UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA LIMA VILAS BOAS

**Modelo de camundongo imunodeficiente (NSG) para enxertia de
células-tronco hematopoéticas**

Ribeirão Preto

2019

FERNANDA LIMA VILAS BOAS

Versão Corrigida

**Modelo de camundongo imunodeficiente (NSG) para enxertia de células-tronco
hematopoéticas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Virgínia Picanço e Castro

Ribeirão Preto

2019

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

Vilas Boas, Fernanda Lima

Modelo de camundongo imunodeficiente (NSG) para enxertia de células-tronco hematopoéticas. Ribeirão Preto, 2019.

63 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biotecnologia.

Orientadora: Castro, Virgínia Picanço.

1. Camundongo imunodeficiente. 2. Células tronco hematopoéticas. 3. Pluripotência. 4. Transplante.

Nome: VILAS BOAS, Fernanda Lima

Título: Modelo de camundongo imunodeficiente (NSG) para enxertia de células-tronco hematopoéticas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: _____

Banca examinadora:

Prof. (a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho, primeiramente e em especial, ao meu esposo **Cristiano Teixeira** e meu filho **Lucas Vilas Boas Teixeira**, que sempre estiveram ao meu lado, compartilhando angústias, inseguranças e dando apoio e incentivo para sempre seguir em frente e nunca desistir das batalhas.

Dedico também à minha mãe **Cristina Vilas Boas**, meu pai **Geraldo Vilas Boas** e minha irmã **Daniela Vilas Boas**, que mesmo estando longe, me impulsionaram com palavras de apoio.

Às primas **Karina Lima Reis** e **Andreísa Fabri Lima** pelas palavras de apoio e incentivo nos momentos de fraqueza e angústias.

Aos familiares, amigos e minha avó **Carmem**, que me apoiam com carinho em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A elaboração e conclusão deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração de diversas pessoas. Gostaria de expressar minha gratidão por todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte da conclusão deste trabalho.

A minha orientadora, **Prof. Dra. Virgínia Picanço Castro** pela oportunidade de ingressar no programa e ampliar meus horizontes, agradeço os valiosos ensinamentos, a partilha de seus conhecimentos e por toda contribuição para que esse trabalho fosse concluído.

Ao **Programa de Pós-Graduação Mestrado Profissional em Hemoterapia e Biotecnologia** pela contribuição para mais esta etapa profissional superada.

A **Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto**, onde este trabalho foi realizado.

A **Cleide Lúcia Araújo Silva**, por todos ensinamentos aplicados a experimentação animal, paciência e dedicação para o meu aprendizado e desenvolvimento dos experimentos animais.

Às meninas do **Laboratório de Terapia Celular**, em especial a **Maristela Delgado Orellana** e **Taísa Risque Fernandes** por toda paciência, carinho e principalmente pelos ensinamentos e dúvidas esclarecidas durante o aprendizado no laboratório.

Às meninas do **Laboratório de Citometria de Fluxo**, pelo suporte e esclarecimentos das dúvidas.

Ao **Everton Brito de Oliveira** que teve participação fundamental na conclusão deste trabalho, me ensinando, “suportando” e principalmente me incentivando a prosseguir.

E claro, a **Deus**, por permitir que eu me levante todos os dias para a vida, vencendo uma batalha de cada vez.

“A persistência é o menor caminho ao êxito”.

Charles Chaplin

RESUMO

VILAS BOAS, F. L. **Modelo de camundongo imunodeficiente (NSG) para enxertia de células-tronco hematopoéticas**. 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

O transplante de células-tronco hematopoéticas (CTHs) é o tipo de terapia celular mais utilizada atualmente para o reestabelecimento funcional da linhagem leucocitária de pacientes portadores de enfermidades e/ou tumores hematológicos, cirurgias, acidentes, dentre outros. As células-tronco (CT) da medula óssea (MO) humana, do sangue periférico mobilizado (SPM) e do sangue de cordão umbilical humano (SCUh) são as únicas fontes de células utilizadas clinicamente para a recuperação hematopoética, mas elas têm uma disponibilidade limitada e apenas um terço dos pacientes apresentam um doador compatível. Uma fonte alternativa para suprir esta demanda seriam as células hematopoéticas derivadas a partir de células-tronco pluripotentes. Células-tronco embrionárias (CTE) são um tipo de células pluripotentes caracterizadas por sua capacidade ilimitada de autorrenovação e diferenciação em todas as células especializadas do indivíduo adulto. A alta capacidade de diferenciação dessas células em linhagens específicas por métodos de indução *in vitro* faz delas grandes promessas para o desenvolvimento de novas tecnologias aplicáveis à medicina regenerativa e terapia celular. Entretanto, ainda é necessário determinar se CTH geradas a partir de células pluripotentes são funcionais *in vivo*. Assim, o objetivo desse estudo consistiu no desenvolvimento de um modelo animal para o transplante de CTH derivadas de células pluripotentes. Para tanto, realizamos a padronização da dose de irradiação subletal nos camundongos NOD/SCID IL2R γ ^{null} (NSG) e utilizamos duas concentrações de CTH diferenciadas a partir de CTEh e células de SCUh. Os camundongos que receberam as células de SCUh apresentaram uma taxa mais elevada de enxertia em comparação aos que receberam às CTH diferenciadas de CTE e foi confirmado que após quinze dias do transplante, que a hematopoese é restabelecida e que células CD45⁺ humanas estavam presentes em órgãos e sangue periférico, porém em baixas quantidades. Sobretudo, os resultados aqui apresentados enfatizaram o descrito na literatura, porém não ultrapassando a 1,5% de enxertia na MO. Estes dados indicaram que os camundongos NSG proporcionaram um microambiente hematopoético favorável para as CTE, porém essas células precisam ser investigadas no que tange aos fatores que aumentem de sua manutenção *in vivo*, otimizando a enxertia.

DESCRITORES: Camundongo imunodeficiente. Células tronco hematopoéticas.
Pluripotência. Transplante.

ABSTRACT

VILAS BOAS, F. L. **Immunodeficient mouse (NSG) model for hematopoietic stem cell grafting.** 2019. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is the type of cell therapy currently used for the functional reestablishment of the leukocyte lineage of patients with hematological diseases and / or tumors, surgeries, accidents, among others. Human bone marrow (BM), mobilized peripheral blood (MPB), and human umbilical cord blood (UCB) stem cells (SC) are the only sources of cells used clinically for hematopoietic recovery, but they have an availability limited and only a third of patients have a compatible donor. An alternative source to meet this demand would be hematopoietic cells derived from pluripotent stem cells. Embryonic stem cells (ESC) are a type of pluripotent cells characterized by their unlimited capacity for self-renewal and differentiation in all specialized cells of the adult individual. The high capacity of differentiation of these cells in specific lineages by *in vitro* induction methods makes great promises for the development of new technologies applicable to regenerative medicine and cell therapy. However, it remains to be determined whether HSCs generated from pluripotent cells are functional *in vivo*. Thus, the objective of this study was to develop an animal model for the transplantation of pluripotent stem cell transplants. To do so, we performed standardization of the sublethal irradiation dose in the NOD / SCID IL2R γ null (NSG) mice and used two concentrations of differentiated HSCs from ESCh and UCB cells. Mice that received UCB cells had a higher rate of grafting than those receiving SCT-differentiated HSCs, and it was confirmed that after 15 days of transplantation, that hematopoiesis is restored and that human CD45 + cells were present in organs and peripheral blood, but in low amounts. Above all, the results presented here emphasize the described in the literature, but not exceeding 1.5% of grafting in BM. These data indicated that NSG mice provided a hematopoietic environment favorable to the ESC, but these cells need to be investigated for factors that increase their maintenance *in vivo*, optimizing grafting.

KEYWORDS: Immunodeficient mouse. Hematopoietic stem cells. Pluripotency. Transplant.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC *Allophycocyanin*

CFC Células formadoras de colônias

cGy Centigray

CONCEA Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CPDA Citrato/fosfato/dextrose/adenina

CT células-tronco

CTE Células-tronco embrionárias

CTEh Células-tronco embrionárias humanas

CTH Células-Tronco hematopoéticas

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO Dimetilsulfóxido

DNA Ácido desoxirribonucleico

FITC *Fluorescein isothiocyanate*

GM-CSF Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

GvHD Doença do enxerto contra o hospedeiro

HDACI Inibidores de histona desacetilase

HLA Antígeno leucocitário humano

IL Interleucina

IL-3h Interleucina 3 humana

iPSC Células pluripotentes induzidas

LT Linfócito T

LTC-ICs linhagens de progenitores capazes de extensa proliferação e diferenciação

MEF Fibroblastos de embrião de camundongos

MHC Complexo principal de histocompatibilidade

MO Medula óssea

PBS Solução tampão fosfato

PE *Phycoeritrin*

PerCP *Peridinin chlorophyll*

SCF Stem Cell Factor

SCUh Sangue de cordão umbilical humano

SCUP Sangue de cordão umbilical e placentário

SFB Soro fetal bovino

SPM Sangue periférico mobilizado

SSEA *Stage-specific embryonic antigen*

TBI Irradiação corporal total

TCLE Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TCTH Transplante autólogo de células-tronco hematopoéticas

TMO Transplante de Medula Óssea

TNC Total de células nucleadas

TRA Tumor-related antigen

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A organização hierárquica da hematopoese.....	16
Figura 2: Caracterização Imunofenotípica das CTH para os marcadores hematopoéticos não-específicos.....	32
Figura 3: Etapas para a realização transplante de CTH derivadas de CTEh e de SCUP em camundongos.....	36
Figura 4: Avaliação do tempo de sobrevida dos camundongos expostos às diferentes doses de irradiação.....	37
Figura 5: Avaliação hematológica da influência da irradiação.....	38
Figura 6: Porcentagem de células CD45 ⁺ (humanas) em camundongos transplantados com SCUP.....	40
Figura 7: Análise dos grupos de SCUP.....	41
Figura 8: Porcentagem de células CD45 ⁺ (humanas) em camundongo transplantado com células diferenciadas das CTEh pela via retro orbital.....	42
Figura 9: Análise dos grupos de CTEh.....	44
Figura 10: Análise por citometria de fluxo de diferentes órgãos dos camundongos que receberam enxertia de células isoladas de SCUP por via intraóssea.....	45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 MODELOS DE CAMUNDONGOS PARA ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO HEMATOPOÉTICA	13
1.2 CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS	16
1.3 TRANSPLANTE DE CTH E A MOBILIZAÇÃO DESTAS CÉLULAS A PARTIR DE DIFERENTES FONTES	17
1.3.1 Expansão <i>ex vivo</i> de CTH	19
1.4 CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES COMO FONTE DE CTH	21
1.4.1 Diferenciação Hematopoética	22
1.4.2 Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (GvHD)	23
2 JUSTIFICATIVA	25
3 HIPÓTESE	26
4 OBJETIVOS	27
4.1 OBJETIVO GERAL	27
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1 PROCEDIMENTO LEGAL E TÉCNICO PARA COLETA DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL	28
5.2 LINHAGENS CELULARES E CULTURA PRIMÁRIA	29
5.2.1 Isolamento e Congelamento das Células-Tronco Hematopoéticas do Sangue de Cordão Umbilical	29
5.2.2 Células-tronco Embrionárias Humanas	30
5.2.3 Cultivo e expansão das células-tronco embrionárias humanas	30
5.2.4 Diferenciação Hematopoética das Células Pluripotentes	30
5.2.5 Caracterização Imunofenotípica das Células Hematopoéticas	31
5.3 EXPERIMENTAÇÃO EM CAMUNDONGOS	32
5.3.1 Determinações da dose de irradiação e avaliação do tempo de sobrevivência dos camundongos	33
5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5.5 DESENHO EXPERIMENTAL	35
6 RESULTADOS	36
6.1 AVALIAÇÃO FUNCIONAL <i>IN VIVO</i> DA DOSE DE IRRADIAÇÃO	36
6.2 TRANSPLANTE DE CÉLULAS DO SCUP PELA VIA RETRO ORBITAL	39
6.3 TRANSPLANTE DE CTH DIFERENCIADAS A PARTIR DAS CTEh PELA VIA RETRO ORBITAL	42
6.4 TRANSPLANTE DE CÉLULAS DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO PELA VIA INTRAÓSSEA	44
7 DISCUSSÃO	46
8 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 MODELOS DE CAMUNDONGOS PARA ESTUDO DA DIFERENCIAÇÃO HEMATOPOÉTICA

O progresso do desenvolvimento de camundongos humanizados depende dos avanços nas modificações genéticas em camundongos imunodeficientes. O camundongo SCID foi o primeiro grande avanço em camundongos humanizados que permitiu que células e tecidos humanos enxertassem esses camundongos em 1988, no entanto, a eficiência do enxerto foi baixa devido à falta de um sistema imunológico completamente desenvolvido e intacto. Desde o desenvolvimento do NOD-SCID em 1995, esse avanço melhorou notavelmente a enxertia de células e tecidos humanos em linhagens de camundongos (ZHOU et al., 2014).

