

**FLAVIA ZATTAR PIAZERA**

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE, DOS MARCADORES  
IMUNITÁRIOS E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO  
HEMATOPOETICAS HUMANAS CRIOPRESERVADAS**

Brasília, Distrito Federal

2023

**FLAVIA ZATTAR PIAZERA**

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE, DOS MARCADORES  
IMUNITÁRIOS E DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO  
HEMATOPOETICAS HUMANAS CRIOPRESERVADAS**

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Médicas da Universidade de Brasília,  
como requisito para obtenção do título de  
Doutora em Ciências Médicas.

**Orientadora:** Profa. Dra. Selma Aparecida Souza Kückelhaus

Brasília, Distrito Federal

2023

## DEDICATÓRIA

Ao meu pai Flavio Piazero, *in memoriam* e a Daniel e Rafael, meus amores.

## AGRADECIMENTOS

Acredito que são muitos os coautores dessa conquista da minha vida. A perseverança mesmo em cenários com vários obstáculos não poderia eliminar o sonho de se realizar.

Meus agradecimentos se iniciam a minha orientadora Prof. Selma e Prof. Tatiana Karla que num dos momentos mais tristes da minha vida nunca desistiram de mim.

Aos meus colegas e supervisores de docência, Prof. Maria Alice Toledo, Prof. Ciro Martins, Prof. Gustavo Romero, prof. Ricardo Martins e Prof. Marcelo Palmeira pela confiança na minha capacidade profissional.

Um agradecimento a Prof. Neysa Regattieri e ao Prof. Pedro Sudbrack por me auxiliarem na etapa final da confecção desse sonho, bem como aos profissionais do Nupmia-FM/UnB e ao acadêmico David Nunes, que será um brilhante médico.

Ao meu marido Rafael de Sá Vasconcelos e ao meu filho Daniel por entenderem a minha ausência e as noites em claro na confecção desse trabalho.

A minha mãe Janete Zattar Piazero e minha irmã Camilla Zattar Piazero que fizeram eu acreditar que sou capaz de vencer as barreiras e realizar esse sonho. *In memoriam*, a minha avó Elvira Cabral Zattar e ao meu padrinho Zeha Miguel Zattar Neto que estão acompanhando espiritualmente essa conquista.

Ao meu pai Flavio Piazero a quem me ensinou sobre honestidade, disciplina e organização como bases para minha vida.

A Deus e nossa Senhora de Guadalupe que sem fé a existência humana se torna turva e sem objetivos.



## RESUMO

**Introdução:** As células tronco hematopoéticas (CTH) apresentam numerosas aplicações terapêuticas no tratamento de neoplasias hematológicas, doenças auto-imunes e na medicina regenerativa. As características clínicas, bioquímicas e imunitárias dos indivíduos são fatores relevantes na qualidade da CTH coletada e criopreservada, interferindo assim nos resultados dos transplantes de células tronco hematopoéticas. Os meios de culturas e substratos de cultivo são modelos *in vitro* necessários para viabilizar as pesquisas experimentais e use terapêutico. Esse estudo buscou caracterizar e avaliar a viabilidade e os marcadores imunitários de CTH humanas, assim como, para avaliar o papel da fibrina leucoplaquetária (FLP) como substrato para o cultivo dessas. **Métodos:** Trata-se de estudo descritivo e experimental conduzido com 14 amostras de CTH obtidas por aférese de 14 indivíduos adultos saudáveis. As amostras foram submetidas à tipagem para os antígenos do HLA pela técnica SSO e sistemas ABO/Rh por imunohematologia. A viabilidade e os tipos de morte regulada foram avaliados por citometria de fluxo. As espécies reativas foram avaliadas por citometria de fluxo (EROs/DCFDA; ERNs/DAFFM Diacetate). O potencial de diferenciação das CTH foi avaliado pela utilização de uma malha de fibrina como substrato; os resultados foram tabulados e analisados no programa Prism 5.0. **Resultados:** os doadores das CTH foram adultos jovens com parâmetros hematológicos e bioquímicos dentro dos valores normais de referência. O tempo de criopreservação de  $34 \pm 15$  meses reduziu em 2% o total de CTH-CD34+. Houve maior expressão dos loci A\*02, DRB1\* 04, DRB1\*07 para os antígenos HLA. Quanto ao tipo de morte celular regulada não houve diferença entre os percentuais de apoptose inicial, apoptose tardia e por mecanismo desconhecido. Quanto ao sistema ABO houve predomínio do tipo O (6 indivíduos), seguido pelo tipo A (5 indivíduos). Para o fator Rh houve predomínio do tipo positivo (10 indivíduos). Posteriormente à criopreservação houve grande variabilidade individual na produção de espécies reativas e maior produção de ERNs do que EROs pelo conjunto dos indivíduos. O uso da malha de fibrina favoreceu a antecipação do agrupamento celular (*homing* / 2 dias de incubação), enquanto na ausência da fibrina o agrupamento foi observado com 3 dias. A malha de fibrina favoreceu o surgimento de sinais de diferenciação celular (*pseudópodes* e *nucléolo* evidente) com 3 dias de incubação. **Conclusão:** O conjunto dos resultados mostraram que os parâmetros da criopreservação das CTH devem ser considerados para garantir a sua qualidade, pois houve redução na viabilidade das células quando descongeladas e algumas amostras tiveram metabolismo mitocondrial próximo de 0 (zero). Considerando que a malha de fibrina rica em plaquetas, proporcionou a adesão, o *homing* e os sinais de diferenciação celular, acredita-se que os parâmetros relacionados ao método de congelamento/descongelamento e ao tempo de criopreservação foram apropriados para garantir a qualidade das amostras de CTH. No entanto, sugere-se a continuidade dos estudos para determinar o efeito a curva de tempo x qualidade das células para auxiliar a tomada de decisão dos bancos nacionais de criopreservação de células tronco.

