moléculas de adesão nas populações Thy⁺ e Thy⁻, considerando a hipótese de que integrinas poderiam marcar CTH pelo fato de mediarem interações celulares no nicho medular e terem sido usadas para isolar CTH murinas e outras células-tronco somáticas (STINGL et al., 2006; BENVENISTE et al., 2010). Assim, evidenciaram que a integrina $\alpha 6$ (CD49f) era distintamente expressa em 50-70% da população Thy⁺ e 10-20% da Thy⁻. Ensaio de diluição limitante complementar revelou que 9,5% e 4,5% das células Thy⁺CD49f⁺ e Thy⁻CD49f⁺ apresentavam atividade de enxertia de longa duração em comparação a 0,9% e 0,13% das células Thy⁺CD49f⁻ e Thy⁻CD49f⁻, respectivamente. Além disso, observaram que, embora os níveis de quimerismo aumentassem gradualmente no sangue periférico dos camundongos transplantados com as frações CD49f⁺, a enxertia da fração Thy⁻CD49f⁻ apresentava níveis mais elevados de quimerismo e diferenciação multilinhagem.

precoce, com pico entre 2 e 4 semanas, mas que depois declinava, caracterizando este fenótipo como o de PMP. A fração $\text{Thy}^+\text{CD49f}^-$, por sua vez, apresentou cinética de enxertia intermediária entre a fração $\text{Thy}^-\text{CD49f}^-$ e as CD49f^+ (NOTTA et al., 2011).

Análise de expressão gênica identificou que as frações $\text{Thy}^+\text{CD49f}^+$ e $\text{Thy}^-\text{CD49f}^+$ não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, embora as células $\text{Thy}^-\text{CD49f}^+$ demonstrassem um padrão intermediário entre as frações $\text{Thy}^+\text{CD49f}^+$ e $\text{Thy}^-\text{CD49f}^-$, compatíveis com a menor frequência de CTH nesta população. Por outro lado, a fração $\text{Thy}^-\text{CD49f}^-$ segregou-se de modo independente de ambas frações CD49f^+ em 70 genes, corroborando os achados funcionais encontrados nos ensaios de xenotransplante (NOTTA et al., 2011).

Visando aprimorar os dados encontrados, Notta et al. (2011) agregaram ao fenótipo $\text{Thy}^+\text{CD49f}^+$, a propriedade de alto efluxo mitocondrial do corante rodamina-123 (Rho^{lo}), implicado no enriquecimento de CTH de populações $\text{CD34}^+\text{CD38}^-$ (MCKENZIE et al., 2007). Em ensaio de xenotransplante de célula única $\text{Thy1}^+\text{Rho}^{\text{lo}}\text{CD49f}^+$ derivada de SCUP, cinco de 18 camundongos transplantados mantiveram quimerismo multilinhagem após 20 semanas do transplante, reforçando a hipótese de que CTH humanas, de fato, expressam CD49f. Embora com menor eficiência, Huntsman et al. (2015) também reproduziram estes resultados com célula única $\text{Thy1}^+\text{Rho}^{\text{lo}}\text{CD49f}^+$ derivada de sangue periférico de doador mobilizado com fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF, do inglês *granulocyte colony stimulating factor*).

Além do imunofenótipo, o *status* transcricional de uma célula é altamente preditivo de sua identidade. Neste sentido, uma série de estudos tem buscado desvendar assinaturas transcricionais das CTH em relação a células hematopoéticas progenitoras e diferenciadas, seja por técnicas de microarranjo, seja mais recentemente por sequenciamento do RNA (NOVERSHTERN et al., 2011; LAURENTI et al., 2013; CHEN et al., 2014). As CTH aparentemente apresentam um programa transcricional distinto quando comparadas a progenitores de linhagem restrita: quase 70% dos genes diferencialmente expressos durante a hematopoese precoce são alterados de modo significativo até a saída do compartimento tronco (LAURENTI et al., 2013). Por outro lado, poucos genes distinguem CTH-LD de CTH-CD, especialmente quando estas células são isoladas em estado de quiescência (NOTTA et al., 2011; LAURENTI et al., 2013; CHEN et al., 2014). Cabezas-Wallscheid et al. (2014), neste contexto, observaram que apenas 47 proteínas eram diferencialmente expressas entre CTH e PMP de camundongos, sugerindo que o compartimento de CTH humano também deve ser extremamente similar a nível proteico.

Embora CTH-LD e CTH-CD sejam igualmente quiescentes em condições de homeostase, seu comportamento é bastante distinto quando as mesmas são estimuladas a se dividir. Comparando-se dados de homeostase com condições de ativação do ciclo celular, CTH-LD e CTH-CD diferenciaram-se com a expressão de genes relacionados ao ciclo celular, remodelamento da cromatina e resposta imune, levando à conclusão de que o *status* de ciclo celular, além de determinar a produção transcricional, define a identidade funcionalmente distinta dos compartimentos de CTH (LAURENTI et al., 2015). Além disso, as CTH também são caracterizadas por elevada transcrição de moléculas de RNA longas não-codificadoras, cuja produção varia de modo expressivo durante a diferenciação celular, assim como eventos de *splicing* alternativo e alterações epigenéticas, via metilação do DNA e modificação da cromatina, o que, em conjunto, confere nível adicional de regulação da hematopoese (CHEN et al., 2014; VEDI et al., 2016).

As CTH residem em locais específicos na medula óssea, caracterizados por microambientes únicos denominados nichos, os quais compreendem nichos endosteais e vasculares, estes últimos subdivididos em componentes arteriolar e sinusoidal. Acredita-se que as CTH quiescentes tendem a se localizar ao redor de arteríolas e próximas ao endósteo, ao passo que as CTH ativadas parecem residir na vizinhança dos sinusoides (ZHANG et al., 2003; XIE et al., 2009; DING; MORRISON, 2013; KUNISAKI et al., 2013; BIRBRAIR; FRENETTE, 2016). Inúmeras pesquisas têm identificado o papel de diversas células do nicho medular na regulação das CTH, incluindo-se osteoblastos, células-tronco mesenquimais, células estromais, células de Schwann não mielinizantes, células endoteliais, adipócitos, megacariócitos e neutrófilos. Por meio da produção de fatores de crescimento e citocinas, como fator de célula-tronco, trombopoetina (TPO), fator de crescimento transformante β (TGF- β , do inglês *transforming growth factor- β*), ligantes 4 e 12 de quimiocina CXC, G-CSF, osteopontina, ligantes de *notch*, angiopoetina 1 e pleiotropina, estas células controlam propriedades de autorrenovação, manutenção, sobrevivência e diferenciação das CTH (ASADA; TAKEISHI; FRENETTE, 2017; KUMAR; GEIGER, 2017), sendo a via de sinalização Wnt/ β -catenina protagonista na modulação destes eventos em um padrão complexo dependente do contexto (MALHOTRA; KINCADE, 2009; LUIS et al., 2011).

As CTH também se caracterizam por apresentar um baixo *status* metabólico, mitocôndrias condensadas e imaturas e alta atividade glicolítica, como sugerido pelos baixos níveis intracelulares de adenosina trifosfato, espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) e baixo potencial elétrico da membrana plasmática, ao contrário de células hematopoéticas progenitoras e mais diferenciadas, as quais exibem alta atividade

mitocondrial e utilizam, predominantemente, fosforilação oxidativa (PARMAR et al., 2007; SIMSEK et al., 2010).

O fator induzível por hipóxia-1 alfa (HIF-1 α , do inglês *hypoxia-inducible factor-1 alpha*), expresso constitutivamente pelas CTH em condições de baixa concentração de oxigênio do nicho medular, desempenha papel essencial na ativação de múltiplos genes da via glicolítica, permitindo a regulação do metabolismo ao estado de quiescência (LEVESQUE et al., 2007; SIMSEK et al., 2010). À medida que as células se diferenciam, passam a residir em regiões de maior oxigenação, condição na qual HIF-1 α é naturalmente degradado (SALCEDA; CARO, 1997). Fatores de transcrição *forkhead*, que atuam a jusante da via de sinalização Pten/PI3K/Akt e são ativados em resposta a ROS, também parecem ser cruciais para a manutenção da propriedade de autorrenovação, impedindo que níveis elevados de ROS levem à exaustão precoce do compartimento tronco por meio de diferenciação, proliferação ou apoptose das CTH (JANG; SHARKIS, 2007; TOTHOVA et al., 2007). Por fim, evidências apontam que divisões celulares podem acarretar em alocação assimétrica das mitocôndrias: a célula-filha que recebe grande quantidade irá se diferenciar; a outra, pelo contrário, manterá o potencial tronco (KATAJISTO et al., 2015).

Em conjunto, estes dados tornam evidente a complexa gama de inter-relações entre fatores intrínsecos às CTH, como fatores de transcrição, *status* de ciclo celular, vias metabólicas e perfil mitocondrial, e fatores extrínsecos relacionados ao microambiente do nicho medular na fina regulação do balanço entre os desfechos de quiescência, autorrenovação e diferenciação das CTH. Neste sentido, a melhor compreensão destes processos biológicos poderia levar ao desenvolvimento de estratégias de expansão de CTH *in vitro* de modo a conservar as características fenotípicas, funcionais e moleculares das mesmas (KUMAR; GEIGER, 2017).

1.2 Falência da célula-tronco hematopoética: anemia aplástica

A anemia aplástica (AA) é uma rara doença hematológica decorrente da falência das CTPH e se caracteriza por pancitopenia associada à hipocelularidade da medula óssea, sem sinais de infiltração neoplásica, fibrose ou infecção. É classificada em hereditária quando resulta de doenças genéticas bem caracterizadas clinicamente, associadas a uma variedade de mutações germinativas, as quais estão implicadas tanto na diminuição da capacidade de reparo do DNA das CTPH (anemia de Fanconi e disceratose congênita), quanto na interferência em vias de diferenciação e autorrenovação das mesmas (deficiência de GATA2) ou em vias de regulação da homeostase do sistema imunológico (deficiência de CTLA-4 e DADA2)

(YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006; YOUNG, 2013, 2018; SCHOETTLER; NATHAN, 2018). Por outro lado, é considerada adquirida quando nenhuma síndrome hereditária é identificada. A anemia aplástica adquirida (AAa) apresenta incidência de dois a 14 indivíduos/milhão/ano, sendo mais prevalente na Ásia que na América e Europa (INCIDENCE ..., 1987; ISSARAGRISIL et al., 1991; MCCAHERN et al., 2003). No Brasil, em particular, Maluf et al. (2009) registraram incidência de 1,6 indivíduos/milhão/ano. A AAa também caracteriza-se por pico de incidência etário bimodal: o primeiro ocorrendo em indivíduos entre 15 e 25 anos; e o segundo, em pacientes acima de 60 anos.

Embora a AAa esteja associada a diversos fatores causais potenciais, como infecções virais, exposição à radiação, drogas e produtos químicos, na imensa maioria dos casos nenhum agente etiológico é identificado. Evidências laboratoriais e clínicas apoiam a hipótese de que, na maior parte das vezes –senão todas–, o mecanismo fisiopatológico da doença consiste em lesão autoimune às CTPH em indivíduos geneticamente suscetíveis. Defeitos intrínsecos das CTPH e disfunção do microambiente da medula óssea também podem contribuir para o processo patológico imune. Apesar de a apresentação clínica da AAa poder estar associada a outras doenças autoimunes, como timoma (BERNARD et al., 2016), hepatite soronegativa (GONZALEZ-CASAS et al., 2009) e fasciite eosinofílica (DE MASSON et al., 2013), na maioria absoluta dos casos a apresentação é isolada (YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006; YOUNG, 2013, 2018; SCHOETTLER; NATHAN, 2018).

Linfócitos T citotóxicos estão implicados na destruição das CTPH pelo reconhecimento de autoantígenos apresentados via moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC, do inglês *major histocompatibility complex*) ou sistema antigênico leucocitário humano (HLA, do inglês *human leukocyte antigen*) classes I e II, no contexto de infecção, exposição a drogas ou outro gatilho ambiental não identificado, embora um autoantígeno desencadeador ainda não tenha sido reconhecido (YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006). Estas células encontram-se ativadas funcional e fenotipicamente (ZOUMBOS et al., 1985; HOSOKAWA et al., 2016), produzindo citocinas com perfil T auxiliar tipo 1, particularmente interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor- α*) (SOLOMOU; KEYVANFAR; YOUNG, 2006; SMITH; KANWAR; MACNAMARA, 2016), as quais induzem apoptose das CTPH, por meio da via Fas/FasL (LIU et al., 2014) e expressão de TRAIL (KAKAGIANNI et al., 2006). Além disso, habitualmente circulam como oligoclones (RISITANO et al., 2004; GIUDICE et al., 2018), e a presença e intensidade desta expansão clonal prediz melhor resposta à terapia imunossupressora (SCHUSTER et al., 2011), bem como pacientes que respondem a este tratamento tipicamente apresentam restauração da

diversidade do repertório de receptores de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ citotóxicos (KOCHENDERFER et al., 2002).

Linfócitos T regulatórios (Treg) desempenham papel essencial na supressão de linfócitos T autorreativos. Indivíduos com AAa apresentam linfócitos Treg funcionalmente defeituosos e reduzidos em número (SOLOMOU et al., 2007b; KORDASTI et al., 2012; SHI et al., 2012), e isto se correlaciona com a gravidade da doença (KORDASTI et al., 2012; SUTTON et al., 2013). Pacientes que respondem à terapia imunossupressora aumentam o número de linfócitos Treg tanto em relação ao momento pré-tratamento, quanto em comparação com indivíduos refratários ao mesmo (SOLOMOU et al., 2007b; SUTTON et al., 2013). Linfócitos *natural killer* (NK) também se encontram em número e com atividade citotóxica reduzidos nestes pacientes. Estas células evitam o dano autoimune ao destruírem células apresentadoras de antígenos que apresentam autoantígenos, em especial pela liberação de proteínas citotóxicas como a perforina (GASCON; ZOUMBOS; YOUNG, 1986).

O relato de mutações em heterozigose no gene da perforina levando a uma resposta imune inapropriada (SOLOMOU et al., 2007a), a evidência de polimorfismos nos genes de TNF- α (PENG et al., 2003; GIDVANI et al., 2004), INF- γ (DUFOUR et al., 2004) e interleucina-6 (IL-6) (GIDVANI et al., 2004), resultando em produção excessiva destas citocinas, assim como mutações somáticas no transdutor de sinal e ativador de transcrição 3 (STAT3), produzindo ativação constitutiva de linfócitos T (JEREZ et al., 2013), conferem uma base genética à ativação linfocitária disfuncional nesta enfermidade, pelo menos em parte dos casos. Também neste contexto, inúmeros estudos epidemiológicos relatam a associação entre alelos HLA e AAa. Metanálise recente evidenciou que os polimorfismos HLA-A*02 e DRB1*04:07, *15 e *15:01 estariam relacionados a maior risco de desenvolvimento de AAa, ao passo que os polimorfismos HLA-DRB1*03:01, *04, *04:06, *08:02, *13:01, *13:02 e *14 seriam protetores (DENG et al., 2018).

Mais de 70% dos pacientes com AAa apresentam hematopoese clonal (LANE et al., 2013; HEUSER et al., 2014; KULASEKARARAJ et al., 2014; BABUSHOK et al., 2015; YOSHIZATO et al., 2015; BABUSHOK, 2018). Algumas das alterações genéticas, como perda neutra de heterozigose do braço curto do cromossomo 6 (6pLOH, do inglês *6p loss of heterozygosity*) e mutações somáticas nos genes *PIGA* e *BCOR/BCORL1*, são detectadas de forma muito mais prevalente nestes pacientes que em indivíduos com síndrome mielodisplásica (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA) e idosos com hematopoese clonal de potencial indeterminado, sendo a autoimunidade um dos mecanismos implicados na seleção clonal (YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006; OGAWA, 2016; YOUNG, 2018).

6pLOH ocorre em cerca de 11% dos pacientes com AAa (BABUSHOK et al., 2014; YOSHIZATO et al., 2015; BETENSKY et al., 2016). Katagiri et al. (2011) identificaram que esta alteração envolve principalmente o *locus* HLA classe I, levando à expressão uniparental do mesmo, e que a maioria dos pacientes com o achado apresentava perda do haplótipo que continha um ou mais dos alelos A*02:01, *02:06, *31:01 e B*40:02, os quais se encontram super-representados na população de 6.613 indivíduos portadores de AA registrados no Programa Japonês de Doação de Medula Óssea entre 1992 e 2008. O advento de técnicas de sequenciamento de nova geração otimizadas para as regiões do MHC altamente repetitivas permitiu a detecção de um segundo mecanismo de perda de expressão do HLA nestes pacientes, caracterizado por mutações somáticas com perda de função em alelos HLA classe I específicos, como B*14:02 e *40:02, também super-representados em indivíduos com AA em comparação à população controle de mesma etnia (BABUSHOK et al., 2017; ZAIMOKU et al., 2017; BABUSHOK, 2018).

Mutação somática do gene *PIGA*, levando à expressão defeituosa de proteínas de superfície celular ancoradas ao glicosilfosfatidilinositol é detectada em aproximadamente 40% dos pacientes com AA (MORTAZAVI et al., 2003; KULASEKARARAJ et al., 2014; RAZA et al., 2014; YOSHIZATO et al., 2015), o que justifica a presença frequente de características clínicas da hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) em indivíduos com AAa e vice-versa. Tanto o fenótipo HPN quanto a perda do HLA pelas CTPH favoreceriam o escape ao dano imune, levando, por consequência, à expansão destes clones (YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006; OGAWA, 2016; YOUNG, 2018).

Por outro lado, alterações genéticas comumente identificadas em SMD/LMA, como anormalidades citogenéticas numéricas (-7, +8 e del(5q)) e mutações somáticas dos genes *ASXL1* e *DNMT3A*, também são observadas em pacientes com AAa (LANE et al., 2013; HEUSER et al., 2014; KULASEKARARAJ et al., 2014; BABUSHOK et al., 2015; YOSHIZATO et al., 2015). Em particular, estas mutações têm uma prevalência diretamente relacionada à idade, são caracterizadas por transições de citosina para timina, assim como observado na hematopoese clonal relacionada ao envelhecimento (GENOVESE et al., 2014; JAISWAL et al., 2014) e conferem risco aumentado de evolução para SMD/LMA, ao contrário das mutações nos genes *PIGA* e *BCOR/BCORL1*, que conferem bom prognóstico (YOSHIZATO et al., 2015). O risco de cerca de 10 a 15% de evolução para SMD/LMA dos pacientes com AAa (TICHELLI et al., 1988), muito mais elevado que dos idosos com hematopoese clonal relacionada ao envelhecimento (OGAWA, 2016), poderia se justificar pelo fato de a medula óssea dos primeiros ser constituída por um número muito reduzido de CTPH,

conferindo aos clones mutados maior vantagem proliferativa neste microambiente (YOUNG, 1992).

Além disso, cerca de 1/3 dos pacientes com AAa apresentam diminuição do comprimento telomérico em seus leucócitos (BRUMMENDORF et al., 2001). Telômeros são estruturas compostas por centenas a milhares de sequências nucleotídicas hexaméricas *in tandem* (TTAGGG) associadas a um conjunto de proteínas (*shelterin*), localizadas nas extremidades dos cromossomos lineares, sendo responsáveis por proteger o DNA de degradação e recombinação aberrante. Isto porque distinguem as extremidades dos cromossomos das quebras de fita dupla no DNA por formarem estruturas denominadas *T-loops*. A cada divisão celular, há o encurtamento telomérico progressivo, devido à incapacidade da DNA polimerase de replicar integralmente a extremidade 3' do DNA durante a mitose. A diminuição crítica dos telômeros leva à instabilidade genômica, o que deflagra vias celulares relacionadas à senescência e apoptose. Em células com alta capacidade proliferativa, como as CTPH, o atrito telomérico é minimizado pela telomerase, complexo enzimático ribonucleoproteico responsável por sintetizar os telômeros, constituído por uma transcriptase reversa (TERT), um molde de RNA (TERC) e proteínas associadas, com funções de montagem, tráfego e estabilização do complexo (BLACKBURN, 2000, 2001; CONG; WRIGHT; SHAY, 2002; DE LANGE, 2005).

Nas telomeropatias hereditárias, como na disceratose congênita, causada por mutação germinativa no gene *DKC1*, que codifica proteína estabilizadora do complexo da telomerase, o atrito telomérico acelerado leva a uma síndrome constituída por anormalidades físicas, falência medular, cirrose hepática e fibrose pulmonar (CALADO; YOUNG, 2009; TOWNSLEY; DUMITRIU; YOUNG, 2014). Embora alguns pacientes com AAa apresentem mutações semelhantes às encontradas nestas doenças, levando-se à inferência de que defeitos genéticos associados às formas hereditárias da AA poderiam contribuir à patogênese da AAa, a maioria dos pacientes com AAa não compartilham estas mutações (FOGARTY et al., 2003; YAMAGUCHI et al., 2003; YAMAGUCHI et al., 2005; JONES et al., 2016; MARSH et al., 2018). Assim, questiona-se se o encurtamento telomérico nestes pacientes é secundário apenas ao aumento do *turnover* das CTPH remanescentes ou se fatores ambientais, genéticos e epigenéticos não identificados poderiam contribuir para este processo (SCHOETTLER; NATHAN, 2018). Independentemente desta questão, a detecção de telômeros curtos no diagnóstico de pacientes com AAa está associada a pior resposta à terapia imunossupressora (NARITA et al., 2015), risco aumentado de perda de resposta à mesma, evolução para SMD/LMA e pior sobrevida global (SCHEINBERG et al., 2010).