A fim de aprimorar o estudo das células-tronco hematopoéticas (CTH), os pesquisadores têm direcionado sua atenção para o desenvolvimento da hematopoese humana em modelos animais. O desenvolvimento, diferenciação e capacidade de repopulação de longo prazo das células humanas, que só podem ser determinadas *in vivo*, podem ser verificados em um modelo animal, sem a necessidade de estudos clínicos. O desenvolvimento e validação de um modelo animal para hematopoese humana também permitiria a avaliação rápida e a aplicação de avanços na terapia genética para o tratamento de distúrbios hematológicos, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras doenças (GREINER et al., 2009).

Os melhores ensaios desenvolvidos para caracterizar e quantificar o uso de célula-tronco (CT) *in vivo* utilizaram sistemas em modelos murinos (GREINER, HESSELTON e SHULTZ; 1998). Os modelos de camundongos humanizados ainda estão em desenvolvimento e existem vários protocolos para melhorar a enxertia e a função das células humanas e um fator chave para a geração bem-sucedida de camundongos humanizados é que estes sustentem a sobrevivência de células e tecidos humanos transplantados (GREINER, HESSELTON e SHULTZ, 1998; ANGELOPOULOU et al., 2004). Para avaliar a enxertia de células e tecidos humanos, foram desenvolvidos camundongos imunodeficientes que podem sustentar células de multilinhagens e apoiar a hematopoese humana. Inicialmente, foram utilizados camundongos combinados de imunodeficiência grave (CB-17-SCID) que não possuíam imunidade inata e adquirida. A partir desse modelo animal, foi definida a cepa SCID, que é um substituto mais preciso para a repopulação de células de longo prazo em humanos do que em ensaios *in vitro*. Posteriormente, utilizou-se o camundongo imunodeficiente combinado diabético - severo não obeso (NOD - SCID) como receptor (Angelopoulou et al., 2004). A mutação SCID foi

transferida para um fundo diabético não obeso (NOD), e os animais homozigotos para a mutação SCID tornaram-se deficientes na produção de linfócitos T e B. O fundo NOD, além disso, resultou em função celular deficiente de células natural killer (NK), além da ausência de imunidade adaptativa (VERBIEST et al., 2016). Nestes casos, a mutação ocorre no gene que codifica a subunidade catalítica da proteína quinase ativada pelo DNA (*Prkdc*) (NOD-LtSz-*Prkdc scid* -*Prkdscid*, NSG) (GREINER, HESSELTON e SHULTZ, 1998; ANGELOPOULOU et al., 2004).

Os modelos imunodeficientes, ainda incluem camundongos deficientes para genes de ativação de recombinação-1 (*Rag1* e *Rag2*) e homozigotos para o locus *Prkdc^{scid}* (SCID) (GREINER, HESSELTON e SHULTZ, 1998). Estes são portadores de mutações no gene da cadeia gama do receptor IL2 (*IL2R γ*) e sustentam uma enxertia robusta de células e tecidos humanos e desenvolvem sistemas imunes humanos funcionais (JANGALWE et al., 2016). A cadeia gama do receptor IL2 é importante para a sinalização de alta afinidade através dos receptores de citocinas IL2, IL4, IL7, IL9, IL15 e IL21. Sem esses sinais de receptores, tanto a imunidade adaptativa quanto a inata são gravemente prejudicadas (WATERS et al., 2018).

Os modelos experimentais mais utilizados atualmente para o estudo *in vivo* de células hematopoéticas humanas são da linhagem BALB/c *Rag2^{-/-} γ_c ^{-/-}* ou NOD-SCID *γ_c ^{-/-}*. Ambas linhagens são altamente imunodeficientes, desprovidas de células B, T e NK e seu background genético é permissivo para a enxertia e diferenciação hematopoética humana. Após o transplante de CT e CTH CD34⁺, a maioria das populações hematopoéticas humanas, incluindo células B e T, monócitos, células dendríticas, eritrócitos e plaquetas, podem se desenvolver e ser detectável nestes modelos animais (RONGVAUX et al., 2011). Curiosamente, os camundongos NOD-SCID (NSG) são resistentes ao desenvolvimento do linfoma tímico, mesmo após irradiação subletal (VERBIEST et al., 2016, ANGELOPOULOU et al., 2004, GREINER, HESSELTON e SHULTZ, 1998).

Várias estratégias diferentes já foram utilizadas para a enxertia de sistemas imunes humanos em camundongos imunodeficientes, incluindo a injeção de leucócitos do sangue periférico humano, transplante de CTH e implantação de tecidos humanos no fígado fetal e no timo combinados com a injeção de CTH (JANGALWE et al., 2016).

1.1.1 Formas de condicionamento do animal receptor e vias de administração das CTH

A fonte de irradiação usada para o condicionamento do animal que irá receber o transplante afeta significativamente o prognóstico no modelo animal. Geralmente, a radiação

ionizante para camundongos provém de uma fonte radioativa, como o cesium-137, ou uma fonte não-radioativa, como os raios-x (DURAN-STRUUCK e ROBERT, 2009). A diferença crítica entre os raios-X e o cesium-137 está ligada à sua penetração no tecido, onde os raios-x têm um poder de penetração maior em comparação com fontes de cesium, tornando essa primeira opção uma fonte de radiação mais adequada para o estudo de transplante em camundongos (GIBSON et al., 2015). Cabe ressaltar ainda que camundongos são mais resistentes aos raios-x do que os seres humanos e que a sensibilidade à radiação também pode variar de acordo com a linhagem, havendo àquelas com alterações genéticas específicas nos mecanismos de reparo do DNA necessários para sobreviver aos efeitos da radiação (STOLFI et al., 2016).

A irradiação corporal total (TBI) é um procedimento de difícil implementação, pois exige uma regulamentação rigorosa para o uso de irradiadores, localização para habitação e cuidados especiais com os animais. A fim de diminuir tais empecilhos, pesquisadores vêm aplicando agentes quimioterápicos como o bussulfano, para induzir efeitos hematopoéticos similares à TBI (KANG et al., 2006). O bussulfano em altas doses é um componente importante em muitos protocolos de condicionamento para o transplante de CTH ou transplante de medula óssea (TMO). Durante as últimas décadas, vários estudos relataram a ampla variabilidade interindividual na biodisponibilidade do bussulfano influenciada por idade, estado de doença, função hepática, ritmo circadiano e interações medicamentosas (HASSAN, 1999). O desenvolvimento do protocolo de uso do bussulfano intravenoso e sua incorporação nos regimes preparativos para o transplante alogênico de CT foi um marco no transplante para malignidades mielógenas (CIUREA e ANDERSSON, 2009).

Assim sendo, Peake et al. (2015) descreveram um protocolo que utiliza o condicionamento mielossupressor com o agente quimioterápico bussulfano, que ao contrário da irradiação, que requer o uso de instalações especializadas, o condicionamento com bussulfano é realizado usando injeções intraperitoneais de 20 mg/kg/dia até que uma dose total de 60-100 mg/kg tenha sido administrada. Além disso, a irradiação mieloablativa pode apresentar efeitos colaterais tóxicos que exigem que a enxertia seja bem-sucedida para a sobrevivência dos camundongos receptores. Em contraste, o condicionamento com bussulfano é geralmente bem tolerado e os animais podem sobreviver mesmo sem o suporte da célula doadora.

Outro ponto de importância a ser considerado durante o transplante é a via de administração de células, que podem ser administradas via veia do fígado, da cauda, retro orbital ou intraóssea (DURAN-STRUUCK e ROBERT, 2009). A veia da cauda é o acesso

intravascular mais comum, porém, é tecnicamente desafiador e muitas vezes, requer o aquecimento dos camundongos para obter uma melhor vasodilatação periférica. O seio retro orbital é uma via de administração alternativa que causa menos dor e sofrimento aos animais (STEEL et al., 2008).

1.2 CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS

As CTH são as responsáveis por sustentar a hematopoese durante toda a vida de um organismo e cada CTH é programada de modo a permitir uma produção eficiente de componentes sanguíneos celulares. Os eritrócitos realizam o transporte de oxigênio, os megacariócitos e sua progênie plaquetária interagem com vasos sanguíneos e fatores de coagulação solúveis para regular a cascata da coagulação e os leucócitos, atuam na defesa imunológica do indivíduo. Assim, as CTH são definidas pela sua pluripotência, ou seja, pela capacidade de uma única célula gerar todas as células hematopoéticas funcionais maduras (IVANOVA et al., 2002; MERCER, LIN e MURRE, 2011; NOVERSHTERN et al., 2011; MOIGNARD et al., 2013; RIDDEL et al., 2014; SERTORIO et al., 2017) (Figura 1).

Figura 1. A organização hierárquica da hematopoese. A organização da hematopoese é uma hierarquia sustentada por uma pequena população de CTH multipotentes primitivas. As CTH de longa duração dão origem a linhagens de progenitores capazes de extensa proliferação e diferenciação, resultando na produção de células sanguíneas não proliferativas e funcionalmente maduras.

Fonte: Adaptado de Corey et al. (2007).

A hematopoese no embrião começa com o surgimento da primeira CTH identificável nos grupos de células do mesênquima embrionário denominados ilhotas sanguíneas, e representam os elementos progenitores dos sistemas vascular e hematopoético. As células periféricas das ilhotas sanguíneas formam a parede dos primeiros vasos sanguíneos e as células mais centrais originam as células sanguíneas primitivas denominadas hemocitoblastos (IVANOV et al., 2011; IVANOV et al., 2014). Posteriormente, a hematopoese se desloca para o fígado fetal, placenta e, por fim, para a medula óssea (MO), onde as CTHs residirão como células especializadas por toda a vida do organismo mamífero. Na MO, são preservadas em nichos de CT, equivalentes a microambientes que preservam tais células com características indiferenciadas e autorrenováveis. Esta condição visa manter a CTH em seu estado estacionário, evitando assim, sua diferenciação e esgotamento desnecessários (YUCEL e KOCABAS; 2017). Cabe ressaltar que as células progenitoras hematopoéticas são produzidas e diferenciadas na MO em uma concentração limitada que está em torno de $1-5 \times 10^5$ células de medula (CALVI e LINK, 2014).

1.3 TRANSPLANTE DE CTH E A MOBILIZAÇÃO DESTAS CÉLULAS A PARTIR DE DIFERENTES FONTES

A substituição do sistema hematopoético, seja na forma de CTH do próprio paciente (transplante autólogo de CTH (TCTH)) ou de outra pessoa (TCTH alogênico), é um procedimento que foi usado pela primeira vez no ser humano há cerca de 50 anos e continua sendo a terapia celular mais utilizada na atualidade (PASSWEG et al., 2016; YUCEL e KOCABAS, 2017). Estas células podem ser obtidas das CT da MO, do sangue periférico mobilizado (SPM) e do sangue de cordão umbilical e placentário (SCUP), sendo estas as únicas fontes de CTH utilizadas clinicamente para a recuperação hematopoética (NAGAMURA-INOUE e HE, 2014).

Em geral, observa-se que o TCTH autólogo é usado para compensar a insuficiência hematopoética gerada durante um tratamento de quimioterapia direcionado a tumores do sistema hematológico. Já o TCTH alogênico tem por finalidade substituir o sistema hematopoético de pacientes com insuficiência adquirida ou congênita (COPELAN, 2006; GYURKOCZA, REZVANI e STORB, 2010).

Assim, para a utilização em transplante alogênico, pode ser realizada a coleta de CTHs derivadas da MO a partir de um processo voluntário em que o doador será submetido, sob anestesia geral, a um procedimento invasivo (KAUFMAN e THOMPSON, 2002). Ainda é

necessário que as células do doador apresentem histocompatibilidade com as células do receptor, minimizando o risco de rejeição e apenas um terço dos pacientes apresentam um doador compatível (WANG et al., 2009). Este último problema dificulta a eficiência do designado TMO, bem como do transplante de CTH derivadas de qualquer outra fonte, e pode acarretar o óbito dos receptores (YUCEL e KOCABAS, 2017).

Como mencionado, os transplantes de CTH podem envolver a coleta de CTH da MO, uma vez que essas células estão em uma densidade superior neste órgão se comparada à densidade do sangue periférico: 1 para cada 10.000 células da MO e 1 para cada 100.000 células no sangue periférico. Embora a concentração seja um obstáculo nesse caso, cabe ressaltar que, a obtenção de CTH do sangue periférico após a mobilização da MO é um procedimento amplamente aceito para transplantes de CTH (CHARBORD, 2010; YUCEL e KOCABAS, 2017).