**Palavras chave:** aférese; criopreservação; EROs e ENOs; Tipagem HLA; Tipagem ABO; fibrina leucoplaquetária.

## ABSTRACT

**Introduction:** Hematopoietic stem cells (HSC) have numerous therapeutic applications in the treatment of hematologic malignancies, autoimmune diseases and in regenerative medicine. The clinical, biochemical and immunological characteristics of individuals are relevant factors in the quality of HSC collected and cryopreserved, thus interfering with the results of hematopoietic stem cell transplants. Culture media and culture substrates are in vitro models necessary to enable experimental research and therapeutic use. This study aimed to characterize and evaluate the viability and immune markers of human HSC, as well as to evaluate the role of platelet-rich fibrin (PRF) as a substrate for their cultivation. **Methods:** This is descriptive and experimental study conducted with 14 HSC samples obtained by apheresis from 14 healthy adult individuals. The samples were submitted to typing for HLA antigens by the SSO technique and ABO/Rh systems by immunohematology. Viability and types of regulated killing were assessed by flow cytometry. Reactive species were evaluated by flow cytometry (ROS/DCFDA; ERNs/DAFFM Diacetate). HSC differentiation potential was evaluated using a PRF as substrate; the results were tabulated and analyzed using the Prism 5.0 program. **Results:** HSC donors were young adults with hematological and biochemical parameters within normal reference values. The cryopreservation time of  $34 \pm 15$  months reduced in 2% the total HSC-CD34+. There was greater expression of the A\*02, DRB1\*04, DRB1\*07 loci for HLA antigens. As for the type of regulated cell death, there was no difference between the percentages of initial apoptosis, late apoptosis and by unknown mechanism. As for the ABO system, there was a predominance of type O (6 individuals), followed by type A (5 individuals). For the Rh factor there was a predominance of the positive type (10 individuals). After cryopreservation, there was great individual variability in the production of reactive species and greater production of ERNs than ROS by the group of individuals. The fibrin mesh favored the anticipation of cell grouping (homing / 2 days of incubation), while in the absence of fibrin, grouping was observed after 3 days. The fibrin mesh favored the appearance of signs of cell differentiation (pseudopods and evident nucleolus) after 3 days of incubation. **Conclusion:** The set of results showed that HSC cryopreservation parameters should be considered to ensure their quality, as there was a reduction in cell viability when thawed and some samples had mitochondrial metabolism close to 0 (zero). Considering that, the PRF mesh provided adhesion, homing and cell differentiation signals, it is believed that the parameters related to the freezing/thawing method and the cryopreservation time were appropriate to guarantee the quality of the samples. However, it is suggested the continuity of studies to determine the effect of the curve of time x cell quality to help the decision making of national banks of stem cell cryopreservation.