Alterações no microambiente da medula óssea de pacientes com AAa também têm sido relatadas, embora ainda não seja possível estabelecer uma correlação clara destes achados com a fisiopatogenia da doença (SCHOETTLER; NATHAN, 2018). Avaliação de amostras de medula óssea de indivíduos com AAa evidenciou diminuição do número de células endosteais, vasculares e perivasculares (WU et al., 2015). Células mesenquimais estromais derivadas de pacientes com AA, apesar de morfologia e fenótipo típicos, apresentam potencial clonogênico, capacidade de produção estromal e de sustentação da hematopoese reduzidos em ensaios *in vitro* (HAMZIC et al., 2015). Adipogênese e diferenciação osteogênica prejudicadas também foram relatados (SHIPOUNOVA et al., 2009), assim como diminuição da produção estromal *in vitro* e *in vivo* de TGF- β , citocina implicada na regulação do ciclo celular das CTPH (RIZZO et al., 1999).

O tratamento de pacientes com AAa grave persiste bastante desafiador, devido tanto às complicações agudas da pancitopenia (anemia sintomática, infecções, sangramentos), quanto à história natural da doença e complicações do tratamento. O transplante de células-tronco e progenitoras hematopoéticas (TCTH) alogênico, aparentado, HLA-compatível é curativo na grande maioria dos pacientes jovens com AAa grave; contudo, as maiores dificuldades consistem em estender este benefício para pacientes mais velhos e para os que não possuem doadores aparentados compatíveis, nos quais a mortalidade relacionada ao transplante, falha de enxertia e doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) são complicações não desprezíveis (YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006; SCHEINBERG; YOUNG, 2012; YOUNG, 2013, 2018; BACIGALUPO, 2017).

Embora o TCTH alogênico não aparentado, HLA compatível apresente resultados de sobrevida estatisticamente não inferiores aos do aparentado, a incidência de DECH grave é até 2 vezes mais alta (BACIGALUPO, 2017, 2018). O TCTH alogênico com sangue de cordão umbilical e placentário como fonte de CTPH, apesar das baixas taxas de DECH a ele associadas, apresenta maior aplicabilidade aos pacientes pediátricos devido à limitação de dose de CTPH no produto, levando a atraso de enxertia e neutropenia prolongada (PAGLIUCA et al., 2017; BACIGALUPO, 2017, 2018). Já o TCTH alogênico aparentado haploidêntico, mesmo tendo apresentado resultados iniciais promissores, ainda é considerado uma modalidade experimental, tendo em vista o número ainda pequeno de casos reportados (BACIGALUPO, 2017, 2018; CHENG et al., 2018).

A terapia imunossupressora corresponde ao tratamento de escolha em indivíduos não candidatos ao TCTH (YOUNG; CALADO; SCHEINBERG, 2006; YOUNG, 2013, 2018). A associação de globulina anti-timocítica (ATG, do inglês *anti-thymocyte globulin*) equina e

ciclosporina (CSA) produz respostas hematológicas globais (incluindo-se respostas parciais e completas) em cerca de 2/3 dos pacientes, mas recaídas ocorrem em aproximadamente 1/3 dos respondedores (SCHEINBERG; WU; NUNEZ; YOUNG, 2009b; SCHEINBERG et al., 2011). Em análise retrospectiva, no maior estudo multicêntrico reportado, Clé et al. (2018) compararam as formulações equina e leporina de ATG em associação à CSA, identificando taxas de resposta global em 6 meses de 59 e 31% e sobrevida global em 5 anos de 80 e 57%, respectivamente. Tanto a adição de um terceiro agente imunossupressor (micofenolato de mofetila (SCHEINBERG et al., 2006) e sirolimus (SCHEINBERG, 2009a; SCHEINBERG et al., 2009b)) a esta plataforma terapêutica, quanto a utilização de drogas com maior potencial linfotóxico (alemtuzumab (SCHEINBERG et al., 2012), ATG leporina (SCHEINBERG et al., 2011) e ciclofosfamida (BRODSKY et al., 2010; SCHEINBERG et al., 2014)) foram inefetivas em melhorar as taxas de resposta obtidas ou apresentaram toxicidade proibitiva.

Um segundo ciclo de imunossupressão, utilizando-se ATG leporina e CSA (SCHEINBERG; NUNEZ; YOUNG, 2006) ou alemtuzumab (SCHEINBERG et al., 2012), leva a respostas hematológicas globais em cerca de 30 a 40% dos pacientes refratários e 60% daqueles recaídos após primeira linha de ATG equina e CSA. Naqueles pacientes que receberam ATG leporina e CSA em primeira linha, um segundo ciclo de imunossupressão semelhante (CLÉ et al., 2015), com ATG equina e CSA (SCHEINBERG et al., 2014) ou alemtuzumab (SCHEINBERG et al., 2012) produz respostas hematológicas globais similares ou inferiores, demonstrando que as altas taxas de resposta com uso em primeira linha de ATG equina não podem ser resgatadas quando, em contrapartida, ATG leporina é utilizada inicialmente. Em resumo, apenas cerca de 1/3 dos pacientes submetidos à terapia imunossupressora apresentam respostas hematológicas globais sustentadas, sem experimentar eventos tardios, como recaída e evolução clonal, em 10 anos (SCHEINBERG; YOUNG, 2012). E, de modo geral, os pacientes que obtêm os melhores desfechos são aqueles que apresentam as respostas hematológicas mais robustas (ROSENFELD et al., 2003). Por tudo isso, nos últimos anos, muito mais do que a busca por novos regimes de imunossupressão, esforços têm sido direcionados em estratégias terapêuticas que reestabeleçam a reserva hematopoética exaurida após o dano imune e que agreguem à imunossupressão respostas hematológicas mais robustas (SCHEINBERG, 2018b).

Infelizmente, tentativas de estimulação do compartimento de CTPH com fatores de crescimento, como eritropoetina (EPO), G-CSF, fator de célula-tronco e interleucinas, se mostraram inefetivas (MARSH; GANSER; STADLER, 2007). Todavia, evidências laboratoriais e clínicas sugeriam que a trombopoetina (TPO), hormônio inicialmente associado

à estimulação megacariocítica (DE SAUVAGE et al., 1994), poderia ser efetivo: 1º) diferentemente dos receptores de EPO e G-CSF, o de TPO (TPO-R, também denominado proteína da leucemia mieloproliferativa, c-MPL, do inglês *myeloproliferative leukemia clade*) é expresso em células-tronco hematopoéticas e comumente utilizado em associação a outras citocinas para expansão *in vitro* das mesmas (YOSHIHARA et al., 2007); 2º) além de megacariocitopenia, número reduzido de células-tronco hematopoéticas são observadas em modelos animais *knockout* para TPO e c-MPL (ALEXANDER et al., 1996; QIAN et al., 2007); 3º) na púrpura amegacariocítica congênita, mutações no *c-MPL* resultam em redução significativa de células-tronco hematopoéticas e citopenia multilinhagem (BALLMAIER et al., 2001). Desta forma, um agonista do c-MPL poderia melhorar a função medular em indivíduos com AAa, embora o achado de níveis séricos muitos elevados de TPO nestes pacientes levantasse questionamentos sobre a efetividade desta abordagem (FENG et al., 2011).

Estudos em pacientes com AAa refratária à terapia imunossupressora, utilizando em monoterapia o agonista sintético do receptor de trombopoetina eltrombopague (EPAG), evidenciaram respostas hematológicas em até 50% dos indivíduos, com muitos dos respondedores apresentando incrementos em mais de uma linhagem hematopoética e cerca de 2/3 deles sustentando a resposta obtida mesmo com a descontinuação da droga (OLNES et al., 2012; DESMOND et al., 2014; WINKLER; COOPER; TOWNSLEY, 2017). Quando EPAG foi adicionado à ATG equina e CSA em primeira linha, respostas hematológicas global de até 94% e completa de 58% em seis meses foram observadas na coorte de pacientes que iniciou a droga simultaneamente aos imunossupressores e a manteve por seis meses, o que corresponde a um incremento de cerca de seis vezes nas taxas de resposta completa em relação a controle histórico sem EPAG (aproximadamente 10%).

Entretanto, em seguimento com mediana de 18 meses, ainda relativamente curto, 54% dos pacientes que suspenderam o uso de CSA com seis meses evoluiu com recaída, taxa mais alta que a de controles históricos utilizando ATG equina e CSA isoladamente (aproximadamente 1/3) (TOWNSLEY et al., 2017). Até o momento, a administração de EPAG, tanto em primeira linha, quanto no cenário de refratariedade, não aparenta modificar a incidência cumulativa de evolução clonal em relação à experiência histórica. Todavia, o aparecimento de anormalidades citogenéticas ocorre mais precocemente, em especial nos primeiros seis meses de uso da droga, o que sugere que EPAG poderia estimular a expansão de clones pré-existentes, muito embora este achado não necessariamente se associe a recaída e displasia, podendo ainda ser algumas vezes transitório (SCHEINBERG, 2018a).

Eltrombopague é uma molécula sintética não-peptídica, de baixo peso molecular, que, de modo distinto da TPO endógena a qual se liga ao domínio extracelular do c-MPL, liga-se seletivamente ao domínio transmembrana deste receptor, estimulando a proliferação de CTPH via ativação da via de sinalização JAK/STAT, dentre outras (ERICKSON-MILLER et al., 2005). Alvarado et al. (2017) demonstraram que a TPO endógena forma um complexo heterodimérico com o IFN- γ , impedindo sua ligação ao c-MPL, mecanismo que poderia justificar a evasão do EPAG ao efeito inibitório do IFN- γ nas CTPH e os altos níveis de TPO endógena detectados nos pacientes com AAa.

Propriedades imunomodulatórias do EPAG, como aumento de linfócitos T e B regulatórios, da secreção de TGF- β , inibição da diferenciação de células dendríticas e diminuição da produção de IFN- γ e TNF- α , têm sido descritos na trombocitopenia imune (BAO et al., 2010; NISHIMOTO et al., 2014; SCHIFFERLI; KUHNE, 2016), mas é plausível que ações semelhantes possam ocorrer na AAa. Também neste contexto, plaquetas por si podem ter efeitos imunomodulatórios que contribuiriam para o controle do dano imune e reconstituição de todas as linhagens hematopoéticas na AAa (SADALLAH et al. 2011; SADALLAH et al., 2014; SCHIFFERLI; KUHNE, 2016). Além disso, EPAG possui em sua molécula atividade quelante de ferro, tendo sido identificado mobilização do ferro intracelular e até redução dos níveis séricos de ferritina em alguns pacientes em uso prolongado da droga (VLACHODIMITROPOULOU et al., 2017; ZHAO et al., 2018). Apesar de estudos demonstrarem benefício da quelação de ferro na melhora das citopenias em pacientes com AA, associação direta do EPAG a este desfecho precisa ainda ser estabelecida (LEE et al., 2013; CHEONG et al., 2014).

A introdução de EPAG representou uma contribuição importante ao arsenal terapêutico na AAa que, há décadas, não recebia a incorporação de uma nova abordagem farmacológica. Os resultados obtidos com a droga nos estudos clínicos pivotais, inclusive, já têm sido reproduzidos em outras populações, consolidando sua relevância (ECSEDI et al., 2019; YAMAZAKI et al., 2019). Mais do que isso, tornaram evidente que estratégias direcionadas à expansão do compartimento de CTPH exaurido pelo dano imune na AAa podem atuar de modo adjuvante à terapia imunossupressora. Neste sentido, o desenvolvimento de drogas com efeito sinérgico ao EPAG poderia agregar respostas hematológicas ainda mais robustas e, em especial, minimizar o risco de recaída ainda significativo.

Desta forma, uma estratégia terapêutica hipotética nestes pacientes seria o transplante autólogo de CTPH expandidas *in vitro*. Embora a segurança do transplante de CTPH cultivadas *in vitro* esteja bem estabelecida (SHPALL et al., 2002), as condições usuais de cultura

otimizadas para a expansão das mesmas (meio livre de soro, suplementado com TPO, fator de célula-tronco, ligante de tirosino-quinase 3 FMS relacionado (FLT3L, do inglês *FMS-like tyrosine kinase 3 ligand*) e IL-6) levam a grande proliferação, mas acompanhada de diferenciação celular, com perda da atividade de célula-tronco (MURRAY et al., 1999).

1.3 Expansão de células-tronco hematopoéticas *in vitro*

Neste âmbito, inúmeras técnicas têm sido empregadas com o objetivo de conter a diferenciação celular durante o processo de expansão *in vitro* e de melhorar o *homing* das células transplantadas à medula óssea, como, por exemplo: cocultura com células mesenquimais (ROBINSON et al., 2006; DE LIMA et al., 2012); adição à cultura de ligante de *notch delta 1* (OHISHI; VARNUM-FINNEY; BERNSTEIN, 2002; DELANEY et al., 2005; DELANEY et al., 2010), quelante de cobre tetraetilenopentamina (DE LIMA et al., 2008; PELED et al., 2004), nicotinamida (PELED et al., 2012; HORWITZ et al., 2014; HORWITZ et al., 2019); tratamento pré-infusional com fucosiltransferase-VI e fucose guanosina difosfato (fucosilação) (XIA et al., 2004; POPAT et al., 2015), e dimetil-prostaglandina E2 (HOGGATT et al., 2009; CUTLER et al., 2013). Embora estas estratégias se mostraram efetivas na redução do tempo de enxertia de plaquetas e, especialmente, de granulócitos em ensaios clínicos fase 1/2 envolvendo pacientes submetidos a transplante alogênico de cordão umbilical, a capacidade de enxertia de longo prazo da fração manipulada das células transplantadas foi apenas demonstrada com a utilização de dimetil-prostaglandina E2, fucosilação e nicotinamida, e de modo heterogêneo nas subpopulações mieloide e linfoide (NIKIFOROW; RITZ, 2016).

Além disso, novas metodologias foram desenvolvidas para a triagem de grande quantidade de pequenas moléculas não biológicas com potencial de atividade em CTPH humanas. Estas pequenas moléculas costumam ser de fácil modificação estrutural e mais estáveis que as de origem biológica, podendo ser produzidas em grandes escalas para fins laboratoriais e terapêuticos (FARES et al., 2015). Desta forma, foram identificados SR1 (BOITANO et al., 2010) e UM171 (FARES et al., 2014).

1.3.1 SR1

Boitano et al. (2010), por meio de ensaio que utilizava células CD34⁺ humanas mobilizadas de sangue periférico de doadores, investigaram biblioteca de 100.000 moléculas heterocíclicas e identificaram um derivativo de purina, *StemRegenin 1* (SR1, 4-(2-((2-

Benzo[b]tifen-3-il)-9-isopropil-9H-purina-6-il)amino)etil)fenol hidrocloreto), que expandiu o número de células CD34⁺ em cultivo *in vitro*, avaliadas por citometria de fluxo. Cultivo de sete dias em meio usual com adição de SR1 aumentou o número de células CD34⁺ em 2,6 vezes, comparado ao controle (células cultivadas em mesmo meio com adição do veículo dimetilsulfóxido (DMSO) $\leq 0,1\%$). Quando prolongado para 21 dias o tempo de cultivo, observou-se aumento do número de células CD34⁺ em 73 vezes em relação ao controle e em 1.118 vezes em relação à amostra inicial. Na ausência do meio rico em citocinas, SR1 não induziu proliferação, e a retirada da substância levou à rápida diferenciação celular, demonstrando a reversibilidade de seu efeito. Utilizando-se o marcador de divisão celular éster succinimidil-carboxifluoresceína, demonstrou-se que SR1 não aumenta a taxa de divisão celular, mas sim retém a expressão de altos níveis de CD34 (66-76%), comparado ao controle (14-31%), após cultivo de sete dias.

Em cultivo de células CD34⁺ de cordão umbilical humano por cinco semanas, o autor corroborou seus achados. SR1 expandiu em 17.100 vezes o número de células CD34⁺ inicial e em 47 vezes comparado ao controle. Nestas condições, em ensaio de unidades formadoras de colônia (CFU, do inglês *colony forming unit*), SR1 também se mostrou eficaz: levou a aumento global em 65 vezes comparado ao controle e maior que 9.500 vezes em relação à contagem inicial; incluiu-se aumento em relação ao controle nas linhagens mieloide (55 vezes), eritroide (129 vezes) e na linhagem bipotencial granulócito-monócito (55 vezes). Além disso, unidades formadoras de colônia multilinhagem granulócito-monócito-eritrócito-megacariócito (CFU-GEMM, do inglês *colony forming unit granulocyte-erythrocyte-monocyte-megakaryocyte*) foram observadas apenas quando expandidas com SR1, sugerindo que o mesmo promove a expansão de progenitores multipotentes precoces.

Ainda neste estudo, foi avaliada a capacidade de enxertia de células de cordão umbilical humano CD34⁺ cultivadas por três semanas na presença de SR1, em ratos imunodeficientes NSG (NOD/SCID-gama). A progênie de 10.000 células cultivadas com SR1 gerou aumento significativo na enxertia em sangue periférico após uma semana do transplante em comparação às células não cultivadas (seis vezes maior) e às células em cultura controle (24 vezes maior). A progênie de 300 células expandidas com SR1 gerou o mesmo nível de enxertia sustentada que 10.000 células não cultivadas e enxertia quatro vezes maior que a progênie de 10.000 células expandidas em cultura controle, avaliada em sangue periférico, após oito semanas, e em medula óssea, após 13 semanas do transplante. Isso revela que SR1 promove a expansão de células CD34⁺ que contribuem tanto para o enxerto precoce, quanto sustentado. Além disso, a

distribuição de células B, T e mieloides na medula óssea, timo e baço foi similar em todos os grupos, demonstrando que SR1 retém o potencial multilinhagem.

Por meio de estudos avaliando o perfil transcricional de células expostas a SR1, ensaios de ligação competitivos e de resposta à modificação de domínios de ligação da molécula, o autor também demonstrou que SR1 leva à expansão de células CD34⁺ pela ligação direta e inibição do receptor de aril-hidrocarboneto, um fator de transcrição ativado por ligação, membro da superfamília de proteínas PAS (Per-ARNT-Sim), largamente reconhecido por sua função de mediar a toxicidade de uma grande variedade de poluentes ambientais, incluindo dioxinas, bifenóis policlorados e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (SINGH; CASADO et al., 2009; BOCK, 2017). Contudo, a pesquisa envolvendo o receptor de aril-hidrocarboneto levou a uma mudança de paradigma ao demonstrar que o mesmo apresenta importantes funções fisiológicas além da metabolização de xenobióticos, como, por exemplo, a regulação de ciclo celular e apoptose (MARLOWE et al., 2008), migração e diferenciação celulares (MILLER; HOLLOWAY; FOSTER, 2005; MULERO-NAVARRO et al., 2005), oncogênese (ZUDAIRE et al., 2008; OPITZ et al., 2011), inflamação e respostas imunes (QUINTANA et al., 2008; VELDHOFEN et al., 2008; ZHOU, 2016).

Com relação à hematopoese, o receptor de aril-hidrocarboneto apresenta uma importante função na regulação do balanço entre quiescência e proliferação das células-tronco hematopoéticas. Evidências demonstrando seu papel no ciclo celular são a hiperproliferação de CTH em ratos *knockout* para o receptor (SINGH et al., 2011), assim como regulação diferencial de sua expressão durante ciclos de quiescência e proliferação das mesmas (SINGH et al., 2009b). Além disso, o receptor de aril-hidrocarboneto compete com HIF-1 α pela chaperona fator induzível por hipóxia-1 beta (HIF-1 β , do inglês *hypoxia-inducible factor-1 beta*) (CHAN et al., 1999), o que poderia justificar a expansão do compartimento de CTH em condições que sua expressão está reduzida, devido à mudança do balanço transcricional em prol do mediado por HIF-1 α (LINDSEY; PAPOUTSAKIS, 2012). Ainda, os genes *CXCR-4* e *CXCL-12* contém elementos de resposta ao receptor de aril-hidrocarboneto a montante de suas regiões promotoras, e esta via de sinalização é fundamental para a manutenção da reserva de CTH quiescentes (HSU et al., 2007; NIE; HAN; ZOU, 2008). Não menos importante, o receptor de aril-hidrocarboneto está implicado na regulação de genes envolvidos no controle de características e funções das CTH, como *c-Myc* (KIM et al., 2000), *C/EBP* (VOGEL et al., 2004), *HES1* (THOMSEN et al., 2004), dentre outros (SINGH; CASADO et al., 2009).

Em estudo clínico fase 1/2 (WAGNER et al., 2016), SR1 foi utilizado para expansão *in vitro* do compartimento de células CD34⁺ da menor de duas unidades de cordão umbilical,

selecionadas para TCTH alogênico em amostra de 17 pacientes com neoplasia hematológica, com idade entre 10 e 55 anos. SR1 produziu um aumento mediano de 330 vezes na população de células CD34⁺ após 15 dias de expansão *in vitro*, maior que o observado com outros métodos testados em ensaios clínicos (cocultura com células mesenquimais (DE LIMA et al., 2012), adição de ligante de *notch delta 1* (DELANEY et al., 2010) e nicotinamida (HORWITZ et al., 2014)), o que acelerou a enxertia de granulócitos e plaquetas em comparação a controle histórico (15 *versus* 24 e 49 *versus* 89 dias, respectivamente), bem como reduziu o tempo de internação hospitalar (30 *versus* 46 dias), não sendo observado falha de enxertia em nenhum dos transplantes.

A unidade de cordão umbilical expandida com SR1 contribuiu para a enxertia sustentada em 11 dos 17 transplantes, fato não observado com a utilização de cocultura com células mesenquimais e ligante de *notch*, nos quais a participação foi apenas transitória. Encurtamento telomérico excessivo e alterações citogenéticas clonais secundários à expansão celular não foram detectados; além disso, não se observaram efeitos adversos clínicos significativos relacionados à infusão da unidade de cordão umbilical expandida. Contudo, também em relação a controle histórico, não houve diferença estatisticamente significativa na incidência de DECH grave, mortalidade relacionada ao transplante e sobrevida global.