Deste modo, ressaltando a melhor acessibilidade ao sangue periférico do que à MO e a reconstituição da hematopoese e da resposta imune de forma mais rápida, as vantagens para sua utilização como fonte de CTH são promissoras (MARSON et al., 1998; SEVILLA et al., 2002; CHARBORD, 2010). De acordo com Korblyng e Freireich (2011), o transplante de CT do sangue periférico é o procedimento mais comum dentre transplantes realizados em Medicina. Sua introdução clínica em 1986 substituiu o TMO como uma fonte de CT para aproximadamente 100% dos transplantes autólogos e para cerca de 75% dos transplantes alogênico. Este panorama histórico fornece uma breve visão sobre a descoberta de CTH circulantes no início dos anos 60, o desenvolvimento da tecnologia de aférese, a descoberta de fatores de crescimento hematopoéticos e o antagonista de CXCR4 que permitiu a mobilização de CT e estudos experimentais de transplante *in vivo*, eventualmente evoluindo para a aplicação desta técnica na clínica.

Nesta modalidade, as CTHs periféricas são coletadas com o auxílio de equipamentos de aférese, após a mobilização das mesmas da MO para o sangue periférico, com a utilização de fatores estimuladores de colônias de granulócitos (Filgrastima). É necessário um acesso venoso com bom calibre para coletas adequadas. As complicações mais frequentes são relacionadas à passagem do cateter (pneumotórax), além de que a Filgrastima pode provocar efeitos colaterais como dor óssea, cefaleia e febre; entretanto, ambas as complicações são pouco frequentes (ANDERLINI et al., 1999).

Por fim, diante da falta de disponibilidade de doadores compatíveis que se torna uma grande limitação ao TCPH, o SCUP vem sendo explorado como uma fonte de CT cada vez mais utilizada em transplantes alogênico (DALEY et al., 2012). Dentre as inúmeras vantagens

desta modalidade de obtenção de CTH, Rodrigues et al. (2010) destacaram a maior facilidade de se encontrar doadores e, portanto, a realização de transplantes mais rapidamente tendo em vista que as sorologias e o antígeno leucocitário humano (HLA) da unidade de SCUP já estariam definidas no momento da criopreservação; menor risco de doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD) devido ao baixo número e imaturidade de linfócitos T no SCUP; risco diminuído de infecções virais e ausência de risco para os doadores (recém-nascido e mãe) no momento da coleta.

Para Nagamura-Inoue e He (2014), a principal desvantagem da coleta de CTH de SCUP consta na necessidade de se confirmar a saúde do bebê como doador, porque não é possível determinar antecipadamente se o doador crescerá normalmente sem problemas de saúde. Isso implica a realização de testes genômicos ou cromossômicos. Em contraste, no caso de um doador de MO, o médico pode examinar diretamente o doador e, em seguida, decidir pela realização da coleta ou não. Contudo, Cornetta et al. (2005) ressaltaram que existem desvantagens na modalidade do SCUP, tais como o fato de apresentar um log a menos de células progenitoras hematopoéticas do que quando extraídas da MO ou do SPM. Devido a essa menor concentração, pode implicar em um maior risco de falha de enxertia e maior lentidão na reconstituição hematopoética e imune. As tentativas de superar essas limitações incluíram estratégias diferentes, como a infusão de duas unidades diferentes de SCUP ou a expansão *ex vivo* de células CD34⁺ usando uma variedade de combinações de citocinas que são capazes de promover o ciclo e a divisão subsequente das células CD34⁺ (CHAURASIA et al., 2014).

1.3.1 Expansão *ex vivo* de CTH

Devido à baixa quantidade de CTH obtidas a partir do SPM e de SCUP, principalmente, houve a iminente necessidade de se desenvolver protocolos para expandir as CTH e assim, tentar suprir a crescente demanda dos transplantes (DALEY et al., 2012; NAGAMURA-INOUE e HE, 2014). As CTH humanas expressam como marcadores de diferenciação CD34, CD133, CD90 e CD38, que são utilizados para separá-los do resto das populações celulares da MO (YUCEL e KOCABAS, 2017). Embora grande passo ter sido dado em direção ao uso da diferenciação dirigida de CTE e reprogramação de células somáticas para a geração de CT e derivados do sangue, ainda estamos longe do uso de derivados de sangue produzidos *in vitro* na prática clínica (BATTA et al., 2016).

De acordo com Zonari et al. (2017), a terapia gênica *ex vivo* baseada em CTH CD34⁺ mostrou resultados promissores em ensaios clínicos, mas a engenharia genética em níveis

elevados e em grande escala continua sendo um desafio. Assim, os autores desenvolveram uma estratégia de triagem que captura mais de 90% da atividade de CTH em menos de 10% de células CD34⁺ do SPM que permitiu a elaboração de um protocolo de transplante baseado em CTHs altamente purificadas, geneticamente modificadas e co-infundidas com células progenitoras não cultivadas.

Zhang et al. (2017) demonstraram a possibilidade de otimização das condições de cultura e desenvolveram um sistema de cultura de dispositivos de viragem de garrafas para a geração *ex vivo* de eritrócitos humanos em larga escala a partir de células CD34⁺ de SCUP. A partir das condições de cultura, uma célula CD34⁺ de SCUP poderia ser induzida *ex vivo* para produzir até 200 milhões de eritrócitos com uma pureza de 90,1% $\pm$ 6,2% e 50% $\pm$ 5,7% (média $\pm$ SD) para células CD235a⁺ e células enucleadas, respectivamente. O resultado obtido indicou que o rendimento de eritrócitos derivados de uma unidade de SCUP (5 milhões de células CD34⁺) poderia, em teoria, ser equivalente a 500 unidades de transfusões de sangue para aplicações clínicas.

Neste mesmo sentido, Chaurasia et al. (2014), relataram em seu estudo que as células de SCUP que expressam CD34⁺ apresentam uma extensa capacidade hematopoética e rápida divisão *ex vivo* na presença de uma combinação de determinadas citocinas. No entanto, muitas destas células perdem sua capacidade de proliferação medular. A fim de reduzir esse declínio, os autores procederam o tratamento de células CD34⁺ com inibidores de histona desacetilase (HDACI) (ácido valpróico) sob condições de cultura livre de soro e mostraram ser capazes de gerar células CD34⁺ adicionais. Descobriram ainda que o tratamento com HDACI foi capaz de programar a divisão de células CD34⁺ de SCUP de modo a gerar um maior número de células primitivas, que eram capazes de repovoar camundongos SCID receptores irradiados, apresentando deficiência imune e adquirida sem o desenvolvimento de neoplasias hematológicas ou teratomas. A análise demonstrou que o número de células de repovoamento no camundongo SCID foi 36 vezes maior em células tratadas com ácido valpróico em comparação com as células primárias CD34⁺ de SCUP. Esses dados indicam que as estratégias usadas por Chaurasia et al. (2014) aumentam a regulação dos fatores de transcrição específicos das CT resultando na preservação da autorrenovação e da capacidade de diferenciação em multilinhagens da divisão de CTH de SCUP. Essas tentativas iniciais de expansão de CTE *ex vivo* resultaram na geração de um maior número de células progenitoras e precursoras hematopoéticas, mas um número reduzido de células de repovoamento da MO a longo prazo.

O microambiente especializado que mantém o estado das CTHs é conhecido como o nicho de CT, dentro do qual várias células de suporte produzem fatores de crescimento e sinais

extracelulares que mantêm as reservas das células tronco por controlarem a auto renovação e diferenciação dessas células. A natureza desse nicho tem sido alvo de intensa investigação já que manter o número adequado de CT é essencial para a compreensão do desenvolvimento para assegurar a regeneração dos tecidos e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (SONG et al., 2010).

Ainda que novos sistemas de expansão de CTH sejam constantemente estudados e os fatores de crescimento e citocinas continuem sendo amplamente descritos, existem dificuldades a serem superadas como a ineficiência na manutenção de CTH em estado indiferenciado e a capacidade de expandir essas células em grande escala (GANJI et al., 2015; YUCEL e KOCABAS 2017).

1.4 CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES COMO FONTE DE CTH

Células-tronco embrionárias humanas (CTEh) são células derivadas do embrião inicial que podem ser propagadas indefinidamente no estado indiferenciado primitivo, permanecendo pluripotentes. Elas compartilham essas propriedades com células germinativas embrionárias e podem se diferenciar em múltiplos tipos de células somáticas (PERA, REUBINOFF E TROUNSON, 2000). Como o uso das CTEh envolve uma série de questões éticas abrangendo o uso de embriões humanos, e questões de segurança, devido a possibilidades de rejeição imunológica, as células pluripotentes induzidas (iPSC, do inglês *induced pluripotent stem cells*) surgiram como uma busca por fontes alternativas mais viáveis (HENTZE et al., 2009; MARCO SEGRE & GABRIELA GUZ, 2006).

As CTEh e iPSC são muito semelhantes e possuem a capacidade de se diferenciar em vários tipos celulares ao serem submetidas a diferenciação *in vitro* (GANJI et al., 2015). Contudo, fornecem uma fonte renovável para a geração de linhagens de células sanguíneas, recentemente, vem sendo demonstrado que a geração de CTH a partir de CT pluripotentes humanas *in vitro* tem um grande potencial como fontes alternativas de células para o transplante clínico (CHICHA et al., 2015).

Lu et al. (2008) relataram a diferenciação de CTEh em eritrócitos portadores de oxigênio funcionais em larga escala (10^{10} - 10^{11} células/CTEh de placas de 6 poços), com até 60% de taxa de enucleação. Já o grupo de Igor Slivkin (2016), da Universidade de Wisconsin, relatou que os fatores de transcrição GATA2 e TAL1 são capazes de converter diretamente o CTEh em endotélio, que subsequentemente se transforma em células sanguíneas com potencial eritro-

megacariocítico. Este processo resultou ser significativamente eficiente com a geração de 33 milhões de células CD43⁺ a partir de um milhão de CTEh H1 após sete dias de expansão.

Takahashi & Yamanaka (2006) demonstraram que células somáticas podem ser reprogramadas em iPSC superexpressando quatro genes (Oct3, Oct4, Sox2 e Nanog) que codificam fatores de transcrição relacionados à pluripotência. Essas células adquirem propriedades similares às CTEh com relação a morfologia, proliferação, expressão de alguns dos genes marcadores de CTEh e formação de teratomas (tumores típicos de células pluripotentes) após o transplante subcutâneo destas células em camundongos imunodeficientes.

As células iPSC foram geradas utilizando diversos tipos celulares animais e humanos com padrões moleculares e funcionais semelhantes aos de CTEh (MAHERALI et al., 2007; WERNIG et al., 2007; AOI et al., 2008; LOWRY et al., 2008; OKITA et al., 2008; PICANÇO-CASTRO et al., 2011), como o potencial de crescimento celular, a atividade da telomerase, os padrões de metilação do DNA e de modificações de histonas e a expressão de marcadores de superfície, incluindo SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA (tumor-related antigen)-1-60, TRA-1-81, bem como o padrão de expressão gênica (LEWITZKY & YAMANAKA, 2007; SCHEPER & COPRAY, 2009).

A derivação de eritrócitos funcionais e maduros com expressão de hemoglobina a partir de iPSC é de suma importância do ponto de vista clínico. A geração definitiva de glóbulos vermelhos somente pode ser obtida através da produção de CTHs verdadeiras e por isso grande esforço tem sido aplicado a fim de se obter tais células a partir de iPSC. Contudo, os resultados têm sido em grande parte insatisfatórios, devido aos vieses e limitações encontradas nos modelos animais, sobretudo os murinos, para avaliação da funcionalidade das células geradas *in vitro* (DEMIRCI e TISDALE, 2018).

1.4.1 Diferenciação Hematopoética

As células pluripotentes humanas, quando cultivadas sob condições específicas, têm a capacidade de se diferenciar em CTH, dando origem a linhagens eritroides, mieloides e linfoides, por meio de determinados métodos de diferenciação (ORLOVSKAYA et al., 2008; MARTIN et al., 2008; AMABILE et al., 2013; PEARSON et al., 2015). As técnicas para tal consistem na formação de corpos embrioides na presença de citocinas ou por meio de co-cultivo com células do estromais (COSTA, 2012; AMABILE et al., 2013). Muitos grupos vêm estabelecendo a diferenciação hematopoética a partir de células pluripotentes, no entanto as

células obtidas são progenitores de curta duração *in vivo* e sem boa funcionalidade *in vitro* (VO e DALEY, 2015).

Tanto os eritroblastos quanto os megacariócitos (precursores de glóbulos vermelhos e plaquetas, respectivamente) são difíceis de expandir *in vitro*. O processo de diferenciação *in vitro* a partir de CTH é relativamente curto e, infelizmente, o número de CTHs que pode ser alcançado pela doação voluntária é bastante baixo e dificilmente escalável. Como consequência, a atenção voltou-se para as CT pluripotentes e para a busca de modelos eficientes no processo de diferenciação hematopoética (FOCOSI e AMABILE, 2017).

1.4.2 Doença do Enxerto Contra o Hospedeiro (GvHD)

A doença do enxerto contra o hospedeiro (GvHD) é a principal fonte de morbidade e mortalidade após o transplante de CTH (FUJII et al., 2015). O desenvolvimento de GvHD é uma complicação potencialmente fatal que geralmente começa com uma fase aguda, sendo então afetada pela forma crônica da doença. O desenvolvimento de GvHD nos camundongos depende da reatividade do xenotransplante de CTH humanas que apresentam o Antígeno Leucocitário Humano (HLA), sendo este um complexo genético que codifica o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) humano de classe I ou classe II (PETERSDORF, 2013).