1.3.2 UM171

Fares et al. (2014), também em triagem de biblioteca de 5.280 compostos de baixo peso molecular quanto à capacidade de expansão de células CD34⁺CD45RA⁻ humanas, mobilizadas de sangue periférico de doadores, e por meio de estudos de relação estrutura-atividade, identificaram o derivativo pirimidoindólico UM171 ((1r,4r)-N¹-(2-benzil-7-(2-metil-2H-tetrazol-5-il)-9H-pirimido[4,5-b]indol-4-il)ciclohexano-1,4-diamina), o qual expandiu tal compartimento celular em avaliação por citometria de fluxo, via mecanismo diferente do antagonismo do receptor de aril-hidrocarboneto. Entretanto, assim como SR1, esta droga não aumenta a taxa de divisão celular, apresenta efeito reversível com sua retirada e depende de meio rico em citocinas para induzir proliferação.

Células CD34⁺ de cordão umbilical humano submetidas a cultivo de 12 dias com adição de UM171 retiveram em média a expressão deste marcador em 48% em comparação a 14% em controle (adição do veículo DMSO ≤0,1%), e a 43%, em cultura com adição de SR1. Entretanto, quando da avaliação de populações celulares mais indiferenciadas CD34⁺CD45RA⁻ (DMSO, 2%; SR1, 5%; e UM171, 17%), CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺ (DMSO, 0,16%; SR1,

0,47%; e UM171, 1,49%) e $CD34^+CD38^-CD45RA^-CD90^+CD49f^+$ (DMSO, 0,002%; SR1, 0,015%; e UM171, 0,089%), os cultivos com adição de UM171 apresentaram maior expressão relativa destes imunofenótipos não apenas em comparação ao controle, mas também em relação às aquelas com acréscimo de SR1. A associação de SR1 e UM171 não levou a uma maior retenção da expressão de $CD34^-$ nem dos imunofenótipos mais indiferenciados; contudo, esta combinação potencializou a expansão de CFU-GEMM, bem como a supressão da expansão do compartimento celular $CD34^+$. Desta forma, ambas as drogas contribuem para a expansão de células progenitoras e para a supressão de sua diferenciação, embora UM171 aparente atuar em células mais primitivas que SR1.

Para avaliar a contribuição de CTH-LD na enxertia de camundongos NSG, determinada 20 e 30 semanas após xenotransplante de células $CD34^+$ humanas de cordão umbilical, Fares et al. (2014) utilizaram ensaio de diluição limitante. Em análise após 20 semanas do transplante, foi determinada frequência de uma CTH-LD em 883 células $CD34^+$ não submetidas à expansão em meio de cultivo e frequência de uma CTH-LD em 976, 406, 66 e 31 células $CD34^+$ iniciais, expandidas em meio de cultivo na presença respectiva de DMSO, SR1, UM171 e da combinação das drogas. Após 30 semanas, observou-se uma CTH-LD em 416 células $CD34^+$ não expandidas e em 451, 173, 32 e 33 células $CD34^+$ iniciais, expandidas com adição de DMSO, SR1, UM171 e da associação das drogas, respectivamente. A combinação de SR1 e UM171 não modificou de modo significativo estes números, corroborando o fato de que o sinergismo destas drogas se restringe a células do compartimento progenitor.

Também neste estudo, foi realizado perfil de expressão gênica por sequenciamento do RNA para elucidar o mecanismo de ação de UM171 e compará-lo ao de SR1. Ao contrário de SR1, UM171 levou à acentuada supressão de transcritos relacionados à diferenciação megacariocítica e eritroide e não induziu baixa expressão de genes alvo do receptor de aril-hidrocarboneto. Dentre os genes mais expressos na presença de UM171, observaram-se aqueles que codificam para proteínas de superfície, incluindo-se o receptor endotelial de proteína C (EPCR, do inglês *endothelial protein C receptor*), também denominado receptor de proteína C (PROCR, do inglês *protein C receptor*).

Originalmente conhecido por seu papel de mediar as ações anti-inflamatória, antiapoptótica e de estabilização de barreira endotelial da proteína C ativada, via ativação do receptor ativado por protease-1 (PAR1, do inglês *protease activated receptor-1*) (MOHAN RAO; ESMON; PENDURTHI, 2014), EPCR também corresponde a um conhecido marcador de CTH-LD em murinos (BALAZS et al., 2006). Além disso, a via de sinalização EPCR-PAR1 regula a ancoragem das CTH na medula óssea pela restrição da produção de óxido nítrico e da

atividade da proteína de controle de divisão celular 42 (CDC42, do inglês *cell division control protein 42*), levando a aumento da afinidade da integrina $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) (GUR-COHEN et al., 2015) em camundongos.

Em estudo complementar, Fares et al. (2017) demonstraram que a população de células humanas de cordão umbilical CD34⁺, expandidas com UM171, EPCR⁺ apresentam ótima capacidade de enxertia multilinhagem de curta e longa duração em camundongos imunossuprimidos, em contraste com a população EPCR⁻, e que a atividade de célula-tronco é inversamente proporcional à magnitude de *knockout* do gene *EPCR*. Entretanto, a hiperexpressão artificial de *EPCR* não influenciou a capacidade de enxertia das células CD34⁺, levando o autor a concluir que, embora EPCR seja um confiável marcador de CTH de cordão umbilical tratadas com UM171, sua expressão não reproduz plenamente os efeitos da droga. Além disso, ao contrário dos resultados encontrados em camundongos (GUR-COHEN et al., 2015), não foram observadas diferenças significativas na capacidade de *homing* para a medula óssea entre populações sorteadas EPCR⁺ e EPCR⁻, sugerindo que a expressão de EPCR atue na propriedade de autorrenovação e não na habilidade de *homing* das CTH.

Por meio de múltiplos ensaios de análise de expressão gênica a nível de célula única, permitindo o isolamento de células cultivadas *in vitro* expostas a UM171 em estágios distintos de diferenciação, tanto de SCUP quanto de linhagens celulares hematopoéticas específicas, Chagraoui et al. (2019) observaram que a ativação de programas celulares pró-inflamatórios, notadamente de NFkB, representa requisito fundamental para a expansão de CTH *ex vivo* promovida por UM171. E, em paralelo a este estímulo pró-inflamatório, UM171 ativa uma alça de retroalimentação negativa mediada pela expressão de EPCR, que protege as CTH do estresse oxidativo, estabelecendo um tônus inflamatório dependente de dose e finamente regulado que favoreceria a expansão do compartimento tronco.

Em estudo clínico fase 1/2 (COHEN et al., 2019), 22 pacientes portadores de neoplasia hematológica, com idade entre 19 e 63 anos, foram submetidos à realização de TCTH alogênico com infusão de cordão umbilical único, cujo compartimento CD34⁺ foi expandido *in vitro* por sete dias na presença de UM171, levando a aumento mediano de 28,1 vezes nesta população. As medianas de enxertia de 100 e de 500 neutrófilos por μL observadas foram de 9,5 e 18 dias respectivamente, ao passo que a de plaquetas, de 42 dias, não sendo verificada nenhuma falha de enxertia. Estes resultados foram semelhantes aos de coorte histórica que utilizou fonte de cordão umbilical não manipulado para a realização do transplante, apesar de as unidades de cordão umbilical expandidas com UM171 serem comparativamente menores antes da expansão.

Além disso, observou-se, após 12 meses de seguimento, mortalidade relacionada ao transplante de 5% e sobrevida livre de progressão de 74%, apesar de a amostra de pacientes selecionada apresentar índice de comorbidades para o transplante de células-tronco hematopoéticas (HCT-CI, do inglês *hematopoietic cell transplantation comorbidity index*) mediano de dois e, 36% da mesma, três ou mais; e muitos destes pacientes apresentarem neoplasias hematológicas com alto risco de recaída, incluindo cinco (23%) já terem sido submetidos a TCTH alogênico prévio sem sucesso e outros cinco apresentarem leucemia aguda ou linfoma sem *status* de remissão completa antes do transplante. Também neste mesmo período de acompanhamento, identificou-se baixa incidência de DECH agudo (10%) e nenhum caso de DECH crônico moderado ou grave.

Considerando-se ainda que nenhum efeito adverso inesperado foi observado, este estudo pôde comprovar a viabilidade e segurança da expansão de células CD34⁺ de cordão umbilical expandidas *in vitro* na presença de UM171 para fins clínicos e levantar potenciais benefícios desta droga na diminuição de incidência de DECH agudo e de mortalidade relacionada ao tratamento, preservando os baixos índices de DECH crônico e recaída pós-transplante já esperados com a utilização de fonte de SCUP.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral consiste em avaliar os efeitos de SR1 e UM171 sobre a expansão *in vitro* de células CD34⁺ provenientes de amostras de aspirado de medula óssea de pacientes com anemia aplástica adquirida grave.

Os objetivos específicos são:

- a) Comparar a expansão *in vitro*, na presença de SR1, UM171 e de sua combinação, de células CD34⁺ de pacientes com anemia aplástica adquirida grave.
- b) Realizar caracterização imunofenotípica detalhada do compartimento de células CD34⁺ de pacientes com anemia aplástica adquirida grave, após expansão *in vitro* mediada por SR1, UM171 e por ambas as drogas.
- c) Determinar o perfil de segurança de SR1 e UM171 quanto à indução de anormalidades citogenéticas após expansão *in vitro* de células CD34⁺ de pacientes com anemia aplástica adquirida grave.
- d) Avaliar a influência de SR1 e UM171 sobre o comprimento telomérico de células CD34⁺ de pacientes com anemia aplástica adquirida grave expandidas *in vitro*.
- e) Caracterizar o perfil de expressão gênica de células CD34⁺ de pacientes com anemia aplástica adquirida grave, expandidas *in vitro* na presença de SR1 e UM171.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Definição dos grupos experimentais

Foram convidados a participar do estudo pacientes de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos. Os participantes selecionados foram alocados em dois grupos.

- Grupo controle (C):

Doadores de medula óssea para TCTH alogênico.

- Grupo anemia aplástica (AA):

Pacientes com diagnóstico de anemia aplástica adquirida grave, definido por celularidade à biópsia de medula óssea <25% e pelo menos dois dos três critérios seguintes: contagem de neutrófilos <500/ μ l; plaquetas <20.000/ μ l; e/ou reticulócitos <1% (CAMITTA et al., 1976; BACIGALUPO et al., 1988).

Este grupo foi ainda subdividido em três subgrupos: AA-Rdx, pacientes recém-diagnosticados (ainda não submetidos a tratamento imunossupressor com ATG leporina e CSA nem TCTH alogênico); AA-RP, pacientes com resposta parcial; e AA-RC, pacientes com resposta completa a um ciclo de terapia imunossupressora com ATG leporina e CSA, respectivamente. Para a determinação de resposta, seguiu-se os critérios definidos por Camitta (2000), nos quais a resposta parcial caracteriza-se por obtenção de independência transfusional e ausência de critérios para doença grave, e resposta completa, por presença de hemoglobina normal para a idade, contagem de neutrófilos $\geq 1.500/\mu$ l e de plaquetas $\geq 150.000/\mu$ l.

As seguintes condições foram consideradas fatores de exclusão para ambos os grupos:

- Diagnóstico de neoplasia prévia ou presente;
- Diagnóstico de infecção ativa ou latente;
- Exames sorológicos reagentes para o vírus da imunodeficiência humana 1 e 2, vírus linfotrópico T humano 1 e 2, hepatite B, hepatite C, para doença de Chagas ou sífilis;
- Disfunção cardíaca, pulmonar, renal ou hepática não controlada ou que pudesse se agravar durante procedimento de coleta de medula óssea;
- Doença psiquiátrica que comprometesse participação no estudo;
- Incapacidade de compreensão do termo de consentimento.

3.2 Considerações éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) (CAAE: 37032314.0.0000.5440) em 06/10/2014.

Todos os pacientes tiveram sua participação no estudo condicionada à compreensão dos riscos relacionados ao procedimento de coleta de medula óssea e à aceitação formal por meio da assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) aprovado (Anexos A e B).

3.3 Coleta e armazenamento de aspirado de medula óssea

Os pacientes foram recrutados nos ambulatórios de falências medulares e transplante de células-tronco e progenitoras hematopoéticas do HCFMRP-USP no período entre 30/03/2017 e 11/04/2019. Mediante a necessidade de realização do procedimento de punção e biópsia de medula óssea para diagnóstico ou seguimento da doença hematológica ou em caso de doação de CTPH para fins de transplante alogênico, uma amostra adicional de até 50 ml de aspirado de medula óssea de cada paciente foi obtida por punção em crista ilíaca posterior, sob técnica asséptica e anestesia local.

Cada amostra foi dividida em alíquotas de 5 ml, sendo armazenadas por até 24 horas em temperatura de 4°C, em seringas plásticas estéreis de 20 ml, na presença de 1 ml de heparina não-fracionada 5.000 UI/ml (Cristália, SP, Brasil) e 4 ml de meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (Gibco, MD, EUA) enriquecido com soro bovino fetal (SBF) (Hyclone, UT, EUA) 10%, perfazendo volume de 10 ml por seringa.

3.4 Purificação e cultura de células CD34⁺

Dentro do período de 24 horas após a coleta, as amostras foram submetidas à separação de células mononucleares por gradiente de densidade, utilizando-se meio Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, MO, EUA), conforme especificações do fabricante. O *pool* de células mononucleares obtido foi tratado com solução de lise de hemácias, incubado com microesferas magnéticas anti-CD34 (CD34 MicroBead Kit-Miltenyi Biotec, CA, EUA), e, em seguida, submetido à separação de células CD34⁺ em coluna imunomagnética (MiniMACS Starting Kit-Miltenyi Biotec, CA, EUA), de acordo com instruções do fabricante.

Alíquotas da amostra resultante foram destinadas à contagem de células totais nucleadas (CTN) em câmara de Neubauer e à avaliação por citometria de fluxo da viabilidade celular e da pureza de células $CD34^+$. Para análise da viabilidade celular, utilizou-se o corante 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BD Pharmingen, BD Biosciences, CA, EUA), sendo consideradas viáveis as células não marcadas pelo mesmo (Figura 1). Para determinação da pureza de células $CD34$, os marcadores anti- $CD45$ APC (BD Pharmingen) e anti- $CD34$ PE (BD Pharmingen) foram utilizados (Figura 2). Para ambos os experimentos, as células foram quantificadas pela aquisição no citômetro de oito cores FACS Canto II (BD Biosciences), com auxílio do programa BD FACS Diva Software (BD Biosciences).

Figura 1 - Mensuração da viabilidade celular de amostra do paciente AA6, antes da expansão em meio de cultivo. Nesta amostra 86,5% das células foram consideradas viáveis.

Figura 2 - Mensuração da pureza de células $CD34^+$ de amostra do paciente AA6, após separação em coluna imunomagnética, antes da expansão em meio de cultivo. Nesta amostra 96,8% das células foram consideradas $CD45^+CD34^+$.

Após obtenção dos resultados acima, as células $CD34^+$ foram cultivadas em suspensão no meio líquido de expansão para células-tronco hematopoéticas StemSpan SFEM II (STEMCELL Technologies, MA, EUA), suplementado com as citocinas humanas recombinantes trombopoetina, IL-3, IL-6, ligante de Flt-3 e fator de célula-tronco (StemSpan $CD34^+$ Expansion Supplement 10x - STEMCELL Technologies) a 10% e com os antibióticos penicilina 10.000 UI/ml e estreptomicina 10 mg/ml (Pen-Strep-Sigma Aldrich) a 1%, em placas

de fundo plano de 96 poços (BD Falcon, BD Biosciences), sendo mantidas em incubadora de CO₂ a 5%, na temperatura de 37°C, por período máximo de duas semanas. Alíquotas de 1×10^3 células CD34⁺ (200 µl) por poço foram pareadas em quatro grupos: a) DMSO: com adição de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, MO, EUA) 0,1%; b) SR1: com adição de SR1 (Cayman Chemical, MI, EUA) 1 µM; c) UM171: com adição de UM171 (STEMCELL Technologies) 35 nM; d) COMBI: com adição de SR1 1 µM e UM171 35 nM. Para cada amostra de medula óssea, o número de alíquotas cultivadas por grupo experimental variou de cinco a 10, a depender do número de células CD34⁺ obtidas no processamento inicial. Durante este período, procedeu-se a trocas seriadas da metade do meio em cultivo na mesma composição, com periodicidade de três vezes por semana. Especificamente para o ensaio de sequenciamento do RNA, alíquotas de 5×10^3 (1000 µl) e 10×10^3 células CD34⁺ (2000 µl) foram cultivadas em placas de fundo plano de 24 e 12 poços (BD Falcon, BD Biosciences) respectivamente, mantendo-se a mesma proporção de meio de cultivo e suplementos. Neste experimento em particular, como o cultivo celular foi encerrado em 72 horas, não houve troca do meio.

Após período máximo de duas semanas de cultivo, alíquotas dos quatro grupos experimentais derivados de cada amostra de medula óssea foram coletadas para quantificação de CTN e análise de viabilidade celular, com método semelhante ao acima especificado. A quantificação de CTN foi realizada individualmente para cada um dos grupos experimentais, ao passo que a viabilidade celular foi avaliada a partir de *pool* formado por alíquotas dos quatro grupos.

3.5 Análise imunofenotípica

Após separação de células mononucleares, quando do processamento inicial de cada amostra de medula óssea, e após duas semanas de cultivo em meio líquido, quando do encerramento do mesmo, análise multiparamétrica para o fenótipo de células-tronco e progenitoras hematopoéticas (QIAN et al., 2006; MAJETI; PARK; WEISSMAN, 2007; NOTTA et al., 2011; DOULATOV et al., 2012; HUNTSMAN et al., 2015) foi realizada no citômetro de oito cores FACS Canto II (BD Biosciences), com auxílio do programa BD FACS Diva Software (BD Biosciences), para alíquota de células mononucleares pré-expansão em meio de cultivo líquido e para alíquotas dos quatro grupos experimentais cultivados (DMSO, SR1, UM171 e COMBI). O número de eventos adquiridos variou de 50×10^3 a 1×10^6 a depender da celularidade obtida da amostra.

Painel imunofenotípico contendo nove marcadores foi utilizado, conforme especificações do fabricante: anti-CD34 APC-Cy7 (BioLegend, CA, EUA), anti-CD45 APC (BD Pharmingen), anti-CD38 PE-Cy7 (BD Pharmingen), anti-CD90 BV510 (BD Pharmingen), anti-CD45RA FITC (BD Pharmingen), anti-CD49f PE-Cy5 (BD Pharmingen), anti-CD135 PE (BD Pharmingen), anti-CD7 PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen) e anti-CD10 BV510 (BD Pharmingen) (Figura 3). Para a marcação de anticorpos e aquisição no citômetro de fluxo de cada amostra, utilizou-se dois tubos, contendo os seguintes marcadores:

- Tubo fenótipo progenitor: anti-CD34, CD45, CD38, CD7, CD10, CD135 e CD45RA;
- Tubo fenótipo tronco: anti-CD34, CD45, CD38, CD45RA, CD90 e CD49f.

Para adequada interpretação dos resultados obtidos, a demarcação das diferentes populações celulares neste painel foi baseada em ensaio *fluorescence minus one*, utilizando-se amostras pré e pós-expansão em meio de cultivo líquido do aspirado de medula óssea do primeiro controle do estudo (C1).

3.6 Ensaio de formação de colônias

Após uma semana de cultivo celular, alíquotas de 1×10^3 células dos quatro grupos experimentais (DMSO, SR1, UM171 e COMBI) derivados de cada amostra de medula óssea, foram ressuspensas em Iscove's Modified Dulbecco's Medium (STEMCELL Technologies) e semeadas em duplicata, em placas de cultivo de 35mm (STEMCELL Technologies) em meio constituído de metilcelulose e suplementado por fator de célula-tronco, fator estimulador de colônias de granulócitos, fator estimulador de colônias de granulócito-monócitos, eritropoetina, IL-3 e IL-6 (MethoCult H4436 - STEMCELL Technologies), conforme especificações do fabricante. Após incubação por 14 dias em incubadora de CO₂ a 5%, na temperatura de 37°C, procedeu-se à quantificação de unidades formadoras de colônia eritroide precoce (BFU-E, do inglês *burst forming unit erythroid*), granulócito-monócito (CFU-GM, do inglês *colony forming unit granulocyte-monocyte*) e multipotencial granulócito-monócito-eritrócito-megacariócito (CFU-GEMM, do inglês *colony forming unit granulocyte-erythrocyte-monocyte-megakaryocyte*), por meio do microscópio de contraste de fase invertido Olympus IX71 (Olympus, FL, EUA), sendo as imagens captadas com a câmera Olympus DP72 (Olympus, FL, EUA), com auxílio do *software* cellSens (Olympus, FL, EUA).

Figura 3 - Painel imunofenotípico de amostra pré-expansão em meio de cultivo líquido do controle C1.

3.7 Citogenética Convencional

Após duas semanas de cultivo celular, alíquotas dos quatro grupos experimentais (DMSO, SR1, UM171 e COMBI) derivadas de amostras de medula óssea do grupo AA foram utilizadas para análise citogenética convencional. Neste experimento, em cada alíquota, foram acrescentados 100 µl do bloqueador de fuso mitótico colchicina (Colcemid 10 µg/ml, Gibco, NY, EUA), sendo as amostras incubadas em estufa de CO₂ a 5%, na temperatura de 37°C, por 30 min. Posteriormente, as amostras foram expostas à solução hipotônica (cloreto de potássio 0,075 mol/l) por 16 minutos, também a 37°C e, em seguida, fixadas em solução de Carnoy, na proporção de metanol e ácido acético três para um, e gotejadas em lâmina de vidro. As bandas foram confeccionadas por técnica de bandeamento G, com uso de tripsina (Gibco, NY, EUA) e tampão fosfato, e coradas com azul de metileno eosina de Wright (Merck, HE, Alemanha). As metáfases foram avaliadas no microscópio Zeiss AXIO Imager (Zeiss, TU, Alemanha), acoplado ao sistema de captura de imagem Applied Spectral Imaging GenASIs (Applied Spectral Imaging, CA, EUA). A partir de cada amostra, sempre que possível, 20 metáfases foram analisadas.

3.8 *Single Nucleotide Polymorphism Array* (SNP-A)

Após duas semanas de cultivo celular, alíquotas celulares dos quatro grupos experimentais (DMSO, SR1, UM171 e COMBI) derivadas de amostras de medula óssea do grupo AA foram destinadas à realização do SNP-A. Para este ensaio, DNA genômico das amostras foi extraído conforme instruções do fabricante (Qiagen DNA kit, CA, EUA). Quantidade e qualidade das amostras extraídas foram checadas por meio de absorbância UV e corrida em gel de agarose a 1%. SNP-A foi realizado de acordo com Affymetrix Genome-Wide Human SNP CytoScan HD (Affymetrix, CA, EUA). Após extração, o DNA foi submetido à digestão, ligação a adaptadores e, em seguida, à amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR). O produto do PCR, após fragmentação e marcação, foi submetido à hibridização, utilizando-se Affymetrix CytoScan Array Gene Chip (Affymetrix), o qual contém as sondas de oligonucleotídeos para todo o genoma, e processado em estação fluídica. Por fim, os chips foram inseridos e escaneados no equipamento Gene Chip Scanner 3000 7G (Affymetrix), com geração dos arquivos de visualização para análise. Controle positivo (DNA genômico Cytoscan-Affymetrix) e negativo (EDTA TE buffer CytoScan-Affymetrix),

recomendados pelo fabricantes, foram utilizados para validação dos chips, reagentes e instrumentos.

Os resultados foram analisados por meio do *software* Chromosome Analysis Suite (Affymetrix). Regiões com alteração do número de cópias maiores do que 1 Mb e com perda de heterozigosidade maiores do que 10Mb foram estabelecidas como verdadeiras. Com o objetivo de diferenciar alterações no número de cópias de origem somática das variações polimórficas constitucionais, as alterações identificadas pelo *software* foram comparadas a um banco de dados de variações genômicas (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>). Variações no número de cópias (CNV, do inglês *copy number variation*), representam ganhos e perdas do material genômico identificadas em indivíduos saudáveis e refletem a variação normal do genoma humano.

3.9 Mensuração do comprimento telomérico

Alíquotas de células CD34⁺ pré-expansão e dos quatro grupos experimentais (DMSO, SR1, UM171 e Combi) após duas semanas de cultivo em meio líquido, derivadas de amostras de medula óssea do grupo AA, foram destinadas à análise do comprimento telomérico por qPCR.

O comprimento telomérico foi mensurado baseado em uma modificação do método publicado por Cawthon (2002), conforme previamente descrito (SCHEINBERG et al., 2010; CALADO et al., 2012; GUTIERREZ-RODRIGUES et al., 2014). DNA genômico foi extraído das alíquotas com uso de Gentra Puregene Blood kit (Qiagen, Maryland, EUA). Amostras de DNA foram armazenadas a -20°C, em concentração de 50 ng/μl. Diluições de 0,2 ng/μl foram utilizadas para cada corrida. Quantidade e qualidade das amostras extraídas foram checadas por meio de absorbância UV e corrida em gel de agarose a 1%. qPCR foi conduzido em triplicata e reagentes incluíram: 8 microlitros do DNA genômico (0,2 ng/μl), 2x Rotor Gene SYBR Green dye (Qiagen, NW, Alemanha), PCR Master Mix (Qiagen), água livre de RNase (Quiagen), *primer tel forward* (300nM) e *tel reverse* (300nM) ou *primer single gene forward* (36B4 R-500nM) e *single gene reverse* (36B4 R-500nM) em uma reação final de 24 uL. *Primers* foram previamente descritos por Brouillette et al. (2007). Todas as reações de qPCR foram preparadas no pipetador automático QIAgility (Qiagen, CA, EUA) e amplificação foi conduzida no termociclador de PCR em tempo real Rotor-Gene Q (Qiagen): 5 min a 95°C, 25 ciclos (reação telômero) e 35 ciclos (reação gene de cópia única) de 7 seg a 98°C, e 10 seg a 60°C (telômero) e 10 seg a 58°C (gene de cópia única).

O comprimento telomérico para cada amostra foi determinado usando a razão telômero/gene de cópia única (razão T/S) pelo cálculo do $\Delta Ct[Ct(\text{telômero})/Ct(\text{gene de cópia única})]$. A razão T/S para cada amostra (x) foi normalizada para a média da razão T/S de amostra referência (r) [$2^{-(\Delta Ctx - \Delta Ctr)} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$], a qual também foi utilizada na curva de padronização, tanto como amostra referência, quanto como amostra de validação. Em cada corrida, duas amostras referência foram incluídas para validar cada reação. O experimento foi considerado aceitável se a razão T/S da amostra controle variou dentro de 90% do intervalo de variação (0,9-1,10). A correlação entre as medidas de comprimento telomérico por qPCR e por southern blot de fragmento de restrição terminal de uma coorte independente foram utilizadas para converter os valores da razão T/S em kilobases (kb) (GUTIERREZ-RODRIGUES et al., 2014). A equação de regressão linear utilizada foi: comprimento telomérico (kb) = $4,33x + 5,07$ ($R^2 = 0,55$), onde x corresponde ao valor da razão T/S.

3.10 Sequenciamento do RNA (RNA-seq)

Após três dias de cultivo celular, o *pool* de células expandido dos grupos experimentais DMSO, SR1 e UM171, derivadas de amostras de medula óssea do grupo AA foram destinadas à realização do sequenciamento do RNA (RNA-seq). Para este ensaio, procedeu-se à extração de RNA das amostras obtidas por meio do reagente TRIzol (Invitrogen, MA, EUA), conforme instruções do fabricante. Em seguida, o RNA obtido foi purificado, utilizando-se o RNA Clean & Concentrator-25 kit (Zymo Research, CA, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Para esta etapa, empregou-se RNase-Free DNase Set número de catálogo 79254 (Qiagen, NW, Alemanha). Quantidade e qualidade das amostras extraídas foram checadas por meio de absorbância UV, sendo as mesmas armazenadas à temperatura $\leq 70^\circ\text{C}$.

Para o sequenciamento do RNA total em larga escala, utilizou-se o TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation kit (Illumina, CA, EUA) para o preparo das amostras obtidas, conforme especificações do fabricante. A partir de 0,1 a 1 μg de RNA total, procedeu-se à depleção do RNA ribossomal. Em seguida, o RNA restante foi purificado, fragmentado e preparado para a síntese de DNA complementar (cDNA). O cDNA foi obtido por meio de transcrição reversa, utilizando-se hexâmeros randômicos e a enzima transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, CA, EUA), gerando-se assim a primeira fita de DNA complementar (cDNA).

Na sequência, a fita de RNA que gerou a primeira fita de cDNA foi removida, sendo a segunda fita de cDNA sintetizada. Nesta reação, utilizou-se esferas paramagnéticas AMPure

XP beads (Beckman Coulter, CA, EUA) para purificação do cDNA, separando-o do restante de reagentes e enzimas utilizados na reação. Em seguida, adicionou-se adenina às extremidades 3' do cDNA, para possibilitar a ligação de adaptadores, que possuem timina complementar, e impedir a formação de concatâmeros de cDNA. Após a ligação dos adaptadores, foi realizado PCR para enriquecimento seletivo dos fragmentos de cDNA aos quais se ligaram adaptadores em ambas as extremidades, sendo, para isso, usados *primers* complementares aos adaptadores.

Após confecção da biblioteca de cDNA, avaliou-se o tamanho dos fragmentos formados por meio do equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, EUA) e sua quantidade, por meio de PCR em tempo real, empregando-se o KAPA SYBR FAST kit (KAPA Biosystems MA, EUA). Após a quantificação precisa, as bibliotecas foram diluídas, e 1,8 pM de cada uma usado para clusterização em uma *flow cell* e sequenciamento no equipamento Illumina NextSeq 500 Sequencing System (Illumina, CA, EUA), utilizando-se High Output NextSeq 500 V2 kit (Illumina, CA, EUA).

A clusterização consistiu em três etapas: 1) amplificação dos *clusters*; 2) linearização e bloqueio; 3) hibridização dos *primers*. Em primeiro lugar, cada fragmento de cDNA das bibliotecas foi incorporado à superfície da *flow cell*, a qual é coberta com oligonucleotídeos complementares aos adaptadores usados para amplificar o cDNA, dando origem aos *clusters*, ou seja, grupos ou colônias de fragmentos ligados à *flow cell*. Em segundo lugar, procedeu-se às reações de linearização, para retirada dos adaptadores, assegurando à hibridização e ao sequenciamento ocorrer somente em uma das fitas de cada cluster; e bloqueio, referente à neutralização das hidroxilas presentes nas extremidades 3' dos *clusters* linearizados, de modo a se evitar a adição de substratos de fluoróforos ou qualquer outro segmento que não fosse o *primer* de sequenciamento. Em terceiro lugar, uma reação de desnaturação garantiu a formação de moldes de fita simples, os quais foram hibridizados aos *primers* de sequenciamento. Neste momento, a biblioteca ficou pronta para o sequenciamento baseado na tecnologia *sequencing-by-synthesis*, o qual permitiu a leitura massiva e simultânea das sequências de nucleotídeos de milhões de fragmentos de DNA capturados das regiões codificadoras.

As amostras sequenciadas foram, então, analisadas utilizando-se o *pipeline* nf-core/rnaseq versão 1.3 (Zenodo, Suíça). Inicialmente, os dados brutos foram processados com auxílio dos *softwares* FastQC e Trim Galore (Babraham Bioinformatics, Inglaterra), para remoção de adaptadores e análise de qualidade. Em seguida, procedeu-se ao mapeamento das *reads* em relação ao genoma humano de referência hg18 por meio do *software* STAR (DOBIN et al., 2013), e à contagem das *reads* por gene, pelo *software* featureCounts (LIAO; SMYTH;

SHI, 2014). As duplicatas foram identificadas e marcadas com o *software* MarkDuplicate-Picard (Broad Institutes, MA, EUA).

Para descartar a presença de contaminação das amostras com outros organismos, realizou-se análise baseada em similaridade de sequência entre as *reads* sequenciadas e o banco de dados NT do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>), por meio do *software* BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). Analisou-se 10% das sequências geradas por amostra, valorizando-se *hits* com *e-value* $<10^{-6}$ e somente o primeiro *hit* de cada sequência.

Para avaliação do efeito de SR1 e UM171 sobre a expressão de genes relacionados a vias de sinalização específicas, utilizou-se o *software* Web-based Gene Set Analysis Toolkit (WEBGESTALT, www.webgestalt.org), adotando-se a metodologia Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) e os bancos de dados Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <https://www.genome.jp/kegg/>) e REACTOME (<https://reactome.org>). Para análise de interação das proteínas significativamente hipo e hiperexpressas pela ação de SR1 e UM171, empregou-se o *software* STRING versão 11.0 (<https://string-db.org>), sendo adotado escore de confiança na interação de 0,9.

3.11 Análise estatística

A análise estatística e a metodologia Gene Set Enrichment Analysis de colônias e mensuração do comprimento telomérico foi realizada no *software* IBM SPSS Statistics versão 26.0. Foi utilizada estatística descritiva por meio da aplicação de medidas de tendência central, dispersão e frequências. Para as variáveis quantitativas contínuas analisadas, empregou-se média aritmética, mediana e intervalo de confiança de 95% como medidas de tendência central, e desvio padrão e intervalo interquartil, como medidas de dispersão. A normalidade dos dados foi verificada por meio do teste de Shapiro-Wilk. A comparação entre os grupos DMSO, SR1, UM171 e COMBI foi realizada por meio dos testes One-Way ANOVA e *post hoc* de Tukey para os dados paramétricos, e pelos testes Kruskal-Wallis e *post hoc* U de Mann-Whitney com correção de Bonferroni, para os não-paramétricos. O nível de significância adotado foi 5% ($p < 0,05$).

No ensaio RNA-seq, para análise da variável quantitativa discreta número de *reads* por gene, com objetivo de comparar os grupos SR1 e UM171 em relação ao controle interno (DMSO) utilizou-se o *software* DESeq2 (Bioconductor, WA, EUA) (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014), adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e *log 2-fold change* ($\log_2FC$) > 1 .

4. RESULTADOS

Neste estudo, foram utilizadas 22 amostras de aspirado de medula óssea: cinco, provenientes de cinco indivíduos do grupo controle (C); 17, provenientes de 15 indivíduos do grupo anemia aplástica (AA). As amostras AA1, AA6 e AA12 foram coletadas do mesmo paciente, em diferentes momentos do seu acompanhamento. Nenhum dos pacientes incluídos no estudo apresentavam ao diagnóstico manifestações clínicas relacionadas à hemoglobinúria paroxística noturna (HPN), apesar dos níveis mais elevados de clone HPN de dois casos (AA7 e AA9). Além disso, todos os pacientes possuíam ao diagnóstico comprimento telomérico acima do percentil 10 de coorte de referência (GUTIERREZ-RODRIGUES et al., 2014), composta por indivíduos saudáveis, ajustada para a idade, com exceção do paciente AA4, com comprimento telomérico no percentil 7 (Figura 4). Apenas dois pacientes apresentavam alterações citogenéticas ao diagnóstico: trissomia do cromossomo 6 (AA11); e nulissomia do cromossomo Y (AA15). As tabelas 1 e 2 resumem as características clínicas e a estatística descritiva dos grupos experimentais.

Para todas as amostras celulares analisadas, obteve-se taxa de viabilidade celular maior que 85%, com média±desvio-padrão de 94,3±4,9 e 95,8±2,7 para os momentos pré e pós-expansão em meio de cultivo líquido, respectivamente. Por sua vez, a pureza de células CD34⁺ das amostras de aspirado de medula óssea obtida após separação em coluna imunomagnética, imediatamente antes da expansão em meio de cultivo líquido, apresentou taxas distintas a depender do grupo experimental: C, 90,4±10,2; AA-Rdx, 44,2±35; AA-RP, 74,4±12,3; e AA-RC, 83±25,7. Notadamente, a eficiência da purificação correlacionou-se à reserva medular dos grupos estudados.

4.1 Análise imunofenotípica

Para análise do perfil imunofenotípico, foram estudadas cinco amostras do grupo C (C1 a C5) e 11 amostras do grupo AA (AA1 a AA11). As figuras 5 a 20 mostram a média do número absoluto e relativo de células totais nucleadas (CTN) e expressando os fenótipos abaixo listados, a partir de 1.000 células CD34⁺ iniciais, expandidas em meio de cultivo líquido por duas semanas na presença de DMSO, SR1, UM171 ou da combinação de ambas as drogas (COMBI):

- CD34⁺CD45⁺;
- CD34⁺CD45⁺CD38⁻;

- CD34⁺CD45⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻49f⁻ (PMP);
- CD34⁺CD45⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁻49f⁺ (Thy⁻CD49f⁺);
- CD34⁺CD45⁺CD38⁻CD45RA⁻CD90⁺49f⁺ (Thy⁺CD49f⁺);
- CD34⁺CD45⁺CD38⁺;
- CD34⁺CD45⁺CD38⁺CD7⁻CD10⁻CD45RA⁻CD135⁺ (progenitor mieloide comum);
- CD34⁺CD45⁺CD38⁺CD7⁻CD10⁻CD45RA⁺CD135⁺ (progenitor granulócito-monócito);
- CD34⁺CD45⁺CD38⁺CD7⁻CD10⁻CD45RA⁻CD135⁻ (progenitor megacariócito-eritrócito).

As figuras 6 a 11 remetem à análise dos grupos C e AA, ao passo que as figuras 12 a 20 apresentam os dados dos subgrupos AA-Rdx, AA-RP e AA-RC. Para o estudo do número de CTN e expressando os fenótipos CD34⁺, CD34⁺CD38⁻ e CD34⁺CD38⁺, todas as amostras utilizadas foram incluídas; contudo, não foi possível estender a análise para os demais fenótipos em duas amostras do grupo AA (AA1 e AA9, ambas do subgrupo AA-Rdx), devido à quantidade muito baixa de células expandidas.

Com relação ao número de CTN expandido, observou-se uma maior capacidade proliferativa das amostras do grupo C *versus* as do grupo AA e, na análise dos subgrupos AA, um resgate parcial desta capacidade diretamente proporcional à resposta à terapia imunossupressora. A exposição às diferentes drogas não determinou diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos; entretanto, um maior tamanho amostral poderia confirmar a tendência de maior capacidade proliferativa relacionada à exposição a UM171 (Figura 5).

A exposição a UM171 também levou à retenção do fenótipo CD34⁺ tanto no grupo C, quanto no grupo AA (Figuras 6 e 7). Todos os subgrupos AA apresentaram a mesma tendência global, embora com perda do poder estatístico devido ao tamanho amostral reduzido (Figuras 12 a 14). A exposição à SR1, entretanto, não se mostrou estatisticamente superior na retenção do fenótipo CD34⁺ em comparação ao controle interno (DMSO), embora esta análise possa ter sido prejudicada pelo baixo tamanho amostral (Figuras 6, 7 e 12 a 14). A expressão de CD38, por sua vez, não foi influenciada pela exposição às diferentes drogas em nenhum dos grupos (Figuras 6, 7 e 12 a 14).

Além disso, ao contrário de SR1, UM171 mostrou-se capaz de reter os fenótipos primitivos Thy⁻CD49f⁺ e Thy⁺CD49f⁺ em detrimento do fenótipo progenitor Thy⁻CD49f⁻ em ambos grupos C e AA (Figuras 8 e 9), com tendência global também preservada na análise dos subgrupos AA (Figuras 15 a 17). A figura 21 ilustra o efeito das diferentes drogas na expansão do compartimento tronco. Com relação à análise das populações progenitoras mieloide comum,

granulócito-monócito e megacariócito-eritrócito, não se observaram diferenças estatisticamente significativas na comparação da exposição às diferentes drogas em nenhum dos grupos (Figuras 10, 11 e 18 a 20).

4.2 Ensaio de formação de colônias

Para análise de unidades formadoras de colônia, foram utilizadas cinco amostras do grupo controle (C1 a C5) e 9 amostras do grupo AA: quatro do subgrupo AA-Rdx (AA2, AA3, AA7 e AA9), duas do AA-RP (AA6 e AA11) e três do AA-RC (AA4, AA5 e AA10). As figuras 21 a 25 mostram a média do número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquotas de 1.000 células provenientes do cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período, dos grupos C e AA (Figuras 22 e 23) e dos subgrupos AA-Rdx, AA-RP e AA-RC (Figuras 24 a 26).

Com relação ao número total estimado de unidades formadoras de colônia, observou-se uma maior capacidade proliferativa das amostras do grupo C *versus* as do grupo AA e, na análise dos subgrupos AA, um resgate parcial desta capacidade diretamente proporcional à resposta à terapia imunossupressora, mais evidente na comparação entre os subgrupos AA-Rdx e AA-RC. Isto também fica claro do ponto de vista qualitativo, pela observação de colônias individuais muito maiores no grupo C e subgrupo AA-RC, em comparação ao subgrupo AA-Rdx (Figura 27). Por outro lado, não foi detectada diferença estatisticamente significativa em relação à exposição às diferentes drogas em nenhum dos grupos analisados. Um maior tamanho amostral, entretanto, poderia confirmar a tendência de maior capacidade proliferativa relacionada à exposição a UM171 e, especialmente à combinação de SR1 e UM171, achados mais evidentes na análise dos subgrupos AA-RP e AA-RC, às custas principalmente do aumento de CFU-GM.

4.3 Avaliação citogenética e SNP-A

Para avaliação citogenética convencional, foram analisadas quatro amostras do grupo AA: uma do subgrupo AA-Rdx (AA7), uma do AA-RC (AA10) e duas do AA-RP (AA8 e AA11). Para análise por SNP-A, foram utilizadas as mesmas amostras com exceção da AA11. As figuras 28 e 29 ilustram a análise por citogenética convencional e SNP-A empregadas. Após duas semanas de expansão em meio de cultivo líquido, independentemente da droga testada,

nenhuma anormalidade citogenética nova foi identificada, tanto por análise citogenética convencional, quanto por SNP-A. A tabela 3 mostra os resultados dos cariótipos encontrados por análise citogenética convencional. Nota-se que em quatro cariótipos foram estudadas menos de 20 metáfases devido ao baixo índice mitótico destas amostras. A trissomia do cromossomo 6, alteração previamente identificada no cariótipo do diagnóstico do paciente AA11, foi também observada na análise das amostras expandidas em meio de cultivo líquido, o que contribuiu para a validação da análise.

4.4 Comprimento telomérico

Para avaliação do comprimento telomérico, foram utilizadas três amostras do grupo AA: duas do subgrupo AA-RP (AA8 e AA11) e uma do AA-RC (AA10). A figura 30 mostra a média da razão T/S por qPCR do comprimento telomérico final, após duas semanas de expansão em meio de cultivo líquido, e a média da diferença entre o comprimento telomérico final e o inicial (pré-expansão). Embora a exposição às diferentes drogas não determinou diferenças estatisticamente significativas em nenhum dos grupos, a análise de um maior tamanho amostral poderia confirmar a tendência de diminuição do atrito telomérico relacionada à presença de SR1.

4.5 RNA-seq

Para estudo do transcriptoma, foram utilizadas seis amostras do grupo AA: uma do subgrupo AA-Rdx (AA16); três do AA-RP (AA12, AA14 e AA15); e duas do AA-RC (AA13 e AA17). Entretanto, por questões de baixa qualidade ou quantidade insuficiente de RNA obtido, foram excluídas da análise duas amostras do subgrupo DMSO (AA13 e AA15), quatro do SR1 (AA13 a 16) e duas do UM171 (AA14 e AA15).

Em relação ao controle interno (DMSO), identificou-se 292 e 89 genes significativamente hipo e hiperexpressos pela exposição a SR1 e, 74 e 251 genes, pela exposição a UM171, respectivamente. Enriquecimento estatisticamente significativo de genes relacionados a vias de sinalização específicas associado à exposição a SR1 e UM171 em comparação a DMSO não foi observado, embora o pequeno tamanho amostral limite uma interpretação definitiva dos dados.