Esse problema foi descrito pela primeira vez em camundongos que receberam células alogênicas de baço e, após irradiação, desenvolveram doença fatal secundária (anormalidades da pele e diarreia) como resultado da introdução de células imunologicamente competentes em um hospedeiro imunossuprimido (CHAO e CHEN, 2006).

Nos anos, o progresso na compreensão da fisiopatologia desse processo baseado na imunidade ajudou a redefinir a reação enxerto *versus* hospedeiro e abriu novas possibilidades para abordagens mais atuais com função preventiva e terapêutica. A evolução no campo da imunologia alargou os horizontes do transplante de CTH, levando à disponibilidade de diferentes fontes de CT para potenciais enxertos e incorporação de novos regimes de condicionamento, embora existam dados conflitantes sobre o impacto destes dois fatores usados no processo de enxerto alogênico de CTH e o maior risco de incidência de GvHD. Inúmeros estudos relataram aumento do risco de GvHD crônico e, em menor grau, da forma aguda com o uso de CT do SPM e MO em comparação com SCUP (FLOWERS et al., 2011; ANASETTI, AVERSA e BRUNSTEIN et al., 2012).

Assim, observa-se que o regime de condicionamento, seja mieloablativo, não mieloablativo ou de intensidade reduzida, pode ter um impacto diferente sobre a incidência de GvHD. Diversas modalidades preventivas foram adotadas por diferentes centros de transplantes, mas, até o momento, não existe um regime padronizado. Quanto ao tratamento, a imunossupressão usando esteróides continua a ser a primeira linha de intervenção. Várias opções terapêuticas estão sendo investigadas para o tratamento do GvHD refratário a esteroides, incluindo o uso de células-tronco mesenquimais, globulina anti-timócito e fotoforese extracorpórea (NASSEREDINE et al., 2017)

Sabe-se que as células T periféricas podem ser encontradas como linfócitos T (LT) virgens ou efetores e de memória. As células T de memória são heterogêneas e podem ser subdivididas em frações de memória efetora (T_{EM}) e memória central (T_{CM}) pelo fenótipo da superfície e pela função. Os LT_{EM} rapidamente expressam-se ativadas após a reestimulação, migram preferencialmente para os tecidos inflamados e baço sendo relativamente eliminadas nos linfonodos periféricos. No entanto, já foi relatado que $LT_{EM} CD4^+$ e $CD8^+$ têm uma capacidade reduzida para induzir GvHD (ZHENG et al., 2009; ALI et al., 2012).

O GvHD agudo em camundongos NSG pode ser comparado com o GvHD humano agudo no sentido de gerar uma cascata de citocinas por linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ ativados (VAN RIJN et al., 2003). Os camundongos que desenvolvem sinais clínicos de GvHD apresentam mais de 15% de perda de peso, postura encurvada, perda da elasticidade de pele, mobilidade reduzida, taquipneia e anemia (VAN RIJN et al., 2003; ALI et al., 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Os modelos murinos são amplamente utilizados para avaliação da enxertia e funcionalidade de vários tipos celulares *in vivo*. Nos últimos 5 anos, nosso grupo de pesquisa vem estudando a diferenciação hematopoética *in vitro* e foi desenvolvido um protocolo de diferenciação aparentemente mais eficiente do que os protocolos descritos na literatura.

Este projeto visa o estabelecimento de um modelo de camundongo imunodeficiente para avaliação *in vivo* das CTH obtidas da diferenciação de CTEh e se estes são capazes de sustentar e reconstituir todas as células da linhagem hematopoética.

3 HIPÓTESE

O camundongo NOD/SCID IL2R γ ^{null} é um modelo animal de amplo uso para avaliação de enxertia de células e tecidos humanos e as tentativas de desenvolver modelos que refletem mais de perto as respostas imunológicas humanas continuam a ser desenvolvidas.

Várias linhagens de camundongos imunodeficientes, têm proporcionado uma reconstituição robusta de células e tecidos humanos e um grande avanço foi a eliminação da cadeia gama do receptor de interleucina-2. Atualmente, os camundongos ainda vêm sendo melhorados para sustentarem a enxertia de células e tecidos humanos e desenvolverem um sistema imunológico humano funcional.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um modelo para xenotransplante de células hematopoéticas humanas e testar a capacidade funcional *in vivo* de reconstituição hematopoética em camundongos imunodeficientes irradiados utilizando CTH obtidas da diferenciação *in vitro* de células pluripotentes humanas e SCUP.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Padronizar a dose de irradiação subletal e tempo de sobrevivência dos camundongos;
2. Realizar o transplante retro orbital com CTH obtidas de SCUP;
3. Avaliar o potencial funcional de reconstituição hematopoética *in vivo* das células de SCUP em camundongos NOD/SCID IL2R γ ^{null} para validar o modelo;
4. Avaliar o potencial funcional de reconstituição hematopoética *in vivo* das CTH obtidas da diferenciação de CTEh em camundongos NOD/SCID IL2R γ ^{null}.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 PROCEDIMENTO LEGAL E TÉCNICO PARA COLETA DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL

A condução da pesquisa respeitou os aspectos éticos previstos e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (nº do parecer: 3028/2017) e pela comissão de pesquisa do Centro de Referência da Saúde da Mulher de Ribeirão Preto – MATER (parecer n. 005/2017). As participantes foram esclarecidas sobre os procedimentos da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As bolsas de SCUP foram mantidas em temperatura de 4° C até o momento de processamento. Os critérios de inclusão foram: idade gestacional acima de 35 semanas, início da gravidez no ciclo natural, peso fetal igual ou superior a 2000g, bolsa rota há menos de 18 horas, trabalho de parto sem anormalidades, ausência de processos infecciosos durante a gestação que possam interferir com a vitalidade placentária e no mínimo, duas consultas pré-natais documentadas. Os critérios para exclusão foram pacientes que apresentaram patologia extragenital grave, histórico de anormalidades obstétricas, transplante de órgãos, câncer, sinais de displasia do tecido conjuntivo, doenças infecciosas e inflamatórias (incluindo análise positiva para vírus das hepatites B e C, HIV, citomegalovírus e Micoplasma) e patologias neonatais, como doenças de desenvolvimento congênitas, fetos de pequeno porte e aberrações cromossômicas.

O procedimento realizado para coleta de SCUP é um processo simples e indolor para a mãe e para o recém-nascido e não os expõem a qualquer risco ou promove interferência nos procedimentos do parto. O SCUP deve ser inicialmente pinçado e cortado. Em seguida, com a placenta ainda aderida ao útero, o cordão foi esterilizado sendo inserida uma agulha, conectada a uma bolsa de coleta contendo uma solução anticoagulante CPDA (Citrato/fosfato/dextrose/adenina), na veia de maior calibre do cordão, para a realização da retirada de uma pequena quantidade de sangue (cerca de 70 a 100 ml) que permaneceram no cordão e na placenta. Assim, o sangue fluíu para a bolsa por gravidade até cessar o gotejamento. Durante esse processo não houve contato com o ar, garantindo total proteção do material coletado contra contaminação.

Após terminada a coleta, uma amostra de sangue foi retirada para análise da quantidade, viabilidade das células e testes sorológicos. As bolsas foram levadas ao banco de SCUP onde foram criopreservadas.

5.2 LINHAGENS CELULARES E CULTURA PRIMÁRIA

5.2.1 Isolamento e Congelamento das Células-Tronco Hematopoéticas do Sangue de Cordão Umbilical

Antes da redução de volume das bolsas com SCUP foi realizada a contagem de células nucleadas totais através de um contador automático de células e avaliado a viabilidade e quantificação celular. O isolamento das células foi realizado pela metodologia manual, por meio de centrifugação por gradiente de densidade em Ficoll-Hypaque®. Para isso, foi transferindo 10 ml de sangue para tubos de centrífugas de 50 ml, contendo 20 ml de solução de PBS-1x em cada tubo e homogeneizando cada suspensão celular com o auxílio de uma pipeta sorológica. A seguir, foram adicionados 13 ml de solução Ficoll-Hypaque gentilmente no fundo de cada tubo contendo o sangue previamente diluído. O material foi submetido a centrifugação em centrífuga refrigerada para tubos a 700xG por 30 minutos à 22°C, sem aceleração e sem breque a fim de promover o gradiente de densidade e separação das populações celulares. O anel de células mononucleares formado após a centrifugação foi coletado e transferido para tubos de centrífuga de 50 ml. As células coletadas foram lavadas, adicionando 40 ml de solução de PBS-1x e homogeneizado em seguida. Precedeu-se a centrifugação a 400xG por 10 minutos à 22°C e foi desprezado o sobrenadante, esse processo de centrifugação foi repetido duas vezes a 400xG por 10 minutos à 22°C. Ao final, formou-se um *pool* com todas as suspensões celulares em um único tubo e foi realizado a contagem em contador automático.

Para controle microbiológico, foi retirado aproximadamente 100 µl de células da suspensão celular e completado o volume para 1 ml de solução salina tamponada (PBS 1x) ou meio de cultura suplementado. Esta suspensão foi inoculada em um frasco de controle microbiológico para análise.

O concentrado de células nucleadas, foi criopreservada em vials na concentração de 1×10^7 em solução crioprotetora composta por 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro fetal bovino (SFB).

5.2.2 Células-tronco Embrionárias Humanas

A linhagem H1 de CTEh foi adquirida da empresa WiCell (Madison, WI, USA) e cultivadas no Laboratório de Terapia Celular para estabelecimento de bancos de CTEh.

5.2.3 Cultivo e expansão das células-tronco embrionárias humanas

A linhagem H1 foi mantida como células indiferenciadas em co-cultivo com MEF ou em cultivo sobre matrigel (Corning) em meio mTSER (StemCell Technologies).

As culturas de CTEh foram repicadas a cada 5 a 7 dias, ou quando necessário.

5.2.4 Diferenciação Hematopoética das Células Pluripotentes

Neste trabalho utilizamos células hematopoéticas obtidas a partir da diferenciação por co-cultivos com MEFs, de acordo com o protocolo desenvolvido por Costa (2012), gentilmente cedidas pelo Dr. Everton Costa do Laboratório de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto.

Assim, as CTEh foram mantidas em cultura em estado indiferenciado, repicadas em grandes fragmentos e transferidas para placas de 6 poços (pré-tratadas com gelatina 0,1%) sobre uma camada de MEF inativadas com mitomicina-C (Sigma-Aldrich, MO, USA) em 1ml de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM)/F-12 suplementado com 15% de *Knockout Serum Replacement*, 1% de aminoácidos não-essenciais, 1% de L-glutamina, 0,1mM β -mercaptoetanol, 5 ng/ml de basic-FGF e 1% de penicilina/estreptomicina por 24 horas para adaptação das colônias às novas condições. Em seguida, foi iniciada a diferenciação das células (D+0) com DMEM *High Glucose*, 15% de SFB (adicionado de 1% de aminoácidos não-essenciais, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina) suplementado com BMP4 (25ng/ml), SCF (100ng/ml), TPO (25ng/ml) e VEGF (25ng/ml) durante as primeiras 72 horas. Após os três primeiros dias (D+3), as colônias de CTEh aderidas às MEFs foram cultivadas em meio DMEM *High Glucose* 15% SFB (suplementado com 1% de aminoácidos não-essenciais, 1% de L-glutamina e 1% de penicilina/estreptomicina) suplementado com SCF (100ng/ml), G-CSF (20ng/ml), IL-3 (20ng/ml), IL-6 (20ng/ml), EPO (5UI/ml), IGF-I (20ng/ml) e FLT3L (20ng/ml), trocando 2/3 desse segundo meio de cultivo a cada três dias.

5.2.5 Caracterização Imunofenotípica das Células Hematopoéticas

A caracterização imunofenotípica das CTEh e do SCUP foi realizada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos determinados presente na membrana citoplasmática ou nuclear da célula. Para tal caracterização, foi estabelecido um painel imunofenotípico contendo os marcadores de pluripotência (Oct/4, nanog e Sox2) e hematopoéticos linhagem-específicos.

Foi realizada a caracterização imunofenotipagem das CTEh indiferenciadas e das células hematopoéticas obtidas em diferentes períodos da diferenciação. A execução do painel foi feita com o citômetro FACSCalibur™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados com o software CELLQuest™ (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) (Figura 2).

Os seguintes anticorpos monoclonais (BD Biosciences, MD, USA) foram utilizados: CD45, CD16, CD38, CD20, CD43, CD31, CD45, CD71, CD235a, CD33e Sox2 conjugados com FITC; CD34, CD43, CD71, CD15, CD19, CD56, CD8, CD11b, CD14, CD235a, CD3, CXCR4, KDR e AC133 conjugados com PE (do inglês, *phycoeritrin*); CD34, CD117, CXCR4, CD4 e CD3 conjugados com PerCP (do inglês, *peridinin chlorophyll*), CD45, CD90, CD13, CD8 e CD4 conjugados com APC (do inglês, *allophycocyanin*) (Figura 2). Como controles, para avaliar marcações inespecíficas, foram utilizados isotipos controles de imunoglobulinas G conjugados com FITC (do inglês *Fluorescein isothiocyanate*), PE, PerCP e APC.