A figura 31 mostra a interação entre proteínas transcritas pelos genes com expressão significativamente modificada devido à exposição a SR1 e UM171. Destacam-se a

hipoexpressão de CYP2J2 e CYP4F2, proteínas da família do citocromo P450, mediada por SR1; e a hiperexpressão de PROCR, por UM171.

Mapas de calor foram confeccionados para análise de expressão comparativa, em relação à exposição a DMSO, SR1 e UM171, de genes alvo do receptor de aril-hidrocarboneto (Figura 32), relacionados à diferenciação das linhagens megacariocítica, eritroide e granulocítica-monocítica (Figura 33), ao complexo da telomerase (Figura 34), e genes reconhecidamente associados ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas (Figura 35). Com exceção do efeito inibitório de SR1 sobre o receptor de aril-hidrocarboneto, não foi possível observar outros padrões de interferência destas drogas com a expressão dos genes analisados nos demais mapas de calor, muito embora o pequeno tamanho amostral impossibilite uma conclusão definitiva.

Figura 4 - Comprimento telomérico ao diagnóstico dos pacientes incluídos no estudo em comparação à coorte de indivíduos saudáveis, de acordo com a idade. Todos os pacientes apresentavam comprimento telomérico acima do percentil 10, com exceção de AA4, com comprimento telomérico no percentil 7.

Tabela 1 - Características clínicas dos grupos experimentais. N/A, não se aplica. #, estudo não realizado. *, paciente portador de anemia aplástica adquirida recém-diagnosticado. ¶, amostras coletadas do mesmo indivíduo em diferentes momentos do seu seguimento. HPN: hemoglobinúria paroxística noturna.

Controle (C) Paciente (AA)	Sexo	Idade, anos	Clone HPN E ao diagnóstico, %	Clone HPN G ao diagnóstico, %	Cariótipo ao diagnóstico	Comprimento telomérico ao diagnóstico, kb	Resposta ao tratamento
C1	M	31	#	#	#	#	N/A
C2	F	27	#	#	#	#	N/A
C3	M	27	#	#	#	#	N/A
C4	F	29	#	#	#	#	N/A
C5	M	29	#	#	#	#	N/A
AA1¶	M	20	5,22	0	46, XY[20]	7,9	N/A*
AA2	M	23	0	1,20	46, XY[20]	7,6	N/A*
AA3	F	20	0	0,01	46, XX[20]	7,1	N/A*
AA4	M	24	0	0	46, XY[20]	6,2	Completa
AA5	M	53	#	#	#	5,9	Completa
AA6¶	M	20	5,22	0	46, XY[20]	7,9	Parcial
AA7	M	24	6	60	46, XY[20]	9,9	N/A*
AA8	F	53	0	0	Inconclusivo	7	Parcial
AA9	F	19	6,24	43	Inconclusivo	7,1	N/A*
AA10	M	19	0	0	46, XY [20]	8,5	Completa
AA11	M	53	5	13	47,XY+6[10], 46,XY[10]	7,3	Parcial
AA12¶	M	22	5,22	0	46, XY[20]	7,9	Parcial
AA13	M	31	#	#	#	7,3	Completa
AA14	F	58	1,90	2,59	46, XX[20]	9	Parcial
AA15	M	73	0	0,06	45,X,Y[3]/46XY[9]	5,51	Parcial
AA16	M	73	0,14	0,14	Inconclusivo	5,5	N/A*
AA17	M	32	0	0	#	8,2	Completa

Tabela 2 - Estatística descritiva dos grupos experimentais. DP, desvio padrão. N/A, não se aplica.

	Grupo AA	Grupo controle
Sexo	13M/4F	3M/2F
Idade, anos - média (DP)	34,5 (17,5)	28,6 (1,7)
Clone HPN E ao diagnóstico, % - média (DP)	2,1 (2,7)	-
Clone HPN G ao diagnóstico, % - média (DP)	8 (18,3)	-
Cariótipo ao diagnóstico, f (%)		
Normal	9 (53)	-
Alterado	2 (12)	-
Inconclusivo	3 (17,5)	-
Não realizado	3 (17,5)	-
Comprimento telomérico ao diagnóstico, kb - média (DP)	7,40 (1,19)	-
Resposta ao tratamento, f (%)		
Parcial	6 (35)	-
Completa	5 (30)	-
N/A	6 (35)	-

Figura 5 - Número absoluto de células totais nucleadas (CTN), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais. A, grupo controle (n=5). B, grupo AA (n=11): B1, subgrupo AA-Rdx (n=5); B2, subgrupo AA-RP (n=3); B3, subgrupo AA-RC (n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1.

Figura 6 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo controle, n=5). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1.

Figura 7 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo AA, n=11). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1.

Figura 8 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁻45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo controle, n=5). * p < 0,05 vs DMSO; † p < 0,05 vs SR1.

Figura 9 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁻45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁻45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (grupo AA, n=9). * p < 0,05 vs DMSO; † p < 0,05 vs SR1.

Figura 10 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos $CD34^{+}38^{+}7^{-}10^{-}45RA^{-}135^{+}$ (A), $CD34^{+}38^{+}7^{-}10^{-}45RA^{+}135^{+}$ (B) e $CD34^{+}38^{+}7^{-}10^{-}45RA^{-}135^{-}$ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células $CD34^{+}$ iniciais (grupo controle, n=5). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1.

Figura 11 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos $CD34^{+}38^{+}7^{-}10^{-}45RA^{-}135^{+}$ (A), $CD34^{+}38^{+}7^{-}10^{-}45RA^{+}135^{+}$ (B) e $CD34^{+}38^{+}7^{-}10^{-}45RA^{-}135^{-}$ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células $CD34^{+}$ iniciais (grupo AA, n=9). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1.

Figura 12 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA Rdx, n=5). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1.

Figura 13 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA RP, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1.

Figura 14 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺ (A), CD34⁺38⁻ (B) e CD34⁺38⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA RC, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1.

Figura 15 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁺45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁺45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA-Rdx, n=3). * p < 0,05 vs DMSO; † p < 0,05 vs SR1.

Figura 16 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁺45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁺45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA-RP, n=3). * p < 0,05 vs DMSO; † p < 0,05 vs SR1.

Figura 17 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺45RA⁻90⁻49f⁻ (A), CD34⁺38⁺45RA⁻90⁻49f⁺ (B) e CD34⁺38⁺45RA⁻90⁺49f⁺ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA-RC, n=3). * p < 0,05 vs DMSO; † p < 0,05 vs SR1.

Figura 18 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺7-10-45RA⁻135⁺ (A), CD34⁺38⁺7-10-45RA⁺135⁺ (B) e CD34⁺38⁺7-10-45RA⁻135⁻ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA Rdx, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1.

Figura 19 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺7-10-45RA⁻135⁺ (A), CD34⁺38⁺7-10-45RA⁺135⁺ (B) e CD34⁺38⁺7-10-45RA⁻135⁻ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA RP, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1.

Figura 20 - Número absoluto (1) e relativo (2) de células expressando os fenótipos CD34⁺38⁺7-10-45RA⁻135⁺ (A), CD34⁺38⁺7-10-45RA⁺135⁺ (B) e CD34⁺38⁺7-10-45RA⁻135⁻ (C), após duas semanas de cultivo de 1.000 células CD34⁺ iniciais (subgrupo AA RC, n=3). * p< 0,05 vs DMSO; † p< 0,05 vs SR1.

Figura 21 - Análise imunofenotípica comparativa do compartimento tronco entre os subgrupos, após duas semanas de cultivo em meio líquido de amostra do paciente AA5.

Figura 22 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (grupo controle, n=5). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1.

Figura 23 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (grupo AA, n=9). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1.

Figura 24 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (subgrupo AA Rdx, n=4). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1.

Figura 25 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (subgrupo AA RP, n=2). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1.

Figura 26 - Número estimado de unidades formadoras de colônia eritróide precoce (BFU-E), granulócito-monócito (CFU-GM) e granulócito-eritócito-monócito-megacariócito (CFU-GEMM), a partir de alíquota de 1.000 células provenientes de cultivo em meio líquido por uma semana, corrigido pelo total células expandidas neste período (subgrupo AA RC, n=3). * $p < 0,05$ vs DMSO; † $p < 0,05$ vs SR1.

Figura 27 - Fotomicrografias de unidades formadoras de colônia BFU-E (1), CFU-GM (2) e CFU-GEMM (3) originadas de semeadura de células CD34⁺ expandidas em meio de cultivo líquido por uma semana na presença de SR1 e UM171 (subgrupo COMBI), derivadas de amostras de medula óssea de C1 (A), AA2-Rdx (B) e AA4-RC (C). Aumento de 40x.

Tabela 3 - Análise citogenética convencional comparativa entre os subgrupos, após duas semanas de cultivo em meio líquido, das amostras dos pacientes AA7, AA8, AA10 e AA11.

Cariótipo	AA7	AA8	AA10	AA11
DMSO	46,XY[20]	46,XX[8]	46,XY[20]	47,XY,+6[16]/46,XY[4]
SR1	46,XY[20]	46,XX[6]	46,XY[20]	47,XY,+6[19]/46,XY[1]
UM171	46,XY[20]	46,XX[20]	46,XY[20]	47,XY,+6[17]/46XY[3]
COMBI	46,XY[20]	46,XX[12]	46,XY[14]	47,XY,+6[16]/46,XY[4]

Figura 28 - Imagem representativa da análise citogenética convencional e por SNP-A do caso AA7, subgrupo SR1, demonstrando um cariótipo masculino normal. O sinal localizado no topo dos painéis representa o valor do número de cópias (NC). E o localizado na base, os dados do genótipo ou frequência dos alelos A e B.

Cromossomo 4

Figura 29 - Imagem representativa ampliada da análise por SNP-A do cromossomo 4 do caso AA7, subgrupo SR1, sem alterações detectadas. O sinal no topo do painel representa o número de cópias (NC). E o localizado na base, os dados do genótipo ou frequência dos alelos A e B.

Figura 30 - Delta: diferença de comprimento telomérico medido pela razão T/S por qPCR entre o valor basal pré-expansão e os valores após duas semanas de expansão em meio de cultivo líquido (n=3). Final: comprimento telomérico medido pela razão T/S por qPCR dos valores após duas semanas de expansão em meio de cultivo líquido (n=3).

Figura 31 - Interação de proteínas com expressão significativamente alterada pela exposição a SR1 (A) e UM171 (B) em relação a DMSO. Destacam-se a hipoeexpressão de CYP2J2 e CYP4F2 mediada por SR1; e a hiperexpressão de PROCR, por UM171.

Figura 32 - Mapa de calor mostrando a expressão de genes alvo do receptor de aril-hidrocarboneto. Nota-se padrão de inibição de SR1 sobre estes genes. Escala de expressão em *log 2-fold change*.

Figura 33 - Mapa de calor mostrando a expressão de genes relacionados à diferenciação das linhagens megacariocítica (MK), eritroide (Ery) e granulocítica-monocítica (GM). Escala de expressão em *log 2-fold change*.

Figura 34 - Mapa de calor mostrando a expressão de genes relacionados ao complexo da telomerase. Escala de expressão em *log 2-fold change*.

Figura 35 - Mapa de calor mostrando a expressão de genes associados ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas. Escala de expressão em *log 2-fold change*.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que UM171 é capaz de expandir de modo eficaz *in vitro* células CD34⁺ humanas da medula óssea de pacientes com AAa, inibindo sua diferenciação e mantendo a expressão de fenótipos mais primitivos. O processo de expansão parece seguro, pois não induz instabilidade genética e cromossômica ou erosão telomérica excessiva. Por outro lado, SR1 não foi capaz de induzir expansão semelhante, como anteriormente descrito em células CD34⁺ humanas de SCUP e mobilizadas de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

Recentemente, a adição de EPAG ao tratamento da AAa grave estabeleceu um divisor de águas tanto na abordagem terapêutica, quanto na compreensão da fisiopatogenia desta enfermidade. Além de agregar taxas de resposta maiores e mais robustas aos pacientes sem indicação ao TCTH alogênico, confirmou a hipótese de que a utilização de uma estratégia direcionada à expansão do compartimento de CTPH exaurido pelo dano imune, de fato, poderia transpor a barreira de resultados já atingidos com a terapia imunossupressora isoladamente (SCHEINBERG, 2018a, 2018b).

No entanto, o uso clínico de EPAG na AAa ainda gera preocupação devido ao seu potencial risco de induzir evolução clonal maligna em longo prazo. Esta preocupação foi inicialmente gerada pela observação de blastos circulantes e evolução para LMA em pacientes com SMD em uso de romiplostim, outro agonista sintético de TPO (PRICA; SHOLZBERG; BUCKSTEIN, 2014). Na AAa grave refratária, também foi identificada uma frequência elevada de casos com evolução clonal após o uso de EPAG, em especial com desenvolvimento de monossomia do cromossomo 7 (OLNES et al., 2012; WINKLER et al., 2019). Contudo, a maior evolução para LMA de pacientes com SMD em uso de EPAG não se confirmou em outros dois estudos clínicos (PLATZBECKER et al., 2015; OLIVA et al., 2017), bem como a adição de EPAG à terapia imunossupressora em primeira linha no tratamento da AAa grave não produziu maior incidência de evolução clonal (TOWNSLEY et al., 2017).

Muito embora a administração de EPAG não claramente modifique a incidência cumulativa de evolução clonal em comparação à história natural da AAa grave, tanto no tratamento de primeira linha, quanto no da doença refratária, o surgimento de anormalidades citogenéticas ocorre mais precocemente, particularmente nos primeiros seis meses de uso da droga, o que sugere que EPAG promova a expansão de clones pré-existentes quiescentes (SCHEINBERG, 2018a; WINKLER et al., 2019). Por tudo isso, essa questão ainda permanece em aberto. Em nosso trabalho, a adição *ex vivo* de SR1 e UM171 para expansão de precursores

hematopoéticos se mostrou segura, sem gerar alterações cromossômicas ou outras evidências de expansão de clones aberrantes, o que permite maior exploração de seus usos em ensaios pré-clínicos e clínicos.

Além disso, apesar de EPAG aumentar de modo expressivo as taxas de resposta obtidas com a terapia imunossupressora isoladamente na AAa grave, a descontinuação de seu uso leva à recaída em número expressivo de pacientes, níveis semelhantes ou até mesmo maiores que as taxas de recaída de controles históricos utilizando ATG equina e CSA isoladamente (TOWNSLEY et al., 2017), sendo em muitos casos necessário o uso continuado da droga para manutenção da resposta obtida (WINKLER et al., 2019). Assim, a descoberta de drogas com efeito associativo ao EPAG, mais do que aprofundar as taxas iniciais de resposta, poderia diminuir o risco de recaída ainda bastante significativo.

Na última década, inúmeros estudos têm sugerido que a expansão de CTH *ex vivo* pode ser factível. Isto se deve em grande parte a um melhor entendimento dos fatores intrínsecos às CTH, bem como dos relacionados ao nicho medular, na regulação do processo de autorrenovação *in vivo* das mesmas. Além disso, um importante avanço decorreu do desenvolvimento de tecnologias de alto rendimento para *screening* aleatório de milhares de moléculas sintéticas que poderiam expandir CTH humanas (KUMAR; GEIGER, 2017). Neste cenário, SR1 (BOITANO et al., 2010) e UM171 (FARES et al., 2014) foram identificados, demonstrando resultados extremamente robustos na expansão de células CD34⁺ humanas derivadas de SCUP ou mobilizadas de sangue periférico de indivíduos saudáveis.

Os resultados expressivos em estudos clínicos fase 1/2 do uso de SR1 (WAGNER et al., 2016) e UM171 (COHEN et al., 2019) na expansão *in vitro* de células CD34⁺ de SCUP, utilizadas para TCTH alogênico, contribuindo tanto para a enxertia precoce, quanto para a de longo prazo, sem acarretar alterações citogenéticas clonais, corroboraram os achados dos ensaios de xenotransplante dos estudos pivotais (BOITANO et al., 2010; FARES et al., 2014), despertando ainda maior interesse nestas drogas. No contexto da AAa grave, a expansão de CTH *in vitro* poderia acelerar a recuperação hematológica em pacientes recém-diagnosticados submetidos a tratamento convencional, por meio da realização de transplante autólogo das mesmas, minimizando os riscos relacionados à pancitopenia e, por consequência, reduzindo a mortalidade precoce; assim como prover *backup* de CTH àqueles pacientes que apresentaram resposta parcial à terapia usual e possuem risco aumentado de recaída, proporcionando melhores resultados ao retratamento.

No presente estudo, a inclusão apenas de pacientes maiores que 18 anos, sem manifestações clínicas e laboratoriais relacionadas à HPN ou a síndromes de falência medular

hereditárias, assim como a detecção de comprimento telomérico acima do primeiro percentil em todos os casos, asseguraram maior homogeneidade à amostra avaliada e confiabilidade de que o mecanismo fisiopatogênico principal relacionado ao desenvolvimento da doença nos pacientes selecionados foi a autoimunidade. A análise de amostras de aspirado de medula óssea de indivíduos saudáveis, por sua vez, garantiu um importante parâmetro de comparação, já que os estudos até então publicados com exposição de SR1 e UM171 a células CD34⁺ humanas haviam utilizado apenas fonte de SCUP e sangue periférico de indivíduos mobilizados (BOITANO et al., 2010; FARES et al., 2014; WAGNER et al., 2016; FARES et al., 2017; PSATHA et al., 2017; COHEN et al., 2019).

Um dos principais desafios ao longo da execução deste estudo, já previsto em sua elaboração, foi a dificuldade na obtenção e purificação de células CD34⁺ dos indivíduos AA-RP e especialmente dos AA-Rdx, devido à paucidade celular verificada. Isto, por exemplo, impediu uma caracterização imunofenotípica detalhada dos compartimentos tronco e progenitor destes pacientes antes da expansão *in vitro*, o que poderia ajudar a esclarecer a questão de a autoimunidade na AAa ser direcionada a todos os compartimentos celulares de modo indistinto ou ser mais acentuada em fenótipos específicos.

Por outro lado, este trabalho mostrou uma maior capacidade proliferativa *in vitro* das células CD34⁺ de indivíduos do grupo C em relação aos do AA, evidenciada tanto no ensaio de imunofenotipagem, quanto no de formação de colônias, o que é resgatado de modo significativo mas apenas parcial com a resposta à terapia imunossupressora. Isto corrobora as hipóteses de que: a) o potencial de autorrenovação das CTPH de pacientes com AAa é afetado pela maior demanda proliferativa atribuída à lesão imune; b) e/ou as CTPH destes pacientes também apresentam defeitos intrínsecos.

Assim como já demonstrado (BOITANO et al., 2010; FARES et al., 2014), a exposição a SR1 e UM171 não promoveu aumento da taxa de divisão celular das células CD34⁺ expandidas *in vitro*. A tendência à maior proliferação observada com UM171 neste estudo pode se justificar por sua maior capacidade de reter a expressão de CD34 em relação a SR1 e DMSO, mantendo por maior tempo o potencial proliferativo das células em cultivo. Além disso, em concordância com os achados de Fares et al. (2014), UM171 também se mostrou capaz de reter os fenótipos primitivos Thy⁻CD49f⁺ e Thy⁺CD49f⁺ em detrimento dos fenótipos progenitores Thy⁻CD49f⁻ e CD34⁺CD38⁻CD45RA⁺, confirmando seu potencial também em células CD34⁺ de pacientes com AAa, mesmo aqueles ainda não previamente tratados.

Todavia, a capacidade previamente conhecida de SR1 reter a expressão de CD34⁺ e dos demais fenótipos progenitores em células CD34⁺ derivadas de SCUP e mobilizadas de sangue

periférico de indivíduos saudáveis (BOITANO et al., 2010) não foi reproduzida neste estudo. Embora o pequeno tamanho amostral possa ter prejudicado a análise e impedido a confirmação da tendência de maior expressão de CD34 em relação ao controle interno (DMSO) tanto no grupo C, quanto no AA, definitivamente a magnitude do efeito de SR1 observada por Boitano et al. (2010) não ficou evidente, apesar de metodologia de cultivo celular e concentração da droga utilizada semelhantes, e efeito já conhecido de SR1 inibir os genes alvo do receptor de aril-hidrocarboneto ter sido demonstrado na análise de expressão gênica.

Isto poderia se justificar pela observação de uma menor intensidade no bloqueio do receptor de aril-hidrocarboneto neste estudo comparado ao pivotal; contudo, ressalta-se que um número maior do que as duas amostras expostas a SR1 sequenciadas seria necessário para confirmar esta hipótese. Alternativamente, características intrínsecas das células CD34⁺ derivadas de pacientes com AAa grave poderia reduzir a susceptibilidade das mesmas à ação de SR1, explicando a ausência de uma resposta robusta no presente estudo. Todavia, as células CD34⁺ derivadas da medula óssea de indivíduos saudáveis expostas a SR1 apresentaram mesmo padrão de expressão imunofenotípica do de pacientes com AAa grave, dado esse que refutaria esta segunda hipótese. Neste sentido, a análise de expressão gênica também das células de medula óssea de indivíduos saudáveis e, em paralelo, de células de SCUP, poderia esclarecer se a redução da intensidade do efeito inibitório do receptor de aril-hidrocarboneto observada estaria, na verdade, vinculada à fonte celular utilizada.

No ensaio de imunofenotipagem, também se observou que a expressão de CD38 não foi modificada por nenhuma das drogas estudadas. Neste contexto, Dorrell et al. (2000) demonstraram que este marcador passa a ser hipoexpresso durante o cultivo *in vitro* de células CD34⁺CD38⁺ de SCUP, e a ausência de sua expressão não necessariamente reflete o isolamento de uma população celular mais primitiva, com maior capacidade de enxertia. Estes dados em conjunto reforçam a hipótese de que CD38 não é um marcador confiável para caracterização de CTH cultivadas *in vitro*.