Figura 2. Caracterização Imunofenotípica das CTH para os marcadores hematopoéticos não-específicos. A caracterização foi realizada nos dias 24 e 31 de diferenciação.

Fonte: Costa, 2012.

5.3 EXPERIMENTAÇÃO EM CAMUNDONGOS

Os procedimentos experimentais utilizando os camundongos NOD/SCID IL2R γ ^{null} foram aprovados pelo Comitê de ética de Uso Animal (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, registrado sob o parecer n. 148/2015, e de acordo com os Princípios éticos em Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Neste trabalho foram utilizados 60 camundongos fêmeas, com 8-12 semanas de idade, pesando aproximadamente 26g. Em todos os experimentos os camundongos foram avaliados diariamente quanto ao seu estado de saúde (alimentação, hidratação e mobilidade). Aqueles que demonstraram desconforto, incomodo, apatia ou outros problemas relacionados aos procedimentos experimentais eram eutanasiados para evitar sofrimento.

5.3.1 Determinações da dose de irradiação e avaliação do tempo de sobrevida dos camundongos

Os camundongos foram irradiados em aparelho de raio-x (RS-2000 – Rad Source), sob condições de barreira sanitária rigorosa com 3 doses: 125, 150 e 175 cGy, para avaliação do tempo de sobrevida dos mesmos. Para cada dose de irradiação foram utilizados cinco camundongos fêmeas NOD/SCID IL2R γ^{null} .

Após a irradiação, os camundongos foram avaliados diariamente quanto a hidratação (através do turgor de pele, umidade de membranas mucosas, posição do globo ocular, tempo de preenchimento capilar), mobilidade e nutrição (através da produção de fezes). Quando necessário, esses camundongos eram submetidos a hidratação subcutânea com solução de cloreto de sódio 0,9% para amenizar a desidratação decorrente. Os camundongos receberam aplicação subcutânea de antibiótico (enrofloxacina) na dose de 5mg/Kg a cada 12 horas durante os cinco dias após a irradiação. A cada 3-5 dias foram coletados 20 μ L de sangue venoso (via veia submandibular) diluídos em 6 μ L de PBS citrato 0,32%, para avaliação da depleção celular sanguínea e as análises feitas em contador hematológico de células humanas.

5.3.2 Transplante de Células-Tronco Hematopoéticas Derivadas de Células-Tronco Embrionárias humanas ou do Sangue de Cordão Umbilical em Camundongos NOD/SCID IL2R γ^{null}

Para o transplante de células hematopoéticas utilizou-se os camundongos irradiados com a dose subletal estabelecida de 150 cGy. Tais camundongos receberam a enxertia de CTH ou de SCUP, por duas vias distintas, a retro orbital ou intraóssea.

Para este procedimento, os camundongos foram anestesiados 24 horas após a irradiação numa câmara de indução com isoflurano 4%. Foram transplantados, por via intravenosa (via retro orbital), com o auxílio de uma agulha de insulina inserida no canto medial do olho, 200 μ L de suspensão celular contendo 1×10^6 células isoladas do sobrenadante da diferenciação e

células isoladas a partir da digestão total das colônias diferenciadas onde podiam ser observadas células hematopoéticas em desenvolvimento (n=5 animais) e células mononucleares totais isoladas de SCUP (n=6 animais). As células que já haviam sido filtradas após o descongelamento, foram refiltradas para a remoção de grumos celulares que haviam se formado nos tubos contendo as células para o transplante, de modo a evitar perda de camundongos e de material celular.

Para o transplante intraósseo, foram utilizados dez camundongos, divididos em dois grupos de cinco animais, que receberam duas concentrações diferentes de células por enxertia. Os camundongos foram anestesiados com cetamina 2% (100mg/kg) e xilazina 10% (10mg/kg) pela via intraperitoneal e mantidos em cone nasal com isofluorano 4%. Após confirmar a analgesia com teste de pinçamento da cauda e das falanges, o animal foi colocado em decúbito dorsal, a região do joelho foi tricotomizada e realizado antissepsia com álcool 70%. Assim, a articulação do joelho foi flexionada ao máximo e uma agulha 0.8mm de calibre 30G BD ultrafine, anexa a uma seringa de 0.3ml, foi introduzida na epífise da tíbia direita para aspiração de 10-20 μ L de medula óssea, esta foi descartada e utilizando-se da mesma abertura da agulha, um volume de 20 μ L de meio celular contendo 1×10^6 (Grupo 1) ou $0,75 \times 10^6$ (Grupo 2) de células mononucleares totais isoladas SCUP foi injetado na cavidade medular. Após o procedimento, cada animal recebeu analgésico opioide (tramadol, 25 mg/kg) via subcutânea a cada 12 horas, durante 3 dias e enrofloxacina subcutânea na dose de 5 mg/kg (2,27mg/ml) durante 5 dias.

A avaliação da enxertia do sangue periférico das células hematopoéticas foi realizada após 45 dias em contador hematológico de células humanas e citometria de fluxo, para tal exame foram coletados 200 μ L de sangue (via intracardíaca) em 1:10 de PBS citrato 0,32%, para tal procedimento, os camundongos foram anestesiados numa câmara de indução com isofluorano 4% e mantidos em cone nasal com isofluorano 2%. Após a coleta, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, dissecados e realizado “flushing” da MO dos ossos longos (fêmur e úmero) para obtenção das células medulares, baço e fígado também foram coletados e digeridos com solução de collagenase tipo IA 0,5% por 45 minutos e filtrados em peneira de 70 μ m.

5.3.2.1 Citometria de fluxo para avaliação do mosaicismismo das células humanas nos camundongos

Para avaliar o mosaicismismo de células humanas com as células do camundongo enxertado, após eutanasiados e recolhido os materiais biológicos (sangue, MO, baço e fígado), as células foram contadas e marcadas com anticorpo anti-CD45 humano para análise por citometria de fluxo.

Para a marcação celular, alíquotas de 100 μ L de suspensão celular contendo 10^5 células foram colocadas em tubos de poliestireno 12x75mm previamente identificados com os diferentes marcadores. Logo após, foram adicionados 5 μ L dos anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos e as amostras foram incubadas em ambiente escuro, a temperatura ambiente, por 15 min. Em seguida, foi adicionado 1ml de PBS 1X em cada tubo e as amostras foram centrifugadas a 500xG por três minutos. Os sobrenadantes foram desprezados, o pellet de cada tubo foi ressuspenso em 150 μ L de PBS 1X e as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software GraphPad Prism*, V8.02 (GraphPAD Software Inc., USA) para o sistema operacional Windows®. Foi adotado o nível de 5% para as análises, ou seja, foram considerados estatisticamente significativos *p*-valores menores ou iguais a 0,05.

5.5 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental das atividades realizadas no presente estudo estão descritos esquematicamente na figura 3.

Figura 3: Etapas para a realização transplante de CTH derivadas de CTEh e de SCUP em camundongos. 1) O processo foi iniciado pela obtenção de CTH derivadas da diferenciação de CTEh ou obtenção do SCUP. 2) Condicionamento do camundongo através de radiação X com 150 cGy. 3) Transplante a partir de duas vias distintas. 4) Avaliação diária quanto ao estado de saúde do camundongo. 5) Análise da enxertia após 45 dias de transplante.

Fonte: Próprio autor.

6 RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO FUNCIONAL *IN VIVO* DA DOSE DE IRRADIAÇÃO

No presente estudo foram testadas 3 doses de irradiação (125 cGy, 150 cGy e 175 cGy) e avaliada a sobrevivência dos camundongos, a aplasia medular e depleção de células hematopoéticas após 3 e 6 dias de irradiados para verificar qual a dose subletal de irradiação para a realização dos transplantes. Como demonstrado na figura 4, os camundongos que foram irradiados com as doses de 125 e 150 cGy, tiveram uma sobrevivência superior há 45 dias, enquanto os camundongos que receberam a dose de 175 cGy, não sobreviveram tempo superior a 7 dias (Figura 4).

Figura 4: Avaliação do tempo de sobrevida dos camundongos expostos às diferentes doses de irradiação.

Fonte: Próprio autor.

No grupo de 125 cGy, foi observado três óbitos até os dez dias após a irradiação, permanecendo dois camundongos por mais de 45 dias. No grupo de 150 cGy, foram quatro óbitos durante os dez dias após a irradiação, permanecendo apenas um animal por mais de 45 dias. Em 175 cGy, foram constatados dois óbitos, no quarto e sexto dia respectivamente após a irradiação, e no sétimo dia, os três camundongos restante evoluíram a óbito.

Em todos os camundongos foi observado, entre o 4º e 5º dia pós-irradiação, grave desidratação, mobilidade reduzida e mucosas hipocoradas. Um dos camundongos do grupo que recebeu a dose de irradiação de 125 cGy, no sétimo dia pós irradiação, apresentou-se com andar em círculos e inclinação lateral direita de cabeça, sendo o mesmo eutanasiado no oitavo dia para evitar sofrimento do animal. Nos grupos de 125 e 150 cGy, a partir do oitavo dia, todos os camundongos já estavam reestabelecidos quanto a hidratação, mobilidade e nutrição. Após 45 dias, os camundongos apresentavam reconstituição hematopoética restauradas e foram eutanasiados. Os camundongos do grupo de 175 cGy tiveram uma sobrevida pós-transplante de sete dias, sendo essa considerada uma dose letal de irradiação, como representado na figura 4.

Avaliando a depleção hematopoética, observou-se que, após seis dias da irradiação, os leucócitos tornaram-se inexistentes nas doses de 150 e 175 cGy, permanecendo com $0,4 \times 10^3$ células/mm³ na dose de 125 cGy. Já avaliando a contagem de hemácias, observou-se que estas células caíram para concentração inferior à de 2×10^6 células/mm³ na dose de 150 cGy e mantiveram-se entre $4,0$ e $3,0 \times 10^6$ células/mm³ em 125 e 175 cGy, respectivamente. Avaliando-se as plaquetas, em 150 cGy, houve uma redução para menos de 40×10^3 plaquetas/mm³,

permanecendo 60×10^3 plaquetas/ mm^3 em 125 cGy e em cerca de 135×10^3 plaquetas/ mm^3 em 175 cGy. Esses resultados mostram a elevada taxa de depleção quando avaliados os componentes do sangue periférico (Figura 5).

Figura 5: Avaliação hematológica da influência da irradiação. De acordo com a dose empregada nos dias 0, 3 e 6 após a exposição de camundongos quanto à contagem de: 5A) leucócitos; 5B) hemácias e 5C) plaquetas. (Número de animais: 125 cGy: 2; 150 cGy: 1 e 175 cGy: 3.)

Fonte: Próprio autor.

Diante destes resultados, avaliou-se que 150cGy foi a dose de irradiação mais apropriada para pré-tratamento dos animais antes de serem realizados os transplantes de células diferenciadas a partir de CTEh e de SCUP.

6.2 TRANSPLANTE DE CÉLULAS DO SCUP PELA VIA RETRO ORBITAL

Do grupo formado por sete camundongos, um animal foi utilizado como controle, recebendo somente a irradiação. Após 45 dias, o sangue periférico, o baço, o fígado e a MO dos ossos longos do animal controle foram avaliados por citometria de fluxo quanto a positividade de células CD45. Constatou-se que o anticorpo humano anti-CD45 não reagiu com as células do camundongo, sendo o mesmo utilizado nos ensaios posteriores para detecção da presença de células humanas CD45⁺ em camundongos.

Os demais camundongos do grupo (6 camundongos) foram irradiados e transplantados com células mononucleares totais isoladas de SCUP (1×10^6 células, Grupo A), via retro orbital aproximadamente 24 horas após a irradiação. Um animal evoluiu a óbito não sendo possível coletar amostras frescas para a análise da enxertia.

Dez dias após o transplante, dois camundongos apresentaram desidratação (grave e leve), sendo necessário reidratá-los com solução de NaCl 0,9% subcutânea. No décimo primeiro dia, esses dois camundongos também evoluíram a óbito, inviabilizando a coleta de amostras frescas com tecidos viáveis para estudo da enxertia, restando três camundongos saudáveis para esta finalidade.

A avaliação da enxertia das células de SCUP foi realizada após 45 dias por meio de hemograma e citometria de fluxo (Figura 6). O baço, fígado e MO dos ossos longos (fêmur e úmero) também foram analisados quanto ao mosaicismos com células humanas por citometria de fluxo, indicado pela positividade para o marcador CD45.