Além disso, a exposição às diferentes drogas não influenciou a diferenciação do progenitor mieloide comum nos progenitores eritrócito-megacariócito e granulócito-monócito tanto no grupo C, quanto no AA, o que também se evidencia na ausência de um padrão definido de expressão diferencial de genes linhagem específicos na análise do transcriptoma. Estes achados estão na contramão dos estudos previamente publicados utilizando células CD34⁺ derivadas de SCUP e mobilizadas de sangue periférico, nos quais se observou hiperexpressão de genes relacionados à diferenciação eritroide e megacariocítica e hipoexpressão dos associados com a diferenciação granulocítica e monocítica quando da exposição a SR1 e o

oposto, quando da exposição a UM171 (FARES et al., 2014; PSATHA et al., 2017). Embora estes achados possam ser um aspecto peculiar à fonte de células CD34⁺ utilizada, um maior número de amostras sequenciadas seria necessário para uma conclusão definitiva.

Este estudo também não reproduziu o potencial de SR1 e UM171 em expandir o número de unidades formadoras de colônias (BOITANO et al., 2010; FARES et al., 2014). Apesar de os resultados obtidos estarem parcialmente limitados ao pequeno tamanho amostral, impedindo a confirmação da tendência de maior capacidade proliferativa relacionada a UM171 e, em especial, à combinação das drogas, o principal fator limitante provavelmente está relacionado à sementeira de quantidade reduzida de células com potencial clonogênico, vide o número muito pequeno de CFU-GEMM, com várias das amostras, inclusive, não apresentando nenhuma colônia multipotencial. A sementeira em metilcelulose de células com tempo menor de expansão em meio de cultivo líquido do que o período de sete dias adotado e/ou a sementeira de maior quantidade de células por placa do que as 1.000 células utilizadas poderiam imprimir melhor qualidade e confiabilidade aos resultados deste ensaio.

Os mecanismos envolvendo os processos de autorrenovação e bloqueio da diferenciação das CTH mediados por SR1 e UM171 ainda não estão esclarecidos. Kumar e Geiger (2017) especulam que estas drogas devem interferir ou com a regulação de ROS ou com funções metabólicas e mitocondriais. Especificamente em relação a UM171, a ativação de programas celulares pró-inflamatórios finamente regulados, notadamente de NFkB, promove condição essencial para a expansão de CTH *ex vivo* (Chagraoui et al., 2019). Entretanto, uma importante preocupação consiste na hipótese de estas propriedades observadas estarem vinculadas à indução de alterações clonais nas células expostas, o que motivou a realização dos ensaios complementares de citogenética convencional, SNP-A e RNA-seq.

A citogenética metafásica convencional pode detectar alterações cromossômicas balanceadas, como translocações e inversões, e não balanceadas, como trissomias, duplicações e deleções; contudo, apresenta baixa sensibilidade por depender de grande proporção de células clonais na amostra examinada. O SNP-A, por outro lado, apesar de não detectar alterações balanceadas, apresenta resolução maior que a citogenética convencional, permitindo a identificação de microdeleções, microduplicações e perda neutra de heterozigose (DA SILVA et al., 2017).

No pequeno tamanho amostral analisado, não foram detectadas alterações citogenéticas clonais com a exposição a SR1 e UM171, em congruência com os dados observados nos estudos clínicos fase 1/2 utilizando SR1 (WAGNER et al., 2016) e UM171 (COHEN et al., 2019) em células CD34⁺ de SCUP. Especificamente com relação ao paciente AA11, que apresentava ao

diagnóstico trissomia do cromossomo 6, não se observou expansão do clone aberrante na análise citogenética convencional das células expandidas *in vitro* quando da exposição a SR1 e UM171, em comparação a DMSO. Além disso, não se detectou a hiperexpressão de genes envolvidos na gênese de neoplasias hematológicas na análise transcriptômica, achados estes que conferem maior segurança à translação destes resultados à pesquisa clínica.

Ademais, conforme esperado, SR1 e UM171 não induziram encurtamento telomérico maior que o controle interno (DMSO) neste estudo, já que não promovem aumento da taxa de divisão celular (BOITANO et al., 2010; FARES et al., 2014). Isto também minimiza o risco de estas drogas produzirem instabilidade genômica pela diminuição crítica dos telômeros. SR1, inclusive, mostrou tendência de preservar o comprimento telomérico, e a repetição tanto deste ensaio, quanto de análise transcriptômica dos genes relacionados ao complexo da telomerase com maior tamanho amostral se fazem necessários para confirmação desta hipótese, a qual poderia conferir inúmeras aplicações a esta droga.

O pequeno tamanho amostral avaliado também impediu uma análise mais robusta do transcriptoma, não sendo possível a identificação de vias de sinalização ou interações proteicas que pudessem melhor caracterizar os mecanismos de ação implicados no efeito destas drogas sobre o processo de autorrenovação das CTH. Mesmo assim, reproduziu as ações de inibição do receptor de aril-hidrocarboneto, mediado por SR1, e de hiperexpressão de EPCR, por UM171, o que contribuiu para a validação dos ensaios realizados.

Os resultados obtidos no presente estudo indicam que o uso de UM171 pode ser promissor na expansão de precursores hematopoéticos na AAa grave e abre caminho para novas perguntas e investigações. No entanto, é necessário salientar que, diferentemente de camundongos, ainda não foi possível em humanos estabelecer uma relação altamente previsível entre a expressão imunofenotípica das CTH e a sua capacidade funcional de enxertia de longo prazo. Aproximadamente, uma em cada duas ou três células murinas $CD34^+c\text{-Kit}^+Sca\text{-1}^+$ (OSAWA et al., 1996), sem expressão de marcadores linhagem específicos ou, alternativamente, expressando $CD150^+CD244^+CD48^-$ (KIEL et al., 2005), apresentam capacidade de enxertia de longo prazo, ao passo que apenas cerca de 10% das células Thy^+CD49f^+ de SCUP de humanos possuem mesma capacidade funcional (NOTTA et al., 2011), sendo esta proporção ainda menor quando as células Thy^+CD49f^+ purificadas são derivadas de sangue periférico mobilizado (HUNTSMAN et al., 2015).

Além disso, Psatha et al. (2017), em ensaio de xenotransplante de células $CD34^+$ humanas de SCUP, expandidas *in vitro* por 5 dias na presença de SR1 e UM171, identificou que, apesar de UM171 reter de modo mais significativo a expressão dos imunofenótipos

considerados primitivos, a maior capacidade de enxertia foi observada com a adição de SR1, sendo este fenômeno correlacionado à hipoexpressão de genes envolvidos nas vias de sinalização Rap1, Ras e PI3K-Akt nas culturas acrescidas de SR1. Rap1 e Ras ativam a via de sinalização PI3K-Akt, a qual tem sido associada à exaustão do compartimento de CTH (KHARAS, 2010; CHEN, 2017). Por estes motivos, apesar do baixo desempenho de SR1 na retenção de fenótipos mais primitivos no presente estudo, sua atividade na expansão de CTH de pacientes com AAa não pode ser definitivamente rejeitada, ainda mais tendo em vista a possibilidade de esta droga atuar na preservação do comprimento telomérico.

Neste sentido, a realização de ensaio de xenotransplante, em camundongos imunossuprimidos, de células CD34⁺ de aspirado de medula óssea de indivíduos com AAa, expandidas *in vitro* na presença de SR1 e UM171, que corresponde à metodologia padrão-ouro para a validação da capacidade de enxertia destas células, permitiria confirmar o perfil de segurança e as propriedades observadas com estas drogas nos experimentos executados neste trabalho. Esta análise é escopo de novos estudos em nosso laboratório como desdobramento do presente trabalho e seus resultados serão essenciais para a viabilização de estudos clínicos na sequência.

Ensaios clínicos fase 1/2 poderiam envolver dois grupos específicos de pacientes com AAa: a) recém-diagnosticados, nos quais o TCTH autólogo de células CD34⁺ remanescentes expandidas *in vitro*, em associação à terapia convencional, poderia acelerar a recuperação hematológica e minimizar os riscos relacionados à pancitopenia; b) com resposta parcial à terapia inicial, nos quais o risco de recidiva é maior, e a produção de um *backup* de células CD34⁺ criopreservadas, após expansão *in vitro*, poderia ser útil em uma eventual recaída, melhorando as taxas de resposta ao retratamento.

Townsley et al. (2017) observaram resposta hematológica global e completa em seis meses de até 94% e 58%, respectivamente, no tratamento em primeira linha de pacientes com AAa, quando EPAG foi adicionado a ATG equina e CSA. Entretanto, em seguimento com mediana de 18 meses, 54% dos pacientes que suspenderam todo o tratamento com seis meses evoluiu com recaída. Entre os pacientes que inicialmente responderam, o tempo mediano para independência transfusional correspondeu a 32 dias para plaquetas e 39 dias para hemácias e, nos pacientes que apresentavam neutropenia <200/ μ l, o tempo mediano para obtenção de contagem $\geq$ 500/ μ l foi de 48 dias. Embora estes resultados expressivos estabeleceram uma quebra de paradigma na abordagem terapêutica da AAa, é também verdade que o intervalo de tempo até o início da recuperação da hematopoese persiste crítico no tratamento clínico dos

pacientes recém-diagnosticados, muitas vezes insuficiente para evitar desfechos graves relacionados a infecções e sangramentos.

Apesar de no presente estudo ter sido adotado período de até duas semanas de cultivo celular, almejando-se um número expandido de células suficiente para realização de todos os experimentos, e, em particular, caracterização imunofenotípica mais precisa, é um fato que períodos prolongados de cultivo *in vitro* levam à perda de propriedades funcionais das CTH, inclusive da capacidade de enxertia, sendo períodos de no máximo cinco a sete dias de cultivo habitualmente escolhidos para fins de transplante (NIKIFOROW; RITZ, 2016; PSATHA et al., 2017).

Assim, seria possível a manufatura de um produto de células CD34⁺ expandidas *in vitro* para TCTH autólogo, sem necessidade de criopreservação, em pacientes com AAa grave recém-diagnosticados em menos de uma semana, o que parece ser um prazo bastante adequado ao contexto clínico. Em contrapartida, a paucidade de células CD34⁺ encontrada nestes pacientes poderia ser um fator limitante, e ensaios de diluição limitante nos experimentos pré-clínicos de xenotransplante serão muito úteis para a determinação dos primeiros parâmetros de dose *versus* resposta.

Por outro lado, a expansão *ex vivo* de células CD34⁺ de pacientes com AAa grave com resposta parcial ao tratamento de primeira linha, com objetivo de aprofundamento da resposta até então obtida por meio de TCTH autólogo a fresco, ou para fins de criopreservação, mantendo-se *backup* para uma eventual recaída, é do ponto de vista técnico ainda mais factível, tendo em vista a melhor reserva medular destes pacientes. E desta forma, seria este o grupo de pacientes que melhor se candidataria a um primeiro estudo clínico.

Por fim, os resultados dos ensaios pré-clínicos de xenotransplante, bem como dos estudos clínicos fase 1/2 acima hipotetizados, em conjunto com uma melhor compreensão dos mecanismos de ação e propriedades farmacocinéticas *in vivo* de SR1 e UM171, proverão as condições necessárias para o desenvolvimento de fármacos de ação direta a partir destas drogas no futuro.

6. CONCLUSÃO

Este estudo confirmou a propriedade de UM171 conter a diferenciação de células CD34⁺ durante o processo de expansão *in vitro*, inclusive dos fenótipos primitivos Thy⁻CD49f⁺ e Thy⁺CD49f⁺, derivadas de aspirado de medula óssea de pacientes com diagnóstico de AAa. Entretanto, não reproduziu, na mesma magnitude, a capacidade previamente descrita de SR1 reter a expressão de CD34⁺ e dos demais fenótipos progenitores observada em células CD34⁺ derivadas de SCUP e mobilizadas de sangue periférico de indivíduos saudáveis, em amostras de aspirado de medula óssea tanto de indivíduos saudáveis, quanto de portadores de AAa.

Além disso, não identificou o desenvolvimento de alterações clonais, mudança significativa na expressão de genes relacionados a neoplasias hematológicas nem atrito telomérico excessivo durante o processo de expansão *in vitro* de células CD34⁺ derivadas de aspirado de medula óssea de pacientes portadores de AAa, quando da exposição a SR1 e UM171, o que permite inferir que estas alterações não estão implicadas no mecanismo de ação destas drogas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, W.S., et al. Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. **Blood**, v.87, n.6, p.2162-70, 15 mar. 1996.
- ALTSCHUL, S.F., et al. Basic local alignment search tool. **J Mol Biol**, v.215, n.3, p.403-10, 5 out. 1990.
- ALVARADO, L.J., et al. Heterodimerization of TPO and IFN γ impairs human hematopoietic stem/progenitor cell signaling and survival in chronic inflammation. **Blood**, v.130, n.Supp 1, 2017.
- ASADA, N.; TAKEISHI, S.; FRENETTE, P.S. Complexity of bone marrow hematopoietic stem cell niche. **Int J Hematol**, v.106, n.1, p.45-54, jul. 2017.
- BABUSHOK, D.V. A brief, but comprehensive, guide to clonal evolution in aplastic anemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v.2018, n.1, p.457-66, 30 nov. 2018.
- BABUSHOK, D.V., et al. Emergence of clonal hematopoiesis in the majority of patients with acquired aplastic anemia. **Cancer Genet**, v.208, n.4, p.115-28, abr. 2015.
- BABUSHOK, D.V., et al. Single nucleotide polymorphism array analysis of bone marrow failure patients reveals characteristic patterns of genetic changes. **Br J Haematol**, v.164, n.1, p.73-82, jan. 2014.
- BABUSHOK, D.V., et al. Somatic HLA Mutations Expose the Role of Class I-Mediated Autoimmunity in Aplastic Anemia and its Clonal Complications. **Blood Adv**, v.1, n.22, p.1900-10, 10 out. 2017.
- BACIGALUPO, A. Alternative donor transplants for severe aplastic anemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v.2018, n.1, p.467-73, 30 nov. 2018.
- BACIGALUPO, A. How I treat acquired aplastic anemia. **Blood**, v.129, n.11, p.1428-36, 16 mar. 2017.
- BACIGALUPO, A., et al. Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anaemia (SAA): a report of the EBMT SAA working party. **Br J Haematol**, v.70, n.2, p.177-82, out. 1988.
- BALAZS, A.B., et al. Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. **Blood**, v.107, n.6, p.2317-21, 15 mar. 2006.
- BALLMAIER, M., et al. C-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. **Blood**, v.97, n.1, p.139-46, 1 jan. 2001.
- BAO, W., et al. Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. **Blood**, v.116, n.22, p.4639-45, 25 nov. 2010.

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

BENVENISTE, P., et al. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. **Cell Stem Cell**, v.6, n.1, p.48-58, 8 jan. 2010.

BERNARD, C., et al. Thymoma associated with autoimmune diseases: 85 cases and literature review. **Autoimmun Rev**, v.15, n.1, p.82-92, jan. 2016.

BETENSKY, M., et al. Clonal evolution and clinical significance of copy number neutral loss of heterozygosity of chromosome arm 6p in acquired aplastic anemia. **Cancer Genet**, v.209, n.1-2, p.1-10, jan./fev. 2016.

BHATIA, M., et al. A newly discovered class of human hematopoietic cells with SCID-repopulating activity. **Nat Med**, v.4, n.9, p.1038-45, set. 1998.

BHATIA, M., et al. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.10, p.5320-5, 13 maio 1997.

BIRBRAIR, A.; FRENETTE, P.S. Niche heterogeneity in the bone marrow. **Ann N Y Acad Sci**, v.1370, n.1, p.82-96, abr. 2016.

BLACKBURN, E.H. Switching and signaling at the telomere. **Cell**, v.106, n.6, p.661-73, 21 set. 2001.

BLACKBURN, E.H. Telomere states and cell fates. **Nature**, v.408, n.6808, p.53-6, 2 nov. 2000.

BOCK, K.W. From dioxin toxicity to putative physiologic functions of the human Ah receptor in homeostasis of stem/progenitor cells. **Biochem Pharmacol**, v.123, p.1-7, 1 jan. 2017.

BOITANO, A.E., et al. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. **Science**, v.329, n.5997, p.1345-8, 10 set. 2010.

BRODSKY, R.A., et al. High-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia: long-term follow-up. **Blood**, v.115, n.11, p.2136-41, 18 mar. 2010.

BROUILLETTE, S.W., et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. **Lancet**, v.369, n.9556, p.107-14, 13 jan. 2007.

BRUMMENDORF, T.H., et al. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. **Blood**, v.97, n.4, p.895-900, 15 fev. 2001.

CABEZAS-WALLSCHEID, N., et al. Identification of regulatory networks in HSCs and their immediate progeny via integrated proteome, transcriptome, and DNA methylome analysis. **Cell Stem Cell**, v.15, n.4, p.507-22, 2 out. 2014.

CALADO, R.T., et al. Short telomeres result in chromosomal instability in hematopoietic cells and precede malignant evolution in human aplastic anemia. **Leukemia**, v.26, n.4, p.700-7, abr. 2012.

CALADO, R.T.; YOUNG, N.S. Telomere diseases. **N Engl J Med**, v.361, n.24, p.2353-65, 10 dez. 2009.

CAMITTA, B.M. What is the definition of cure for aplastic anemia? **Acta Haematol**, v.103, n.1, p.16-8, 2000.

CAMITTA, B.M., et al. Severe aplastic anemia: a prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality. **Blood**, v.48, n.1, p.63-70, jul. 1976.

CAWTHON, R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res**, v.30, n.10, p.e47, 15 maio 2002.

CHAGRAOUI, J., et al. UM171 induces a homeostatic inflammatory-detoxification response supporting human HSC self-renewal. **PLoS One**, v.14, n.11, p.e0224900, 2019.

CHAN, W.K., et al. Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. **J Biol Chem**, v.274, n.17, p.12115-23, 23 abr. 1999.

CHEN, L., et al. Transcriptional diversity during lineage commitment of human blood progenitors. **Science**, v.345, n.6204, p.1251033, 26 set. 2014.

CHEN, S., et al. Pharmacological inhibition of AKT activity in human CD34(+) cells enhances their ability to engraft immunodeficient mice. **Exp Hematol**, v.45, p.74-84, jan. 2017.

CHENG, Y., et al. First-line choice for severe aplastic anemia in children: Transplantation from a haploidentical donor vs immunosuppressive therapy. **Clin Transplant**, v.32, n.2, fev. 2018.

CHEONG, J.W., et al. Deferasirox improves hematologic and hepatic function with effective reduction of serum ferritin and liver iron concentration in transfusional iron overload patients with myelodysplastic syndrome or aplastic anemia. **Transfusion**, v.54, n.6, p.1542-51, jun. 2014.

CIVIN, C.I., et al. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. **J Immunol**, v.133, n.1, p.157-65, jul. 1984.

CLE, D.V., et al. Rabbit antithymocyte globulin dose does not affect response or survival as first-line therapy for acquired aplastic anemia: a multicenter retrospective study. **Ann Hematol**, v.97, n.11, p.2039-46, nov. 2018.

CLE, D.V., et al. Repeat course of rabbit antithymocyte globulin as salvage following initial therapy with rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. **Haematologica**, v.100, n.9, p.e345-7, set. 2015.

COHEN, S., et al. Hematopoietic stem cell transplantation using single UM171-expanded cord blood: a single-arm, phase 1-2 safety and feasibility study. **Lancet Haematol**, Nov 5 2019.

CONG, Y.S.; WRIGHT, W.E.; SHAY, J.W. Human telomerase and its regulation. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.66, n.3, p.407-25, set. 2002.

CONNEALLY, E., et al. Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in nonobese diabetic-scid/scid mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.94, n.18, p.9836-41, 2 set 1997.

CUTLER, C., et al. Prostaglandin-modulated umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. **Blood**, v.122, n.17, p.3074-81, 24 out. 2013.

DA SILVA, F.B., et al. Single-nucleotide polymorphism array (SNP-A) improves the identification of chromosomal abnormalities by metaphase cytogenetics in myelodysplastic syndrome. **J Clin Pathol**, v.70, n.5, p.435-42, maio 2017.

DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes Dev**, v.19, n.18, p.2100-10, 15 set. 2005.

DE LIMA, M., et al. Cord-blood engraftment with ex vivo mesenchymal-cell coculture. **N Engl J Med**, v.367, n.24, p.2305-15, 13 dez. 2012.

DE LIMA, M., et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. **Bone Marrow Transplant**, v.41, n.9, p.771-8, maio 2008.

DE MASSON, A., et al. Severe aplastic anemia associated with eosinophilic fasciitis: report of 4 cases and review of the literature. **Medicine (Baltimore)**, v.92, n.2, p.69-81, mar. 2013.

DE SAUVAGE, F.J., et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. **Nature**, v.369, n.6481, p.533-8, 16 jun. 1994.

DELANEY, C., et al. Dose-dependent effects of the Notch ligand Delta1 on ex vivo differentiation and in vivo marrow repopulating ability of cord blood cells. **Blood**, v.106, n.8, p.2693-9, 15 out. 2005.

DELANEY, C., et al. Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. **Nat Med**, v.16, n.2, p.232-6, fev. 2010.

DENG, X.Z., et al. Associations between the HLA-A/B/DRB1 polymorphisms and aplastic anemia: evidence from 17 case-control studies. **Hematology**, v.23, n.3, p.154-62, abr. 2018.

DESMOND, R., et al. Eltrombopag restores trilineage hematopoiesis in refractory severe aplastic anemia that can be sustained on discontinuation of drug. **Blood**, v.123, n.12, p.1818-25, 20 mar. 2014.

DING, L.; MORRISON, S.J. Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. **Nature**, v.495, n.7440, p.231-5, 14 mar. 2013.

DOBIN, A., et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v.29, n.1, p.15-21, 1 jan. 2013.

DORRELL, C., et al. Expansion of human cord blood CD34(+)CD38(-) cells in ex vivo culture during retroviral transduction without a corresponding increase in SCID repopulating cell (SRC) frequency: dissociation of SRC phenotype and function. **Blood**, v.95, n.1, p.102-10, 1 jan. 2000.