Figura 6: Porcentagem de células CD45⁺ (humanas) em camundongos transplantados com SCUP. Os camundongos NSG foram transplantados com um pool de 1×10^6 (6A) e $0,75 \times 10^6$ (6B e 6C) células mononucleares isoladas de SCUP e, após 45 dias, baço, fígado, MO e sangue periférico de camundongos foram coletados e avaliados quanto à expressão do marcador CD45 por citometria de fluxo. (N=3, devido a 3 óbitos no grupo)

Fonte: Próprio autor.

Figura 7. Análise dos grupos de SCUP. Comparativo da enxertia de SCUP nos órgãos e sangue dos camundongos, transplantados com duas doses diferentes.

Fonte: Próprio autor.

A enxertia das células humanas nos camundongos transplantados, no grupo 6A apresentou-se elevada, porém com grande variação. O percentual médio e mediana, respectivamente, de enxertia com células humanas no baço foi de $9,97\% \pm 3,82\%$ e $10,50\%$; no fígado, de $6,57\% \pm 6,17\%$ e $6,01\%$; na medula óssea, de $10,1\% \pm 10,70\%$ e $6,94\%$; e no sangue periférico, de $0,94\% \pm 1,25\%$ e $0,45\%$, sendo encontrado o mais baixo quimerismo comparado aos demais órgãos.

No grupo 6B e 6C, o percentual médio e mediana, respectivamente, de enxertia com células humanas no baço foi de $21,43\% \pm 25,04\%$ e $12,90\%$; no fígado, de $7,02\% \pm 8,66\%$ e $5,04\%$; na medula óssea, de $14,11\% \pm 17,40\%$ e $7,20\%$; e no sangue periférico, de $0,85\% \pm 0,92\%$ e $0,28\%$, analisado na figura 7. A diferença no quimerismo entre os grupos 6B e 6C, pode ser atribuído ao fato de serem usados nos transplantes, SCUP diferentes, visto que os

mesmos também apresentam concentrações celulares distintas, mostrando variações nas enxertias dos camundongos.

6.3 TRANSPLANTE DE CTH DIFERENCIADAS A PARTIR DAS CTEh PELA VIA RETRO ORBITAL

A capacidade de enxertia *in vivo* de células hematopoéticas (1×10^6 células) derivadas de CTEh foram testadas por transplante retro orbital, em um grupo de 5 camundongos irradiados.

Imediatamente após o transplante, um animal evoluiu a óbito, um deles apresentou sinais neurológicos (andar em círculos) e outro apresentou letargia e pouca mobilidade. Após a filtração da suspensão celular, realizou-se o transplante por via retro orbital no 4º animal do grupo (que teve uma marcação na orelha) que apresentou recuperação lenta da anestesia e letargia. Dentre os camundongos que receberam o pool de 1×10^6 células, dois evoluíram a óbito no dia seguinte, o camundongo com a marcação na orelha, ou seja, o que recebeu a enxertia após a refiltragem, no 9º dia pós-transplante, estava desidratado, apático e sem se locomover. Foi então realizada a eutanásia para posterior avaliação dos órgãos (baço, fígado e MO de ossos longos, não sendo possível a coleta de sangue periférico pela alta debilidade do animal), a fim de avaliar a possível enxertia das células, como demonstrado na figura 8A.

Figura 8: Porcentagem de células CD45⁺ (humanas) em camundongo transplantado com células diferenciadas das CTEh pela via retro orbital. Os camundongos NSG foram transplantados com um pool de 1×10^6 (8A) e $0,75 \times 10^6$ (8B) de CTH diferenciadas das CTEh pela via retro orbital, após 9 e 45 dias do transplante foi realizado a análise de baço, fígado, MO e sangue periférico para avaliação quanto à expressão do marcador CD45 por citometria de fluxo.

Fonte: Próprio autor.

No animal da figura 8A, transplantado com 1×10^6 CTH diferenciadas de CTEh, foi observada uma baixa frequência de células humanas nos órgãos avaliados. Essa enxertia pode ser atribuída, em princípio, ao curto período de tempo entre o dia do transplante e o dia de avaliação (9 dias).

Para evitar novas perdas de animais e material celular, outro grupo de seis camundongos foi formado e a concentração de infusão reduzida em 25%. Este segundo grupo recebeu, via retro orbital, a quantidade de $0,75 \times 10^6$ células da mesma mistura celular, novamente filtrada. Todos os camundongos reagiram bem após o transplante, recuperando rapidamente da anestesia e sem apresentar nenhuma anormalidade fisiológica. Após 45 dias, os seis camundongos restantes foram eutanasiados e o sangue periférico, baço, MO dos ossos longos e fígado foram coletados para processamento e análise da enxertia das células humanas.

Constatou-se que todos os camundongos apresentaram uma baixa e uniforme enxertia nos órgãos avaliados. O resultado da análise do animal do grupo que recebeu o pool de $0,75 \times 10^6$ CTH diferenciadas a partir de CTE, está descrito abaixo e na Figura 8B.

Figura 9. Análise dos grupos de CTEh. Comparativo da enxertia de CTEh nos órgãos e sangue dos camundongos, transplantados com duas doses diferentes.

Fonte: Próprio autor.

O percentual médio de enxertia e mediana, respectivamente, dos camundongos da figura 9, no baço foi de $1,95\% \pm 4,13\%$ e $0,50\%$; no fígado, de $0,97\% \pm 1,87\%$ e $0,10$; na MO, de $1,45\% \pm 2,85\%$ e $0,41\%$; e no sangue periférico, de $0,3\% \pm 0,34\%$ e $0,05$, sendo encontrado, novamente, o mais baixo quimerismo comparado aos demais órgãos.

6.4 TRANSPLANTE DE CÉLULAS DO SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL HUMANO PELA VIA INTRAÓSSEA

A via intraóssea, utilizada rotineiramente para enxertia, foi testada no presente estudo a fim de verificar se promoveria melhores resultados quando comparados à via retro orbital.

Os resultados obtidos dizem respeito a dois grupos de cinco animais cada, que receberam células mononucleares totais isoladas de SCUP na concentração de 1×10^6 e $0,75 \times 10^6$.

Durante o transplante, fora observado em três camundongos do grupo de $0,75 \times 10^6$, leve extravasamento com perda de material da cavidade medular. Logo após o transplante, um animal apresentou andar em círculos para o lado esquerdo, o que pode estar relacionado ao estresse da manipulação. Apesar disso, todos os camundongos se recuperaram normalmente da anestesia e durante os primeiros 10 dias foram monitorados e alimentados com girassol e ração umedecida. Após 50 dias do transplante, os camundongos de ambos os grupos foram eutanasiados para coleta dos órgãos e sangue para análise por citometria de fluxo. Nesta avaliação, não foram identificadas enxertia de células isoladas de SCUP humano nos órgãos avaliados, conforme exemplificado na figura 10A e 10B abaixo. A falha na enxertia desta via se

deve ao fato de erro técnico, necessitando mais experimentos e padronização para a análise eficaz desta via.

Figura 10: Análise por citometria de fluxo de diferentes órgãos dos camundongos que receberam enxertia de células isoladas de SCUP por via intraóssea. Os camundongos NSG foram transplantados com um pool de 1×10^6 (10A) e $0,75 \times 10^6$ (10B) pela via intraóssea e após 50 dias do transplante foi realizado a análise de baço, fígado, MO e sangue periférico para avaliação quanto à expressão do marcador CD45 por citometria de fluxo. Foram escolhidos os resultados referentes a um animal de cada grupo para exemplificar o padrão obtido na análise de todos os animais.

10A

10B

Fonte: Próprio autor.

7 DISCUSSÃO

Modelos animais são usados como substitutos da biologia humana devido às restrições logísticas e éticas de se trabalhar com amostras de células e tecidos de doadores humanos. Pequenos animais, como camundongos e ratos, são amplamente usados como sistemas de modelo de mamíferos devido ao seu pequeno tamanho, facilidade de manutenção e manuseio, um curto ciclo reprodutivo, compartilhamento de propriedades genômicas e fisiológicas com humanos e capacidade de serem prontamente manipulados geneticamente (WALSH et al., 2017). Estes são muito utilizados em pesquisas de doenças infecciosas, hematológicas, imunológicas e oncologia e os protocolos para geração de linhagens de camundongos humanizados ainda estão em desenvolvimento devido a necessidade de se melhorar a enxertia e a função das células humanas (KANG et al., 2016).

Apesar da vasta quantidade de biologia básica obtida a partir de estudos com camundongos, existem limitações aos modelos de camundongos ao investigar a biologia humana. Vários componentes dos sistemas biológicos desses animais são incongruentes com os dos seres humanos, particularmente o sistema imunológico (ZSCHALER, SCHLORKE e ARNHOLD, 2014). Quando enxertados com células, tecidos e sistemas imunológicos humanos, as respostas biológicas em camundongos humanizados NOD SCID IL-2R γ^{null} recapitulam à mais fielmente observada em humanos do que em qualquer modelo anterior de camundongos humanizados (SHULTZ et al., 2007; BREHM et al., 2010; SHULTZ et al., 2012; BREHM et al., 2016).

Em se tratando de modelos animais, camundongos NOD SCID IL2R γ^{null} (NSG), por serem deficientes nas atividades de células T, B e NK, tornam-se a opção ideal para estabelecer camundongos humanizados (KANG et al., 2016). No exame histológico de tecidos linfoides, demonstraram ausência de células linfoides e algumas estruturas císticas no timo, ausência de folículos no baço e diminuição celular marcante dos gânglios linfáticos. São ainda deficientes em linfócitos maduros, com níveis de anticorpos séricos não detectável e com atividade citotóxica de NK extremamente baixa (VERMA et al., 2017). Em contrapartida, são animais resistentes ao desenvolvimento de linfomas, mesmo após o condicionamento com irradiação subletal. Demonstraram apoiar prontamente o enxerto de CTH CD34⁺ e representam um modelo superior e de sobrevida longa, adequado para estudos que empregam estratégias de xenotransplante (AUDIGÉE et al., 2017).

De acordo com Wunderlich et al. (2009), os camundongos NSG são capazes de oferecer um enxerto sustentado por mais tempo com predomínio de linfócitos B e um componente menor

de células T. Também exibem níveis aumentados de células humanas na periferia, permitindo uma avaliação mais fácil da enxertia. Assim, essa foi a linhagem de camundongos selecionada para a realização deste estudo, uma vez que considerou a exposição prévia dos animais a irradiação e a necessidade de se manterem vivos por tempo suficiente para análise da enxertia. A exposição à radiação e a certos agentes quimioterápicos provoca a supressão da MO de forma aguda, preparando o camundongo para receber a enxertia, no entanto, conduz a defeitos hematopoéticos residuais a longo prazo devido a danos na auto renovação das CT hematopoéticas (WILSON et al., 2010). Assim, iniciou-se a etapa onde diferentes doses de radiação ionizante foram testadas, definindo-se como padrão a de 150 cGy. Com esta dose, permitiu-se um tempo de sobrevivência superior a quinze dias, tempo mínimo necessário para que haja a migração e enxertia das células hematopoéticas, além de se confirmar a depleção de leucócitos de modo satisfatório, como demonstrado na figura 5.

As CTHs são, indiscutivelmente, as células mais bem caracterizadas, embora haja muito para ser aprendido sobre seu comportamento e a influência do seu microambiente (SONG et al., 2010). Pode se inferir assim, que avanços nas técnicas e entendimento dos xenotransplantes, somados aos avanços na terapia com CT podem impulsionar avanços históricos na Medicina, que vão desde a melhor compreensão e propostas de tratamento para doenças autoimunes até a substituição de órgãos que perderam sua função (WALSH et al., 2017).

Visto que o SCUP é uma das fontes de CTHs, o mesmo apresenta algumas limitações, incluindo uma menor concentração de células, resultando em uma enxertia lenta ou fraca (METHENY et al., 2016). Na tentativa de eliminar esta limitação, protocolos de expansão *in vitro* têm sido desenvolvidos com sucessos relativos para suprir a demanda de transplantes (XU et al., 2010; PINEAULT e ABU-KHADER, 2015). A escolha do marcador CD45 para análise por citometria de fluxo se deve ao fato de que ele é um marcador expresso na superfície de todos os leucócitos humanos: linfócitos, eosinófilos, monócitos, basófilos e neutrófilos sendo, o maior componente da membrana de linfócitos (SODRÉ, 2009).

No presente estudo, foram comparadas as enxertias a partir de SCUP com as CTHs derivadas de CTEh, uma vez que fora utilizado o ensaio de reconstituição hematopoética *in vivo*. Os resultados obtidos confirmaram a existência de CTH no interior da MO e de órgãos, como o baço e fígado dos camundongos após quarenta e cinco dias do transplante, e que a hematopoese foi restabelecida e as células CD45⁺ humanas estavam presentes, porém em baixas quantidades. Sobretudo, os resultados aqui apresentados enfatizaram o descrito na literatura, porém não ultrapassando a 1,5% de enxertia de CTH diferenciadas a partir de CTEh na MO.

No estudo de Chen et al. (2012), usando CT mesenquimais humanas derivadas de MO e células endoteliais formadoras de colônias derivadas de sangue periférico humano, foram descritos os seguintes resultados após a citometria de fluxo: $1,5\% \pm 0,4\%$ das células de sangue periférico, $4,6\% \pm 0,9\%$ das células do fêmur e $4,8\% \pm 0,8\%$ das células nos ossos extra medulares, foram positivas para o CD45 humano ($n = 3$). Após 11 semanas, os camundongos sobreviventes foram analisados e, $57,1\% \pm 7,6\%$ das células presentes nos ossos extra medulares e $49,7\% \pm 5,8\%$ das células encontradas no fêmur, eram CD45⁺ humanas.

Song et al. (2010) adaptaram um modelo heterotópico de formação óssea como uma alternativa para o estudo do microambiente das CTHs *in vivo*. Para isso, ossículos foram desenvolvidos com ou sem tratamento com hormônio paratireoide anabólico (PTH) durante 4 semanas, em seguida, as CTHs foram classificadas fenotipicamente a partir da MO ossicular, sinalizando os marcadores da família de moléculas de ativação linfocítica (CD105 e CD48) e infundidas em camundongos irradiados. Quando células de MO foram diretamente infundidas nos ossículos após a irradiação letal, os grupos tratados com PTH mostraram uma taxa de reconstituição aumentada em comparação com os controles. Estas CTHs marcadas mostraram atividade de reconstituição similar às CTHs da MO. Deste modo, os autores demonstraram que as CTHs residem na MO heterotópica tanto por ensaios funcionais quanto por classificação fenotípica e que as CTHs endógenas hospedadas nos ossículos de engenharia de tecidos e as CTHs dos ossículos separadas individualmente foram capazes de reconstituir camundongos irradiados letalmente.

A via pela qual a enxertia é realizada é outro aspecto que traz implicações para o resultado final. Foram testadas as vias retro orbital e intraóssea que demonstraram diferenças importantes na evolução dos ensaios. Paralelamente, a quantidade de células injetadas ($0,75 \times 10^6$ ou 1×10^6 células) foi um segundo fator que, associado à via escolhida, contribuiu para um melhor desfecho. Por conter células grandes (população celular muito heterogenia) e com alta expressão de matriz celular, além das células hematopoéticas, o grupo que recebeu um pool maior de células (1×10^6) por via retro orbital apresentou maior índice de complicações, como déficit neurológico e óbito, que pode ter ocorrido devido a agregação celular após o transplante e sequente obstrução vascular. No entanto, mesmo com a redução na quantidade de células infundidas e utilizando vias diferentes, foi notável a perda de animais nos grupos formados para todos os experimentos, se tratando esse fato como uma limitação do presente estudo. Os animais que evoluíram a óbito no curso dos experimentos não podiam ser utilizados para coleta de sangue periférico e órgãos, reduzindo o número de réplicas e, portanto, interferindo na confiabilidade dos resultados.

Além de um pool menor de células ($0,75 \times 10^6$), a opção pela via intraóssea resultou em menos óbitos por grupo, como visto no experimento realizado pela infusão de células de SCUP por via intraóssea. No entanto, nesse ensaio não foi constada enxertia dos camundongos no sangue periférico ou órgãos. Embora com apenas três camundongos ao fim do ensaio, o grupo que recebeu 1×10^6 células oriundas de SCUP por via retro orbital foi aquele com maior porcentagem de quimerismo, tanto no sangue periférico quanto nos órgãos analisados no presente estudo.

Sugere-se que, uma das possibilidades de se otimizar os resultados aqui obtidos poderia ser pela opção de uma linhagem de camundongos, derivada do cruzamento de NOD/SCID IL2R γ ^{null} com NOD/SCID-SGM3 (NS-SGM), denominada NCG-SGM3. Tais camundongos demonstraram ser ainda mais promissores para os ensaios de enxertia. O NSG-SGM3 combina algumas das propriedades úteis das linhagens de seus progenitores, além de expressarem transgenes para o ligante humano SCF/KIT (KITLG), GM-CSF / fator estimulante de colônia 2 (CSF2) e IL-3. Mostrou-se ainda que a eficiência do xenotransplante da leucemia mieloide aguda é significativamente melhorada em camundongos NOD-SCID IL2R γ ^{null} que expressam constitutivamente SCF humano, GM-CSF e IL-3 (BILLERBECK et al., 2011). Os enxertos permanecem em níveis elevados e sustentados ao longo de 16 semanas, mantendo uma contribuição mieloide / linfóide bastante equilibrada. O quimerismo é prontamente detectável tanto na periferia, como na MO. Em 8 semanas após o transplante, os autores relataram observar consistentemente alta enxertia mieloide de células T humanas e expansão muito superior ao que observamos em camundongos NSG em experimentos paralelos usando as mesmas amostras de SCUP. A análise por citometria de fluxo revelou a presença de numerosas subpopulações de células T, sugerindo recapitulação significativa do desenvolvimento e função de células T humanas em camundongos NSG-SGM3. Embora ainda não esteja claro por que a combinação única de expressão de citocinas pelo SGM3 e nocaute de IL2R γ promove o enxerto e expansão de células T humanas aprimoradas, este animal apresenta uma oportunidade melhorada para examinar o desenvolvimento e função de células T humanas em um cenário de xenoenxerto, bem como modelagem de células T doenças associadas, incluindo infecção por vírus do HIV, GvHD e leucemia de células T (WUNDERLICH et al., 2009).

8 CONCLUSÃO

Com a realização desse estudo foi possível concluir que, para alcançar uma adequada enxertia é necessário que o animal tenha uma sobrevida de no mínimo quinze dias após a irradiação e a dose de 150cGy, foi a ideal para alcançar esse período e proporcionar uma mieloablação satisfatória para a realização do transplante.

Após a infusão de células de SCUP e de CTEh, observou-se que o organismo murino sustentou satisfatoriamente as células humanas, porém com um quimerismo bem reduzido. As células humanas CD45⁺ foram identificadas em ossos longos e órgãos após 4 semanas à infusão. Estes dados indicam que os camundongos NOD/SCID IL2R γ ^{null} proporcionam um microambiente hematopoético favorável para a funcionalidade das células humanas e que as CTEh podem ser fonte de CTH para transplantes. No entanto, essas células precisam ser investigadas no que tange aos fatores que aumentem a sua sobrevida e manutenção *in vivo*, otimizando a enxertia. Sugere-se que, uma das possibilidades de se otimizar os resultados aqui obtidos poderia ser pela opção de uma linhagem de camundongos, derivada do cruzamento de NOD/SCID IL2R γ ^{null} com NOD/SCID-SGM3 (NS-SGM), denominada NCG-SGM3. Tais camundongos demonstraram ser ainda mais promissores para ensaios de enxertia, visto que possuem a tecnologia para produzir trombopoetina humana (ZHANG e Su, 2010), além de expressam SCF (fator de crescimento importante para sobrevivência, proliferação e diferenciação de CTH), GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos) e IL-3 (estimulador de linhagens hematopoéticas), fornecendo melhores resultados de expansões de células mieloides humanas (WUNDERLICH et al., 2010).

REFERÊNCIAS

- ALI, N. et al. Xenogeneic Graft-versus-Host-Disease in NOD-scid IL-2R γ^{null} Mice Display a T-Effector Memory Phenotype. **PLOS One**, v. 7, n. 8, p. e44219, 2012.
- AMABILE, G. et al. *In vivo* generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. **Blood**, v. 121, n. 8, p. 1255-1264, 2013.
- ANASETTI, C.; AVERSA, F.; BRUNSTEIN, C. G. Back to the future: mismatched unrelated donor, haploidentical related donor, or unrelated umbilical cord blood transplantation? **Biol Blood Marrow Transplant.**, v. 18, p. 161–5, 2012.
- ANDERLINI, P. et al. Allogeneic blood progenitor cell collection in normal donors after mobilization with filgrastim: the M.D. Anderson Cancer Center experience. **Transfusion**, v. 39, p. 555-60, 1999.
- ANGELOPOLOU, M. K. et al. A preclinical xenotransplantation animal model to assess human hematopoietic stem cell engraftment. **Transfusion**, v. 44, n. 4, p. 555-66, 2004.
- AOI, T. et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. **Science**, v. 321, p. 699 –702, 2008.
- AUDIGÉ, A. et al. Long-term leukocyte reconstitution in NSG mice transplanted with human cord blood hematopoietic stem and progenitor cells. **BMC Immunology**, v. 18, n. 1, p. 28, 2017.
- BATTA, K. et al. Concise Review: Recent Advances in the In Vitro Derivation of Blood Cell Populations. **Stem Cells Transl Med.**, v. 5, n. 10, p. 1330-1337, 2016.
- BILLERBECK, E. et al. Development of human CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in human stem cell factor–, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor–, and interleukin-3–expressing NOD-SCID IL2R γ^{null} humanized mice. **Blood**. v. 117, n.11, p. 3076–3086, 2011.
- BREHM, M. A. et al. Chapter 11 - Humanized Mice in Translational Immunology A2 - Tan, Seng-Lai In: **Translational Immunology**. Academic Press; Boston: 2016. p. 285–326.
- BREHM, M. A.; SHULTZ, L. D.; GREINER, D. L. Humanized mouse models to study human diseases. *Curr Opin Endocrinol* **Diabetes Obes.**, v. 17, n. 2, p. 120-5, 2010.
- CALVI, L. M.; LINK, D. C. Cellular complexity of the bone marrow hematopoietic stem cell niche. **Calcif Tissue Int.**, v. 94, n. 1, p. 112-24, 2013.
- CHAO, N.J.; CHEN, B. J. Prophylaxis and treatment of acute graft-versus-host disease. **Semin Hematol.**, v. 43, n. 1, p. 32-41, 2006.
- CHARBORD P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. **Hum Gene Ther.**, v. 21, n. 9, p. 1045-56, 2010.

CHAURASIA, P. et al. Epigenetic reprogramming induces the expansion of cord blood stem cells. **J clin investigat.**, v. 124, n. 6, p. 2378-95, 2014.

CHEN, Y.; JACAMO, R.; ANDREEFF, M. Human extramedullary bone marrow in mice: a novel in vivo model of genetically controlled hematopoietic microenvironment. **Blood.**, v. 119, n. 21, p. 4971–4980, 2012.

CIUREA, S. O.; ANDERSSON, B. S. Busulfan in hematopoietic stem cell transplantation. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 15, n. 5, p. 523-36, 2009.

COPELAN, E. A. Hematopoietic stem-cell transplantation. **N Engl J Med.**, v. 354, n. 17, p.1813–26, 2006.

COREY, S. J. et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 118–129, 2007.

CORNETTA, K. et al. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 11, n. 2, p. 149-60, 2005.

COSTA, E. B. O. **Caracterização das células-tronco/progenitoras hematopoéticas de células-tronco embrionárias humanas in vitro em sistema de co-cultivo com fibroblastos de embriões murinos.** 2012. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo.

DALEY, G. Q. The promise and perils of stem cell therapeutics. **Cell Stem Cell.**, v. 10, n. 6, p. 740-749, 2012.

DAMDIMOPOULOU, P. et al. Human embryonic cells. **Best Pract Clin Obstet Gynaecol.**, v. 31, p. 2-12, 2016.

DEMIRCI, S.; TISDALE, J. F. Definitive Erythropoiesis from Pluripotent Stem Cells: Recent Advances and Perspectives. **Adv Exp Med Biol.**, v. 1107, p. 1-13, 2018.

DURAN-STRUUCK, R.; ROBERT, C. D. Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies” Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. **JAALAS**, v. 48, n. 1, p. 11-22, 2009.

FLOWERS, M. E. et al. Comparative analysis of risk factors for acute graft-versus-host disease and for chronic graft-versus-host disease according to National Institutes of Health consensus criteria. **Blood.**, v. 117, p. 3214–3219, 2011.

FOCOSI, D.; AMABILE, G. Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Red Blood Cells and Platelet Concentrates: From Bench to Bedside. **Cells**, v. 7, n. 1, p. 2, 2017.

FUJII, S. et al. Graft-Versus-Host Disease Amelioration by Human Bone Marrow Mesenchymal Stromal/Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Is Associated with Peripheral Preservation of Naive T Cell Populations. **Stem Cells**, v. 36, n. 3, p. 434-445, 2018.

GANJI, F. et al. Differentiation potential of o bombay human-induced pluripotent stem cells and human embryonic stem cells into fetal erythroid-like cells. **Cell journal**, v. 16, n. 4, p. 426-39, 2015.

GIBSON, B. W. et al. Comparison of Cesium-137 and X-ray Irradiators by Using Bone Marrow Transplant Reconstitution in C57BL/6J Mice. **Comp Med.**, v. 65, n. 3, p. 165-72, 2015.

GREINER, D. L.; HESSELTON, R. A.; SHULTZ, L. D. SCID mouse models of human stem cell engraftment. **Stem Cells.**, v. 16, n. 3, p. 166-77, 1998.

GYURKOCZA, B.; REZVANI, A.; STORB, R. F. Allogeneic hematopoietic cell transplantation: the state of the art. **Expert Rev Hematol.**, v. 3, n. 3, p. 285-99, 2010.