DOULATOV, S., et al. Hematopoiesis: a human perspective. **Cell Stem Cell**, v.10, n.2, p.120-36, 3 fev. 2012.

DUFOUR, C., et al. Homozygosis for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN-gamma gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. **Br J Haematol**, v.126, n.5, p.682-5, set. 2004.

ECSEDI, M., et al. Use of eltrombopag in aplastic anemia in Europe. **Ann Hematol**, v.98, n.6, p.1341-50, jun. 2019.

ERICKSON-MILLER, C.L., et al. Discovery and characterization of a selective, nonpeptidyl thrombopoietin receptor agonist. **Exp Hematol**, v.33, n.1, p.85-93, jan. 2005.

FARES, I., et al. Cord blood expansion. Pyrimidoindole derivatives are agonists of human hematopoietic stem cell self-renewal. **Science**, v.345, n.6203, p.1509-12, 19 set. 2014.

FARES, I., et al. EPCR expression marks UM171-expanded CD34(+) cord blood stem cells. **Blood**, v.129, n.25, p.3344-51, 22 jun. 2017.

FARES, I., et al. Small molecule regulation of normal and leukemic stem cells. **Curr Opin Hematol**, v.22, n.4, p.309-16, jul. 2015.

FENG, X., et al. Cytokine signature profiles in acquired aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v.96, n.4, p.602-6, abr. 2011.

FOGARTY, P.F., et al. Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA. **Lancet**, v.362, n.9396, p.1628-30, 15 nov. 2003.

GASCON, P.; ZOUMBOS, N.; YOUNG, N. Analysis of natural killer cells in patients with aplastic anemia. **Blood**, v.67, n.5, p.1349-55, maio 1986.

GENOVESE, G., et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. **N Engl J Med**, v.371, n.26, p.2477-87, 25 dez. 2014.

GIDVANI, V.K., et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Interleukin-6 Promoter Gene Polymorphisms in Acquired Bone Marrow Failure Syndromes. **Blood**, v.104, n.11, 2004.

GIUDICE, V., et al. Deep sequencing and flow cytometric characterization of expanded effector memory CD8(+)CD57(+) T cells frequently reveals T-cell receptor Vbeta oligoclonality and CDR3 homology in acquired aplastic anemia. **Haematologica**, v.103, n.5, p.759-69, maio 2018.

GLIMM, H., et al. Previously undetected human hematopoietic cell populations with short-term repopulating activity selectively engraft NOD/SCID-beta2 microglobulin-null mice. **J Clin Invest**, v.107, n.2, p.199-206, jan. 2001.

GONZALEZ-CASAS, R., et al. Systematic review: hepatitis-associated aplastic anaemia--a syndrome associated with abnormal immunological function. **Aliment Pharmacol Ther**, v.30, n.5, p.436-43, 1 set. 2009.

GUR-COHEN, S., et al. PAR1 signaling regulates the retention and recruitment of EPCR-expressing bone marrow hematopoietic stem cells. **Nat Med**, v.21, n.11, p.1307-17, nov. 2015.

GUTIERREZ-RODRIGUES, F., et al. Direct comparison of flow-FISH and qPCR as diagnostic tests for telomere length measurement in humans. **PLoS One**, v.9, n.11, p.e113747, 2014.

HAMZIC, E., et al. Characterization of bone marrow mesenchymal stromal cells in aplastic anaemia. **Br J Haematol**, v.169, n.6, p.804-13, jun. 2015.

HEUSER, M., et al. Genetic characterization of acquired aplastic anemia by targeted sequencing. **Haematologica**, v.99, n.9, p.e165-7, set. 2014.

HOGGATT, J., et al. Prostaglandin E2 enhances hematopoietic stem cell homing, survival, and proliferation. **Blood**, v.113, n.22, p.5444-55, 28 maio 2009.

HORWITZ, M.E., et al. Phase I/II Study of Stem-Cell Transplantation Using a Single Cord Blood Unit Expanded Ex Vivo With Nicotinamide. **J Clin Oncol**, v.37, n.5, p.367-74, 10 fev. 2019.

HORWITZ, M.E., et al. Umbilical cord blood expansion with nicotinamide provides long-term multilineage engraftment. **J Clin Invest**, v.124, n.7, p.3121-8, jul. 2014.

HOSOKAWA, K., et al. Memory Stem T Cells in Autoimmune Disease: High Frequency of Circulating CD8+ Memory Stem Cells in Acquired Aplastic Anemia. **J Immunol**, v.196, n.4, p.1568-78, 15 fev. 2016.

HSU, E.L., et al. A proposed mechanism for the protective effect of dioxin against breast cancer. **Toxicol Sci**, v.98, n.2, p.436-44, ago. 2007.

HUNTSMAN, H.D., et al. Human hematopoietic stem cells from mobilized peripheral blood can be purified based on CD49f integrin expression. **Blood**, v.126, n.13, p.1631-3, 24 set. 2015.

INCIDENCE of aplastic anemia: the relevance of diagnostic criteria. By the International Agranulocytosis and Aplastic Anemia Study. **Blood**, v.70, n.6, p.1718-21, dez. 1987.

ISHII, M., et al. Development of a high-resolution purification method for precise functional characterization of primitive human cord blood-derived CD34-negative SCID-repopulating cells. **Exp Hematol**, v.39, n.2, p.203-13 e1, fev. 2011.

ISSARAGRISIL, S., et al. Incidence of aplastic anemia in Bangkok. The Aplastic Anemia Study Group. **Blood**, v.77, n.10, p.2166-8, 15 maio 1991.

JAISWAL, S., et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. **N Engl J Med**, v.371, n.26, p.2488-98, 25 dez. 2014.

JANG, Y.Y.; SHARKIS, S.J. A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. **Blood**, v.110, n.8, p.3056-63, 15 out. 2007.

JEREZ, A., et al. STAT3 mutations indicate the presence of subclinical T-cell clones in a subset of aplastic anemia and myelodysplastic syndrome patients. **Blood**, v.122, n.14, p.2453-9, 3 out. 2013.

JONES, M., et al. The shelterin complex and hematopoiesis. **J Clin Invest**, v.126, n.5, p.1621-9, 2 maio 2016.

KAKAGIANNI, T., et al. A probable role for trail-induced apoptosis in the pathogenesis of marrow failure. Implications from an in vitro model and from marrow of aplastic anemia patients. **Leuk Res**, v.30, n.6, p.713-21, jun. 2006.

KATAGIRI, T., et al. Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. **Blood**, v.118, n.25, p.6601-9, 15 dez. 2011.

KATAJISTO, P., et al. Stem cells. Asymmetric apportioning of aged mitochondria between daughter cells is required for stemness. **Science**, v.348, n.6232, p.340-3, 17 abr. 2015.

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

KIM, D.W., et al. The RelA NF-kappaB subunit and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) cooperate to transactivate the c-myc promoter in mammary cells. **Oncogene**, v.19, n.48, p.5498-506, 16 nov. 2000.

KHARAS, M.G., et al. Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. **Blood**, v.115, n.7, p.1406-15, 18 fev. 2010.

KOCHENDERFER, J.N., et al. Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. **Blood**, v.100, n.10, p.3639-45, 15 nov. 2002.

KORDASTI, S., et al. Functional characterization of CD4+ T cells in aplastic anemia. **Blood**, v.119, n.9, p.2033-43, 1 mar. 2012.

KULASEKARARAJ, A.G., et al. Somatic mutations identify a subgroup of aplastic anemia patients who progress to myelodysplastic syndrome. **Blood**, v.124, n.17, p.2698-704, 23 out. 2014.

KUMAR, S.; GEIGER, H. HSC Niche Biology and HSC Expansion Ex Vivo. **Trends Mol Med**, v.23, n.9, p.799-819, set. 2017.

KUNISAKI, Y., et al. Arteriolar niches maintain haematopoietic stem cell quiescence. **Nature**, v.502, n.7473, p.637-43, 31 out. 2013.

LANE, A.A., et al. Low frequency clonal mutations recoverable by deep sequencing in patients with aplastic anemia. **Leukemia**, v.27, n.4, p.968-71, abr. 2013.

LANDSDORP, P.M.; SUTHERLAND, H.J.; EAVES, C.J. Selective expression of CD45 isoforms on functional subpopulations of CD34+ hemopoietic cells from human bone marrow. **J Exp Med**, v.172, n.1, p.363-6, 1 jul. 1990.

LAURENTI, E., et al. CDK6 levels regulate quiescence exit in human hematopoietic stem cells. **Cell Stem Cell**, v.16, n.3, p.302-13, 5 mar. 2015.

LAURENTI, E., et al. The transcriptional architecture of early human hematopoiesis identifies multilevel control of lymphoid commitment. **Nat Immunol**, v.14, n.7, p.756-63, jul. 2013.

LEE, J.W., et al. Hematologic responses in patients with aplastic anemia treated with deferasirox: a post hoc analysis from the EPIC study. **Haematologica**, v.98, n.7, p.1045-8, jul. 2013.

LEVESQUE, J.P., et al. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. **Stem Cells**, v.25, n.8, p.1954-65, ago. 2007.

LIAO, Y.; SMYTH, G.K.; SHI, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, v.30, n.7, p.923-30, 1 abr. 2014.

LINDSEY, S.; PAPOUTSAKIS, E.T. The evolving role of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) in the normophysiology of hematopoiesis. **Stem Cell Rev**, v.8, n.4, p.1223-35, dez. 2012.

LIU, C.Y., et al. Fas/FasL in the immune pathogenesis of severe aplastic anemia. **Genet Mol Res**, v.13, n.2, p.4083-8, 30 maio 2014.

LOVE, M.I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol**, v.15, n.12, p.550, 2014.

LUIS, T.C., et al. Canonical wnt signaling regulates hematopoiesis in a dosage-dependent fashion. **Cell Stem Cell**, v.9, n.4, p.345-56, 4 out. 2011.

MAJETI, R.; PARK, C.Y.; WEISSMAN, I.L. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. **Cell Stem Cell**, v.1, n.6, p.635-45, 13 dez. 2007.

MALHOTRA, S.; KINCADE, P.W. Wnt-related molecules and signaling pathway equilibrium in hematopoiesis. **Cell Stem Cell**, v.4, n.1, p.27-36, 9 jan. 2009.

MALUF, E., et al. Incidence and risk factors of aplastic anemia in Latin American countries: the LATIN case-control study. **Haematologica**, v.94, n.9, p.1220-6, set. 2009.

MARLOWE, J.L., et al. The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. **Mol Biol Cell**, v.19, n.8, p.3263-71, ago. 2008.

MARSH, J.C.; GANSER, A.; STADLER, M. Hematopoietic growth factors in the treatment of acquired bone marrow failure states. **Semin Hematol**, v.44, n.3, p.138-47, jul. 2007.

MARSH, J.C.W., et al. Heterozygous RTEL1 variants in bone marrow failure and myeloid neoplasms. **Blood Adv**, v.2, n.1, p.36-48, 9 jan. 2018.

MAZURIER, F., et al. Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. **Nat Med**, v.9, n.7, p.959-63, jul. 2003.

MCCAHON, E., et al. The impact of Asian descent on the incidence of acquired severe aplastic anaemia in children. **Br J Haematol**, v.121, n.1, p.170-2, abr. 2003.

MCKENZIE, J.L., et al. Low rhodamine 123 retention identifies long-term human hematopoietic stem cells within the Lin-CD34+CD38- population. **Blood**, v.109, n.2, p.543-5, 15 jan. 2007.

MILLER, M.E.; HOLLOWAY, A.C.; FOSTER, W.G. Benzo-[a]-pyrene increases invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells via increased COX-II expression and prostaglandin E2 (PGE2) output. **Clin Exp Metastasis**, v.22, n.2, p.149-56, 2005.

MOHAN RAO, L.V.; ESMON, C.T.; PENDURTHI, U.R. Endothelial cell protein C receptor: a multiliganded and multifunctional receptor. **Blood**, v.124, n.10, p.1553-62, 4 set. 2014.

MORTAZAVI, Y., et al. The spectrum of PIG-A gene mutations in aplastic anemia/paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (AA/PNH): a high incidence of multiple mutations and evidence of a mutational hot spot. **Blood**, v.101, n.7, p.2833-41, 1 abr. 2003.

MULERO-NAVARRO, S., et al. Immortalized mouse mammary fibroblasts lacking dioxin receptor have impaired tumorigenicity in a subcutaneous mouse xenograft model. **J Biol Chem**, v.280, n.31, p.28731-41, 5 ago. 2005.

MURRAY, L., et al. Enrichment of human hematopoietic stem cell activity in the CD34+Thy-1+Lin- subpopulation from mobilized peripheral blood. **Blood**, v.85, n.2, p.368-78, 15 jan. 1995.

MURRAY, L.J., et al. Thrombopoietin, flt3, and kit ligands together suppress apoptosis of human mobilized CD34+ cells and recruit primitive CD34+ Thy-1+ cells into rapid division. **Exp Hematol**, v.27, n.6, p.1019-28, jun. 1999.

NARITA, A., et al. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and telomere length predicts response to immunosuppressive therapy in pediatric aplastic anemia. **Haematologica**, v.100, n.12, p.1546-52, dez. 2015.

NIE, Y.; HAN, Y.C.; ZOU, Y.R. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. **J Exp Med**, v.205, n.4, p.777-83, 14 abr. 2008.

NIKIFOROW, S.; RITZ, J. Dramatic Expansion of HSCs: New Possibilities for HSC Transplants? **Cell Stem Cell**, v.18, n.1, p.10-2, 7 jan. 2016.

NISHIMOTO, T., et al. Induction of immune tolerance to platelet antigen by short-term thrombopoietin treatment in a mouse model of immune thrombocytopenia. **Int J Hematol**, v.100, n.4, p.341-4, out. 2014.

NOTTA, F., et al. Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. **Science**, v.333, n.6039, p.218-21, 8 jul. 2011.

NOVERSHTERN, N., et al. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. **Cell**, v.144, n.2, p.296-309, 21 jan. 2011.

OGAWA, S. Clonal hematopoiesis in acquired aplastic anemia. **Blood**, v.128, n.3, p.337-47, 21 jul. 2016.

OHISHI, K.; VARNUM-FINNEY, B.; BERNSTEIN, I.D. Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. **J Clin Invest**, v.110, n.8, p.1165-74, out. 2002.

OLIVA, E.N., et al. Eltrombopag versus placebo for low-risk myelodysplastic syndromes with thrombocytopenia (EQoL-MDS): phase 1 results of a single-blind, randomised, controlled, phase 2 superiority trial. **Lancet Haematol**, v.4, n.3, p.e127-e36, mar. 2017.

OLNES, M.J., et al. Eltrombopag and improved hematopoiesis in refractory aplastic anemia. **N Engl J Med**, v.367, n.1, p.11-9, 5 jul. 2012.

OPITZ, C.A., et al. An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v.478, n.7368, p.197-203, 5 out. 2011.

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

PAGLIUCA, S., et al. Long-Term Outcomes of Cord Blood Transplantation from an HLA-Identical Sibling for Patients with Bone Marrow Failure Syndromes: A Report From Eurocord, Cord Blood Committee and Severe Aplastic Anemia Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.23, n.11, p.1939-48, nov. 2017.

PARMAR, K., et al. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.104, n.13, p.5431-6, 27 mar. 2007.

PELED, T., et al. Linear polyamine copper chelator tetraethylenepentamine augments long-term ex vivo expansion of cord blood-derived CD34+ cells and increases their engraftment potential in NOD/SCID mice. **Exp Hematol**, v.32, n.6, p.547-55, jun. 2004.

PELED, T., et al. Nicotinamide, a SIRT1 inhibitor, inhibits differentiation and facilitates expansion of hematopoietic progenitor cells with enhanced bone marrow homing and engraftment. **Exp Hematol**, v.40, n.4, p.342-55, abr. 2012.

PENG, J., et al. The TNF2 allele is a risk factor to severe aplastic anemia independent of HLA-DR. **Hum Immunol**, v.64, n.9, p.896-901, set. 2003.

PLATZBECKER, U., et al. Safety and tolerability of eltrombopag versus placebo for treatment of thrombocytopenia in patients with advanced myelodysplastic syndromes or acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 1/2 trial. **Lancet Haematol**, v.2, n.10, p.e417-26, oct. 2015.

POPAT, U., et al. Enforced fucosylation of cord blood hematopoietic cells accelerates neutrophil and platelet engraftment after transplantation. **Blood**, v.125, n.19, p.2885-92, 7 maio 2015.

PRICA, A.; SHOLZBERG, M.; BUCKSTEIN, R. Safety and efficacy of thrombopoietin-receptor agonists in myelodysplastic syndromes: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Br J Haematol**, v.167, n.5, p.626-38, dez. 2014.

PSATHA, N., et al. Brief Report: A Differential Transcriptomic Profile of Ex Vivo Expanded Adult Human Hematopoietic Stem Cells Empowers Them for Engraftment Better than Their Surface Phenotype. **Stem Cells Transl Med**, v.6, n.10, p.1852-8, out. 2017.

QIAN, H., et al. Contribution of alpha6 integrins to hematopoietic stem and progenitor cell homing to bone marrow and collaboration with alpha4 integrins. **Blood**, v.107, n.9, p.3503-10, 1 maio 2006.

QIAN, H., et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. **Cell Stem Cell**, v.1, n.6, p.671-84, 13 dez. 2007.

QUINTANA, F.J., et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v.453, n.7191, p.65-71, 1 maio 2008.

RAZA, A., et al. A prospective multicenter study of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure. **Cytometry B Clin Cytom**, v.86, n.3, p.175-82, maio 2014.

RISITANO, A.M., et al. In-vivo dominant immune responses in aplastic anaemia: molecular tracking of putatively pathogenetic T-cell clones by TCR beta-CDR3 sequencing. **Lancet**, v.364, n.9431, p.355-64, 24-30 jul 2004.

RIZZO, S., et al. Reduced TGF-beta1 in patients with aplastic anaemia in vivo and in vitro. **Br J Haematol**, v.107, n.4, p.797-803, dez. 1999.

ROBINSON, S.N., et al. Superior ex vivo cord blood expansion following co-culture with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Bone Marrow Transplant**, v.37, n.4, p.359-66, fev. 2006.

ROSENFELD, S., et al. Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome. **JAMA**, v.289, n.9, p.1130-5, 5 mar. 2003.

SADALLAH, S., et al. Ectosomes released by platelets induce differentiation of CD4+T cells into T regulatory cells. **Thromb Haemost**, v.112, n.6, p.1219-29, dez. 2014.

SADALLAH, S., et al. Microparticles (ectosomes) shed by stored human platelets downregulate macrophages and modify the development of dendritic cells. **J Immunol**, v.186, n.11, p.6543-52, 1 jun. 2011.

SALCEDA, S.; CARO, J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. **J Biol Chem**, v.272, n.36, p.22642-7, 5 set. 1997.

SCHEINBERG, P. Activity of eltrombopag in severe aplastic anemia. **Blood Adv**, v.2, n.21, p.3054-62, 13 nov. 2018a.

SCHEINBERG, P. Recent Advances and Long-Term Results of Medical Treatment of Acquired Aplastic Anemia: Are Patients Cured? **Hematol Oncol Clin North Am**, v.32, n.4, p.609-18, ago. 2018b.

SCHEINBERG, P., et al. Activity of alemtuzumab monotherapy in treatment-naive, relapsed, and refractory severe acquired aplastic anemia. **Blood**, v.119, n.2, p.345-54, 12 jan. 2012.

SCHEINBERG, P., et al. Association of telomere length of peripheral blood leukocytes with hematopoietic relapse, malignant transformation, and survival in severe aplastic anemia. **JAMA**, v.304, n.12, p.1358-64, 22 set. 2010.

SCHEINBERG, P., et al. Horse antithymocyte globulin as salvage therapy after rabbit antithymocyte globulin for severe aplastic anemia. **Am J Hematol**, v.89, n.5, p.467-9, maio 2014.

SCHEINBERG, P., et al. Horse versus rabbit antithymocyte globulin in acquired aplastic anemia. **N Engl J Med**, v.365, n.5, p.430-8, 4 ago. 2011.

SCHEINBERG, P., et al. Moderate-dose cyclophosphamide for severe aplastic anemia has significant toxicity and does not prevent relapse and clonal evolution. **Blood**, v.124, n.18, p.2820-3, 30 out. 2014.

SCHEINBERG, P., et al. Predicting response to immunosuppressive therapy and survival in severe aplastic anaemia. **Br J Haematol**, v.144, n.2, p.206-16, jan. 2009a.

SCHEINBERG, P.; NUNEZ, O.; YOUNG, N.S. Retreatment with rabbit anti-thymocyte globulin and ciclosporin for patients with relapsed or refractory severe aplastic anaemia. **Br J Haematol**, v.133, n.6, p.622-7, jun. 2006.

SCHEINBERG, P., et al. Treatment of severe aplastic anemia with a combination of horse antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without sirolimus: a prospective randomized study. **Haematologica**, v.94, n.3, p.348-54, mar. 2009b.

SCHEINBERG, P., et al. Treatment of severe aplastic anaemia with combined immunosuppression: anti-thymocyte globulin, ciclosporin and mycophenolate mofetil. **Br J Haematol**, v.133, n.6, p.606-11, jun. 2006.

SCHEINBERG, P.; NUNEZ, O.; YOUNG, N.S. Retreatment with rabbit anti-thymocyte globulin and ciclosporin for patients with relapsed or refractory severe aplastic anaemia. **Br J Haematol**, v.133, n.6, p.622-7, jun. 2006.

SCHEINBERG, P.; YOUNG, N.S. How I treat acquired aplastic anemia. **Blood**, v.120, n.6, p.1185-96, 9 ago. 2012.

SCHIFFERLI, A.; KUHNE, T. Thrombopoietin receptor agonists: a new immune modulatory strategy in immune thrombocytopenia? **Semin Hematol**, v.53 Suppl 1, p.S31-4, abr. 2016.

SCHOETTLER, M.L.; NATHAN, D.G. The Pathophysiology of Acquired Aplastic Anemia: Current Concepts Revisited. **Hematol Oncol Clin North Am**, v.32, n.4, p.581-94, ago. 2018.