HASSAN, M. The role of busulfan in bone marrow transplantation. **Med Oncol.**, v. 16, n. 3, p. 166-76, 1999.

HENTZE, H. et al. Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. **Stem Cell Res.**, v. 2, n. 3, p. 198-210, 2009.

IVANOVA, N. B. et al. A stem cell molecular signature. **Science**, v. 298, p. 601-4, 2002.

IVANOV, A. et al. Identification of the niche and phenotype of the first human hematopoietic stem cells. **Stem Cell Rep.**, v. 2, p. 449–56, 2014.

IVANOV, A. et al. Highly potent human hematopoietic stem cells first emerge in the intraembryonic aorta-gonad-mesonephros region. **J Exp Med.**, v. 208, p. 2417–27, 2011.

JANGALWE, S. et al. Improved B cell development in humanized NOD-scid IL2R γ null mice transgenically expressing human stem cell factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. **Immun Inflamm Dis**, v. 4, n. 4, p. 427-40, 2016.

KANG, E. M. et al. Busulfan pharmacokinetics, toxicity, and low-dose conditioning for autologous transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells in the rhesus macaque model. **Exp Hematol**, v. 34, n. 2, p. 132-9, 2006.

KANG, Y. K. et al. Humanizing NOD/SCID/IL-2R γ null (NSG) mice using busulfan and retro-orbital injection of umbilical cord blood-derived CD34⁺ cells. **Blood Res.**, v. 51, n. 1, p. 31-6, 2016.

KAUFMAN, D. S.; THOMSON, J. A. Human ES cells -haematopoiesis and transplantation strategies. **J Anat.**, v. 200, n. 3, p. 243-8, 2002.

KÖRBLING, M.; FREIREICH, E. J. Twenty-five years of peripheral blood stem cell transplantation. **Blood.**, v. 117, n. 24, p. 6411-6, 2011.

LEWITZKY, M.; YAMANAKA, S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. **Curr Opin Biotechnol**, v. 18, n. 5, p. 467-473, 2007.

LOWRY, W. E. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci**, v. 105, p. 2883–8, 2008.

- LU, S. J. et al. Biologic properties and enucleation of red blood cells from human embryonic stem cells. **Blood**, v. 112, n. 12, p. 4475-84, 2008.
- MAHERALI, N. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. **Cell Stem Cell**, v. 1, p. 55–70, 2017.
- MARSON, P.; PETRIS, M. G.; DE SILVESTRO, G. Collection of peripheral blood stem cells in paediatric patients: a concise review on technical aspects. **Bone Marrow Transplant**, v. 22, n. 5, p. S7-S11, 1998.
- MARTIN, C. H. et al. Differences in lymphocyte developmental potential between human embryonic stem cell and umbilical cord blood–derived hematopoietic progenitor cells. **Blood**, v.112, n.7 p.2730-7, 2008.
- MERCER, E. M.; LIN, Y. C.; MURRE, C. Factors and networks that underpin early hematopoiesis. **Semin Immunol.**, v. 23, p. 317–325, 2011.
- METHENY, L. et al. Intra-osseous Co-transplantation of CD34-selected Umbilical Cord Blood and Mesenchymal Stromal Cells. **Hematol Med Oncol.**, v. 1, n. 1, p. 25–29, 2016.
- MOIGNARD, V. et al. Characterization of transcriptional networks in blood stem and progenitor cells using high-throughput single-cell gene expression analysis. **Nat Cell Biol.**, v. 15, p. 363–372, 2013.
- NAGAMURA-INOUE, T.; HE, H. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Their advantages and potential clinical utility. **World J Stem Cells**, v. 6, n. 2, p. 195-202, 2014.
- NESSEREDINE, S. et al. Acute Graft Versus Host Disease: A Comprehensive Review. **Anticancer Res.**, v. 37, n. 4, p. 1547-55, 2017.
- NOVERSHTERN, N. et al. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. **Cell**, v. 144, p. 296–309, 2011.
- OKITA, K. et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. **Science**, v. 322, p. 949-53, 2008.
- ORLOVSKAYA, I. et al. Hematopoietic differentiation of embryonic stem cells. **Methods**, v. 45, p.159–167, 2008.
- PASSWEG, J. R. et al. Hematopoietic stem cell transplantation in Europe 2014: more than 40 000 transplants annually. **Bone Marrow Transplant.**, v. 51, n. 6, p. 786-92, 2016.
- PEAKE, K. et al. Busulfan as a myelosuppressive agent for generating stable high-level bone marrow chimerism in mice. **J Vis Exp.**, v. 98, p. 52553, 2015.
- PEARSON, S. et al. *In Vivo* Repopulating Activity Emerges at the Onset of Hematopoietic Specification during Embryonic Stem Cell Differentiation. **Stem Cell Reports.**, v. 4, p.431–444, 2015.
- PERA MF1, REUBINOFF B, TROUNSON A.J. Human embryonic stem cells. **Cell Sci.**, v. 113, n. 1, p. 5-10, 2000.

PETERSDORF, E. W. The major histocompatibility complex: a model for understanding graft-versus-host disease. **Blood**, v. 122, n. 11, p. 1863-72, 2013.

PICANÇO-CASTRO, V. et al. Pluripotent reprogramming of fibroblasts by lentiviral-mediated insertion of SOX2, C-MYC and TCL-1A. **Stem Cells Dev**, v. 20, n. 1, p. 169-80, 2011.

PINEAULT, N.; ABU-KHADER, A. Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. **Exp Hematol.**, v. 43, n. 7, p. 498-513, 2015.

RIDDELL, J. et al. Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors. **Cell**, v. 157, p. 549–564, 2014.

RODRIGUES, C. A. et al. Transplante de sangue de cordão umbilical - SCU. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.32, suppl.1, p. 08-12, 2010.

RODRIGUES, C. A. et al. “Alternative donor hematopoietic stem cell transplantation for mature lymphoid malignancies after reduced-intensity conditioning regimen: similar outcomes with umbilical cord blood and unrelated donor peripheral blood” **Haematologica**, v. 99, n. 2, p. 370-7, 2014.

RONGVAUX, A. et al. Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Pnas)**, v. 108 n.6, p. 2378-83, 2011.

SCHEPER, W.; COPRAY, S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. **Stem Cell Rev**, v. 5, n. 3, p. 204-223, 2009.

SEGRE, M.; GUZ, G. Aspectos éticos e legais das pesquisas e tratamento com células-tronco. In: ZAGO, M.A.; COVAS, D.T. (Eds.) Células-tronco - a nova fronteira da medicina. São Paulo: Editora Atheneu, 2006, p. 225-233.

SERTORIO, M. et al. In Vivo RNAi Screen Unveils PPAR γ as a Regulator of Hematopoietic Stem Cell Homeostasis. **Stem Cell Reports**, v. 8, n. 5, p. 1242-1255, 2017.

SEVILLA, J. et al. Granulocyte colony-stimulating factor alone at 12 ug/Kg twice a day for 4 days for peripheral blood progenitor cell priming in pediatric patients. **Bone Marrow Transplant**, v. 30, p. 417-20, 2002.

SHULTZ, L. D.; ISHIKAWA, F.; GREINER, D. L. Humanized mice in translational biomedical research. **Nat Rev Immunol.**, v. 7, p. 118–130, 2007.

SHULTZ, L. et al. Humanized mice for immune system investigation: progress, promise and challenges. **Nat Rev Immunol.**, v. 12, n. 11, p. 786-98, 2012.

SLUKVIN I. I. Generating human hematopoietic stem cells in vitro -exploring endothelial to hematopoietic transition as a portal for stemness acquisition. **FEBS letters**, n. 590, v. 22, p. 4126-43, 2016.

SODRÉ, L. **Validação de anticorpo monoclonal anti-CD45 obtido in house para utilização em citometria de fluxo e imuno-histoquímica.** 2009, 60 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2009.

SONG, J. et al. An *in vivo* model to study and manipulate the hematopoietic stem cell niche. **Blood.**, v. 115, n. 13, p. 2592-2600, 2010.

STEEL, C. D. et al. Comparison of the lateral tail vein and the retro-orbital venous sinus as routes of intravenous drug delivery in a transgenic mouse model. **Lab Anim (NY)**, v. 37, p. 26–32, 2008.

STOLFI, J. L. et al. Preclinical modeling of hematopoietic stem cell transplantation – advantages and limitations. **FEBS Journal**, v. 283, p. 1595-1606, 2016.

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

VAN RIJN, R. S. et al. A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2^{-/-} γ c^{-/-} double-mutant mice. **Blood**, v. 102, p. 2522-31, 2003.

VERBIEST, T. et al. NOD Scid Gamma Mice Are Permissive to Allogeneic HSC Transplantation without Prior Conditioning. **Int J Mol Sci.**, v. 17, n. 11, p E1850, 2016.

VERMA, M. K et al. A novel hemolytic complement-sufficient NSG mouse model supports studies of complement-mediated antitumor activity in vivo. **J Immunol Methods**, v. 446, p. 47-53, 2017.

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

WALSH, N. C. Humanized Mouse Models of Clinical Disease. **Annu Rev Pathol.**, v. 24, n. 12, p. 187-215, 2017.

WANG, M. et al. The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. **Immunol.**, v. 126, n. 2, p. 220-32, 2002.

WATERS, R. S. et al. The effects of interleukin-2 on immune response regulation. **Math Med Biol.**, v. 35, n. 1, p. 79-119, 2018.

WERNIG, M. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature**, v. 448, p. 318–24, 2007.

WILSON, K. D. et al. Effects of ionizing radiation on self-renewal and pluripotency of human embryonic stem cells. **Cancer Res.**, v. 70, n. 13, p. 5539-48, 2010.

WUNDERLICH, M.; MULLOY, J. C. Model systems for examining effects of leukemia-associated oncogenes in primary human CD34⁺ cells via retroviral transduction. **Methods Mol Biol.**, v. 538, p. 263–85, 2009.

XU, S. et al. An improved harvest and in vitro expansion protocol for murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, p. 105940, 2010.

YUCEL, D.; KOCABAS, F. Developments in Hematopoietic Stem Cell Expansion and Gene Editing Technologies. **Adv Exp Med Biol.**, v. 1079, p. 103-125, 2018.

ZHANG, Y. et al. Large-Scale Ex Vivo Generation of Human Red Blood Cells from Cord Blood CD34+ Cells. **Stem cells Transl Med.**, v. 6, n. 8, p. 1698-1709, 2017.

ZHENG, H. et al. Central memory CD8+ T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia. **J. Immunol.**, v. 182, n. 10, p. 5938-48, 2009.

ZHOU, Q. et al. Humanized NOD-SCID IL2rg^{-/-} mice as a preclinical model for cancer research and its potential use for individualized cancer therapies. **Elsevier**. v. 344, p. 13–19, 2014.

ZONARI, E. et al. Efficient Ex Vivo Engineering and Expansion of Highly Purified Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Populations for Gene Therapy. **Stem cell reports**, v. 8, n. 4, p. 977-990, 2017.

ZSCHALER, J.; SCHLORKE, D.; ARNHOLD, J. Differences in innate immune response between man and mouse. **Crit Rev Immunol.**, v. 34, n. 5, p. 433-54, 2014.

ANEXOS

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

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

Ribeirão Preto, 04 de abril de 2017.

Ofício nº 1010/2017
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 3028/2017

Prezadas Pesquisadoras,

O trabalho intitulado **“CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS DERIVADAS DE CÉLULAS EMBRIONÁRIAS HUMANAS NA RECUPERAÇÃO DA LINHAGEM MEDULAR EM CAMUNDONGOS” – Projeto de Pesquisa Versão 2 de 22/03/2017**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 447ª Reunião Ordinária realizada em 03/04/2017, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 de 21/03/2017.

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

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 466/2012 CNS/MS.

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

Atenciosamente.

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

Ilustríssimas Senhoras
FERNANDA LIMA VILAS BOAS
VIRGÍNIA PICAÑO E CASTRO (Orientadora)
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto - FUNDHERP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil /CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

ANEXO II – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DA MATER

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

Ref.: Células hematopoéticas derivadas de Células embionárias humanas na recuperação da linhagem medular em camundongos

Nº 005/2017

Fernanda Lima Vilas Boas

Prezado Pesquisador (a)

Informamos que o seu projeto foi avaliado pela Comissão de Pesquisa Clínica do CRSM-Mater no dia 26/05/2017 e considerado **aprovado** para realização nessa instituição.

Lembramos que essa aprovação pressupõe o cumprimento das seguintes necessidades:

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

Atenciosamente,

PROF.ª DR.ª FLÁVIA AZEVEDO GOMES-SPONHOLZ

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

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

ANEXO III – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

We certify that the protocol n° 148/2015, entitled "*Hematopoietic Cells Derived From Human Embryonic Cells In Recovery Of Bone Marrow In Mice*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 02/29/2016.

Ribeirão Preto, 29 de fevereiro de 2016.

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