SCHUSTER, F.R., et al. Highly skewed T-cell receptor V-beta chain repertoire in the bone marrow is associated with response to immunosuppressive drug therapy in children with very severe aplastic anemia. **Blood Cancer J**, v.1, n.3, p.e8, mar. 2011.

SHI, J., et al. Intrinsic impairment of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in acquired aplastic anemia. **Blood**, v.120, n.8, p.1624-32, 23 ago. 2012.

SHIPOUNOVA, I.N., et al. Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia. **Clin Transl Sci**, v.2, n.1, p.67-74, fev. 2009.

SHPALL, E.J., et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. **Biol Blood Marrow Transplant**, v.8, n.7, p.368-76, 2002.

SIMSEK, T., et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. **Cell Stem Cell**, v.7, n.3, p.380-90, 3 set. 2010.

SINGH, K.P., et al. Aryl hydrocarbon receptor-null allele mice have hematopoietic stem/progenitor cells with abnormal characteristics and functions. **Stem Cells Dev**, v.20, n.5, p.769-84, maio 2011.

SINGH, K.P., et al. The aryl hydrocarbon receptor has a normal function in the regulation of hematopoietic and other stem/progenitor cell populations. **Biochem Pharmacol**, v.77, n.4, p.577-87, 15 fev. 2009a.

SINGH, K.P., et al. Treatment of mice with the Ah receptor agonist and human carcinogen dioxin results in altered numbers and function of hematopoietic stem cells. **Carcinogenesis**, v.30, n.1, p.11-9, jan. 2009b.

SMITH, J.N.; KANWAR, V.S.; MACNAMARA, K.C. Hematopoietic Stem Cell Regulation by Type I and II Interferons in the Pathogenesis of Acquired Aplastic Anemia. **Front Immunol**, v.7, p.330, 2016.

SOLOMOU, E.E., et al. Deficient CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in acquired aplastic anemia. **Blood**, v.110, n.5, p.1603-6, 1 set. 2007b.

SOLOMOU, E.E., et al. Perforin gene mutations in patients with acquired aplastic anemia. **Blood**, v.109, n.12, p.5234-7, 15 jun. 2007a.

SOLOMOU, E.E.; KEYVANFAR, K.; YOUNG, N.S. T-bet, a Th1 transcription factor, is up-regulated in T cells from patients with aplastic anemia. **Blood**, v.107, n.10, p.3983-91, 15 maio 2006.

STINGL, J., et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. **Nature**, v.439, n.7079, p.993-7, 23 fev. 2006.

SUTTON, K.S., et al. Immune markers of disease severity and treatment response in pediatric acquired aplastic anemia. **Pediatr Blood Cancer**, v.60, n.3, p.455-60, mar. 2013.

THOMSEN, J.S., et al. HES-1, a novel target gene for the aryl hydrocarbon receptor. **Mol Pharmacol**, v.65, n.1, p.165-71, jan. 2004.

TICHELLI, A., et al. Late complications in patients with aplastic anemia. **Schweiz Med Wochenschr**, v.118, n.42, p.1528-32, 22 out. 1988.

TOTHOVA, Z., et al. FoxOs are critical mediators of hematopoietic stem cell resistance to physiologic oxidative stress. **Cell**, v.128, n.2, p.325-39, 26 jan. 2007.

TOWNSLEY, D.M.; DUMITRIU, B.; YOUNG, N.S. Bone marrow failure and the telomeropathies. **Blood**, v.124, n.18, p.2775-83, 30 out. 2014.

TOWNSLEY, D.M., et al. Eltrombopag Added to Standard Immunosuppression for Aplastic Anemia. **N Engl J Med**, v.376, n.16, p.1540-50, 20 abr. 2017.

VEDI, A., et al. Molecular landscapes of human hematopoietic stem cells in health and leukemia. **Ann N Y Acad Sci**, v.1370, n.1, p.5-14, abr. 2016.

VELDHOEN, M., et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. **Nature**, v.453, n.7191, p.106-9, 1 maio 2008.

VLACHODIMITROPOULOU, E., et al. Eltrombopag: a powerful chelator of cellular or extracellular iron(III) alone or combined with a second chelator. **Blood**, v.130, n.17, p.1923-33, 26 out. 2017.

VOGEL, W., et al. Clinical applications of CD34(+) peripheral blood progenitor cells (PBPC). **Stem Cells**, v.18, n.2, p.87-92, 2000.

VOGEL, C.F., et al. Dioxin increases C/EBPbeta transcription by activating cAMP/protein kinase A. **J Biol Chem**, v.279, n.10, p.8886-94, 5 mar. 2004.

WAGNER, J.E., JR., et al. Phase I/II Trial of StemRegenin-1 Expanded Umbilical Cord Blood Hematopoietic Stem Cells Supports Testing as a Stand-Alone Graft. **Cell Stem Cell**, v.18, n.1, p.144-55, 7 jan. 2016.

WANG, J.C.; DOEDENS, M.; DICK, J.E. Primitive human hematopoietic cells are enriched in cord blood compared with adult bone marrow or mobilized peripheral blood as measured by the quantitative in vivo SCID-repopulating cell assay. **Blood**, v.89, n.11, p.3919-24, 1 jun. 1997.

WINKLER, T.; COOPER, J.N.; TOWNSLEY, D.M. Eltrombopag for refractory severe aplastic anemia: dosing regimens, long-term follow-up, clonal evolution and somatic mutation profiling. **Blood**, v.130, n.Suppl 1, 2017.

WINKLER, T., et al. Treatment optimization and genomic outcomes in refractory severe aplastic anemia treated with eltrombopag. **Blood**, v.133, n.24, p.2575-85, 13 jun. 2019.

WU, L., et al. Impairment of hematopoietic stem cell niches in patients with aplastic anemia. **Int J Hematol**, v.102, n.6, p.645-53, dez. 2015.

XIA, L., et al. Surface fucosylation of human cord blood cells augments binding to P-selectin and E-selectin and enhances engraftment in bone marrow. **Blood**, v.104, n.10, p.3091-6, 15 nov. 2004.

XIE, Y., et al. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. **Nature**, v.457, n.7225, p.97-101, 1 jan. 2009.

YAMAGUCHI, H., et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. **N Engl J Med**, v.352, n.14, p.1413-24, 7 abr. 2005.

YAMAGUCHI, H., et al. Mutations of the human telomerase RNA gene (TERC) in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. **Blood**, v.102, n.3, p.916-8, 1 ago. 2003.

YAMAZAKI, H., et al. Hematologic recovery induced by eltrombopag in Japanese patients with aplastic anemia refractory or intolerant to immunosuppressive therapy. **Int J Hematol**, v.110, n.2, p.187-96, ago. 2019.

YOSHIHARA, H., et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. **Cell Stem Cell**, v.1, n.6, p.685-97, 13 dez. 2007.

YOSHIZATO, T., et al. Somatic Mutations and Clonal Hematopoiesis in Aplastic Anemia. **N Engl J Med**, v.373, n.1, p.35-47, 2 jul. 2015.

YOUNG, N.S. Aplastic Anemia. **N Engl J Med**, v.379, n.17, p.1643-56, 25 out 2018.

YOUNG, N.S. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v.2013, p.76-81, 2013.

YOUNG, N.S. The problem of clonality in aplastic anemia: Dr Dameshek's riddle, restated. **Blood**, v.79, n.6, p.1385-92, 15 mar. 1992.

YOUNG, N.S.; CALADO, R.T.; SCHEINBERG, P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. **Blood**, v.108, n.8, p.2509-19, 15 out. 2006.

ZAIMOKU, Y., et al. Identification of an HLA class I allele closely involved in the autoantigen presentation in acquired aplastic anemia. **Blood**, v.129, n.21, p.2908-16, 25 maio 2017.

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

ZHAO, Z., et al. Eltrombopag mobilizes iron in patients with aplastic anemia. **Blood**, v.131, n.21, p.2399-402, 24 maio 2018.

ZHOU, L. AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. **Trends Immunol**, v.37, n.1, p.17-31, jan. 2016.

ZOUMBOS, N.C., et al. Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. **N Engl J Med**, v.312, n.5, p.257-65, 31 jan.1985.

ZUDAIRE, E., et al. The aryl hydrocarbon receptor repressor is a putative tumor suppressor gene in multiple human cancers. **J Clin Invest**, v.118, n.2, p.640-50, fev. 2008.

8. ANEXOS

ANEXO A - Termo de consentimento livre e esclarecido grupo C.

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

Campus Universitário - Monte Alegre -Ribeirão Preto-SP
CEP 14048-900 - Fone: (16) 602-1000- Fax: (16) 633-1144

ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E

- Adulto

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

NÚMERO DO ESTUDO: 14-H-RTC-0012

INVESTIGADORES: Prof. Dr. Rodrigo T. Calado e Dr. Marcos R. P. Oltramari

TÍTULO: *Efeito do derivativo de purina SR1 e do derivativo pirimidoindólico UM171 na expansão de células-tronco e progenitoras hematopoéticas na anemia aplásica adquirida*

Versão: 2ª (de 25 de janeiro de 2016)

INTRODUÇÃO

Nós o(a) convidamos para participar de uma pesquisa clínica na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Primeiramente, gostaríamos de que você soubesse que:

A participação neste estudo da FMRP-USP é totalmente voluntário.

Você pode optar por não participar do estudo ou mesmo que tenha aceitado participar, você pode decidir por sair do estudo a qualquer momento. Neste caso, você não vai perder nenhum benefício ou atendimento aos quais você tem direito.

Você pode não ter nenhum benefício direto por participar da pesquisa. Este estudo vai nos permitir aumentar o nosso conhecimento científico sobre a medicina e o funcionamento do corpo humano que pode nos auxiliar a ajudar outras pessoas e pacientes no futuro.

Em segundo lugar, é importante lembrar que algumas pessoas têm crenças pessoais, religiosas ou éticas que podem limitar ou impedir a participação em estudos médicos e pesquisas clínicas ou receber alguns tratamentos médicos (por exemplo, transfusão de sangue). Se você tem ou segue alguma dessas crenças, por favor discuta-as com o seu médico antes de concordar em participar no estudo.

Agora, nós vamos descrever esta pesquisa clínica. Antes de decidir por participar, por favor tome o tempo necessário para fazer perguntas e discutir os aspectos que causaram dúvida com a equipe de pesquisa da FMRP-USP, com a sua família, amigos, seu médico ou algum outro profissional de saúde.

1. Qual o objetivo deste estudo?

O objetivo deste trabalho é o de avaliar a capacidade de duas substâncias, chamadas SR1 e UM171, de multiplicar, em laboratório, as células-tronco da medula óssea de pacientes portadores de anemia aplástica adquirida.

2. Por que este estudo está sendo feito?

Na anemia aplástica adquirida, há uma diminuição do número de células-tronco na medula óssea, o que implica no comprometimento da produção das células do sangue. A possibilidade de expansão destas células em laboratório pode contribuir para um maior entendimento da doença, assim como potencialmente criar novas possibilidades de tratamento.

3. Você vai receber alguma medicação para teste?

Não, você não receberá nenhum remédio ou medicação em teste neste estudo.

4. Você receberá alguma outra medicação ou terapia que não esteja em teste?

Não, você não receberá nenhum remédio ou medicação neste estudo.

5. Qual avaliação médica é necessária para participar do estudo?

Exame médico não é necessário para participar do estudo.

6. Como você irá participar do estudo?

Você irá doar uma amostra de medula óssea de até 50ml. Se você é paciente, a coleta será realizada apenas no momento em que for necessária a realização da punção de medula óssea para diagnóstico ou acompanhamento do tratamento. Se você é doador, isto ocorrerá durante o procedimento de coleta para o transplante de medula óssea. Este procedimento será realizado na região posterior do osso da bacia sob técnica asséptica e anestesia local, utilizando-se agulha de punção apropriada, conforme habitualmente é realizado.

Caso você não queira mais que sua amostra seja utilizada no estudo, você pode pedir para que a mesma seja retirada do estudo e destruída. Para isto, você deve entrar em contato com o Dr. Rodrigo Calado na FMRP-USP, telefone (16) 3602-2294.

7. Os resultados dos testes serão informados a você?

Não, os resultados não serão fornecidos automaticamente a você, mas caso você se interesse em saber o resultado dos testes da pesquisa, deverá entrar em contato com o Dr. Rodrigo Calado da FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2294.

8. Quais são os riscos e desconfortos esperados?

O risco é mínimo e está relacionado à coleta do aspirado de medula óssea. Todas as informações obtidas nos testes realizados serão mantidas em sigilo e apenas os pesquisadores responsáveis terão acesso à sua amostra e às informações obtidas. As amostras serão numeradas e não conterão nenhuma informação que possa identificar o doador.

O desconforto que você pode sentir é apenas da picada da agulha durante a coleta de aspirado de medula óssea e um potencial hematoma que possa se formar no local da picada. Infecção ou lesão de nervos no local da coleta podem acontecer muito raramente.

9. Quantas pessoas vão participar do estudo?

Serão convidados para participar deste estudo 5 pacientes recém-diagnosticados com anemia aplástica adquirida grave, 5 pacientes com anemia aplástica adquirida grave que não responderam ao tratamento, e também 5 pacientes em investigação de doença hematológica, nos quais se tenha excluído comprometimento da medula óssea, ou doadores saudáveis de medula óssea para transplante, todos atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.

10. Há algum benefício por participar do estudo?

Não há nenhum benefício imediato para você por participar do estudo. Você poderá saber o resultado dos testes, caso tenha interesse.

11. Há algum exame de laboratório adicional que será realizado?

Não, não serão realizados exames laboratoriais adicionais. Caso os pesquisadores da FMRP-USP desejem realizar outros testes ou novas pesquisas utilizando a sua amostra de aspirado de medula óssea, eles tentarão entrar em contato com você para obter a permissão do uso da amostra.

12. Armazenamento e distribuição das amostras de aspirado de medula óssea para pesquisa:

As amostras para pesquisa serão processadas no laboratório, e as células cultivadas por período limitado somente durante o tempo da pesquisa e sob o cuidado e supervisão dos investigadores da FMRP-USP, que também serão o contato entre você e a informação obtida com o estudo da sua amostra de aspirado de medula óssea. Os tubos contendo as amostras de aspirado de medula óssea não terão nenhum código ou nenhum tipo de identificação que possa ligar o seu nome à amostra. Nenhum outro indivíduo, incluindo seus familiares, médico ou empregador terão acesso às amostras estocadas.

13. Os resultados dos exames realizados:

É muito pouco provável que o que nós aprendermos com este estudo tenha um benefício direto para você. Estes resultados poderão ser úteis para o tratamento de pacientes no futuro. Entretanto, caso você deseje saber o resultado dos testes realizados, deverá entrar em contato com o Dr. Rodrigo Calado pelo telefone (16) 3602-2294.

14. Tomando a própria decisão

Este documento descreve para você os fatos relacionados a esta pesquisa clínica. Se você tiver alguma dúvida, sinta-se à vontade para fazer as perguntas necessárias para o investigador para que a sua decisão seja consciente e bem informada pelo telefone (16) 3602-2294 ou entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2228. Você receberá uma cópia deste documento para guardar.

ANEXO B - Termo de consentimento livre e esclarecido grupo AA.

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

Campus Universitário - Monte Alegre -Ribeirão Preto-SP
CEP 14048-900 - Fone: (16) 602-1000- Fax: (16) 633-1144

ESCLARECIDO	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E • Adulto
<p>INSTITUIÇÃO: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo NÚMERO DO ESTUDO: 14-H-RTC-0012 INVESTIGADORES: Prof. Dr. Rodrigo T. Calado e Dr. Marcos R. P. Oltramari TÍTULO: <i>Efeito do derivativo de purina SRI e do derivativo pirimidoindólico UM171 na expansão de células-tronco e progenitoras hematopoéticas na anemia aplástica adquirida</i></p> <p>Versão: 2ª (de 25 de janeiro de 2016)</p>	

INTRODUÇÃO

Nós o(a) convidamos para participar de uma pesquisa clínica na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Primeiramente, gostaríamos de que você soubesse que:

A participação neste estudo da FMRP-USP é totalmente voluntário.

Você pode optar por não participar do estudo ou mesmo que tenha aceitado participar, você pode decidir por sair do estudo a qualquer momento. Neste caso, você não vai perder nenhum benefício ou atendimento aos quais você tem direito.

Você pode não ter nenhum benefício direto por participar da pesquisa. Este estudo vai nos permitir aumentar o nosso conhecimento científico sobre a medicina e o funcionamento do corpo humano que pode nos auxiliar a ajudar outras pessoas e pacientes no futuro.

Em segundo lugar, é importante lembrar que algumas pessoas têm crenças pessoais, religiosas ou éticas que podem limitar ou impedir a participação em estudos médicos e pesquisas clínicas ou receber alguns tratamentos médicos (por exemplo, transfusão de sangue). Se você tem ou segue alguma dessas crenças, por favor discuta-as com o seu médico antes de concordar em participar no estudo.

Agora, nós vamos descrever esta pesquisa clínica. Antes de decidir por participar, por favor tome o tempo necessário para fazer perguntas e discutir os aspectos que causaram dúvida com a equipe de pesquisa da FMRP-USP, com a sua família, amigos, seu médico ou algum outro profissional de saúde.

1. Qual o objetivo deste estudo?

O objetivo deste trabalho é o de avaliar a capacidade de duas substâncias, chamadas SR1 e UM171, de multiplicar, em laboratório, as células-tronco da medula óssea de pacientes portadores de anemia aplástica adquirida.

2. Por que este estudo está sendo feito?

Na anemia aplástica adquirida, há uma diminuição do número de células-tronco na medula óssea, o que implica no comprometimento da produção das células do sangue. A possibilidade de expansão destas células em laboratório pode contribuir para um maior entendimento da doença, assim como potencialmente criar novas possibilidades de tratamento.

3. Você vai receber alguma medicação para teste?

Não, você não receberá nenhum remédio ou medicação em teste neste estudo.

4. Você receberá alguma outra medicação ou terapia que não esteja em teste?

Não, você não receberá nenhum remédio ou medicação neste estudo.

5. Qual avaliação médica é necessária para participar do estudo?

Exame médico não é necessário para participar do estudo.

6. Como você irá participar do estudo?

Você irá doar uma amostra de medula óssea de até 50ml. A coleta será realizada apenas no momento em que for necessária a realização da punção de medula óssea para diagnóstico ou acompanhamento do tratamento de sua enfermidade. Este procedimento será realizado na região posterior do osso da bacia sob técnica asséptica e anestesia local, utilizando-se agulha de punção apropriada, conforme habitualmente é realizado.

Caso você não queira mais que sua amostra seja utilizada no estudo, você pode pedir para que a mesma seja retirada do estudo e destruída. Para isto, você deve entrar em contato com o Dr. Rodrigo Calado na FMRP-USP, telefone (16) 3602-2294.

7. Os resultados dos testes serão informados a você?

Não, os resultados não serão fornecidos automaticamente a você, mas caso você se interesse em saber o resultado dos testes da pesquisa, deverá entrar em contato com o Dr. Rodrigo Calado da FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2294.

8. Quais são os riscos e desconfortos esperados?

O risco é mínimo e está relacionado à coleta do aspirado de medula óssea. Todas as informações obtidas nos testes realizados serão mantidas em sigilo e apenas os pesquisadores responsáveis terão acesso à sua amostra e às informações obtidas. As amostras serão numeradas e não conterão nenhuma informação que possa identificar o doador.

O desconforto que você pode sentir é apenas da picada da agulha durante a coleta de aspirado de medula óssea e um potencial hematoma que possa se formar no local da picada. Infecção ou lesão de nervos no local da coleta podem acontecer muito raramente.

9. Quantas pessoas vão participar do estudo?

Serão convidados para participar deste estudo 5 pacientes recém-diagnosticados com anemia aplástica adquirida grave, 5 pacientes com anemia aplástica adquirida grave que não responderam ao tratamento, e também 5 pacientes em investigação de doença hematológica, nos quais se tenha excluído comprometimento da medula óssea, ou doadores saudáveis de medula óssea para transplante, todos atendidos no Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto – USP.

10. Há algum benefício por participar do estudo?

Não há nenhum benefício imediato para você por participar do estudo. Você poderá saber o resultado dos testes, caso tenha interesse.

11. Há algum exame de laboratório adicional que será realizado?

Não, não serão realizados exames laboratoriais adicionais. Caso os pesquisadores da FMRP-USP desejem realizar outros testes ou novas pesquisas utilizando a sua amostra de aspirado de medula óssea, eles tentarão entrar em contato com você para obter a permissão do uso da amostra.

12. Armazenamento e distribuição das amostras de aspirado de medula óssea para pesquisa:

As amostras para pesquisa serão processadas no laboratório, e as células cultivadas por período limitado somente durante o tempo da pesquisa e sob o cuidado e supervisão dos investigadores da FMRP-USP, que também serão o contato entre você e a informação obtida com o estudo da sua amostra de aspirado de medula óssea. Os tubos contendo as amostras de aspirado de medula óssea não terão nenhum código ou nenhum tipo de identificação que possa ligar o seu nome à amostra. Nenhum outro indivíduo, incluindo seus familiares, médico ou empregador terão acesso às amostras estocadas.

13. Os resultados dos exames realizados:

É muito pouco provável que o que nós aprendermos com este estudo tenha um benefício direto para você. Estes resultados poderão ser úteis para o tratamento de pacientes no futuro. Entretanto, caso você deseje saber o resultado dos testes realizados, deverá entrar em contato com o Dr. Rodrigo Calado pelo telefone (16) 3602-2294.

14. Tomando a própria decisão

Este documento descreve para você os fatos relacionados a esta pesquisa clínica. Se você tiver alguma dúvida, sinta-se à vontade para fazer as perguntas necessárias para o investigador para que a sua decisão seja consciente e bem informada pelo telefone (16) 3602-2294 ou entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2228. Você receberá uma cópia deste documento para guardar.