**Key words:** apheresis; cryopreservation; ROS and ENOs; HLA typing; ABO typing; platelet-rich fibrin.

## SUMÁRIO

-	RESUMO	v
-	ABSTRACT	vi
1	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1.1	CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	2
1.2	FONTES E OBTENÇÃO DAS CELULAS TRONCO HEMATOPOETICAS HUMANAS	3
1.3	CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	3
1.4	O PAPEL DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO(EROS) E DE NITROGÊNIO (ERNS) NAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	5
1.5	A HISTOCOMPATIBILIDADE DAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	6
1.6	A MALHA DE FIBRINA E SEU POTENCIAL REGENERATIVO	7
1.7	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	9
2	<b>OBJETIVOS</b>	11
2.1	OBJETIVO PRIMÁRIO	12
2.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIO	13
3	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	13
3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO	14
3.2	TIPO E LOCAL DO ESTUDO	14
3.3	NORMAS ÉTICAS	15
3.4	INDIVÍDUOS, CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO	15
3.5	OBTENÇÃO DO PERFIL EPIDEMIOLÓGICO	16
3.6	OBTENÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS PELA TÉCNICA DE AFÉRESE	16
3.7	ISOLAMENTO, QUANTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS POR CITOMETRIA DE FLUXO	17
3.8	TIPIFICAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE E SISTEMA ABO/Rh DOS INDIVÍDUOS	18
3.9	TÉCNICA DE CRIOPRESERVAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	19
3.10	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PÓS DESCONGELAMENTO DAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	21
3.11	OBTENÇÃO DA FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA	22
3.12	AVALIAÇÃO DA FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA COMO SUBSTRATO PARA O CULTIVO DAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	23
3.13	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	24
3.14	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25

4	<b>RESULTADOS</b>	26
4.1	PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS INDIVÍDUOS	27
4.2	PERFIL CLÍNICO DOS INDIVÍDUOS	28
4.2.1	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	28
4.2.2	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	29
4.3	ANÁLISE DA QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS CD34+POR ALÍQUOTA	30
4.4	AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE DAS CÉLULAS TRONCO PÓS DESCONGELAMENTO	31
4.5	IDENTIFICAÇÃO DOA ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDADE HLA E ANTÍGENOS ABO/Rh DOS INDIVÍDUOS	32
4.6	DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO	34
4.7	AVALIAÇÃO DO PAPEL DA FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA (FLP) COMO SUBSTRATO PARA AS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	35
4.8	SUMÁRIO DOS RESULTADOS	37
5	<b>DISCUSSÃO</b>	38
5.1	CONSIDERAÇÕES SOBRE PERFIL EPIDEMIOLÓGICO E CLÍNICO DOS DOADORES	39
5.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ANTÍGENOS EXPRESSOS PELOS INDIVÍDUOS	39
5.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE OS FATORES QUE INTERFEREM NA VIABILIDADE/MORTE DAS CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS	41
5.4	CONSIDERAÇÕES SOBRE DIFERENCIAÇÃO DAS CTH	48
5.5	CONTRIBUIÇÕES DO ESTUDO	51
6	<b>CONCLUSÃO</b>	53
7	<b>LIMITAÇÕES DO ESTUDO</b>	56
8	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	58
9	<b>ANEXOS</b>	67

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1</b>	Mecanismo de criopreservação da CTH.	4
<b>Figura 2</b>	Estrutura do gene HLA.	7
<b>Figura 3</b>	Desenho do estudo com CTH	14
<b>Figura 4</b>	Doador realizando coleta de CTH pela técnica de aférese	17
<b>Figura 5</b>	Técnica de execução da tipagem HLA pela metodologia de SSO	18
<b>Figura 6</b>	Técnica de tipagem de ABO pela metodologia de cartão gel	19
<b>Figura 7</b>	Amostra contendo bolsa de criopreservação	20
<b>Figura 8</b>	Curvas de congelamento programado de CTH	21
<b>Figura 9</b>	Exemplo do padrão de dispersão da análise de viabilidade celular por citometria de fluxo	22
<b>Figura 10</b>	Imagens de FLP obtidas por fotografia e fotomicrografia	23
<b>Figura 11</b>	Percentual de células CD34+ avaliado, antes e depois da criopreservação.	30
<b>Figura 12</b>	Percentual de células mortas por mortes reguladas das CTH CD34+ depois da criopreservação.	31
<b>Figura 13</b>	Percentual produção de EROS e ERNS na regulação da morte regulada das CTH CD34+ depois da criopreservação.	35
<b>Figura 14</b>	Produção de EROS e ERNS por CTH obtidas de 14 indivíduos.	35
<b>Figura 15</b>	Fotomicrografias de CTH incubadas com ou sem FLP.	37
<b>Tabela 1</b>	Perfil dos indivíduos do estudo.	27
<b>Tabela 2</b>	Perfil hematológico e bioquímico dos indivíduos do estudo.	28
<b>Tabela 3</b>	Perfil bioquímico dos indivíduos do estudo.	29
<b>Tabela 4</b>	Percentual de CTH-CD34+, antes e depois da criopreservação.	30
<b>Tabela 5</b>	Perfil dos antígenos HLA e do sistema ABO e fator Rh dos indivíduos.	33
<b>Tabela 6</b>	Tabela contendo sumários dos resultados dos experimentos.	38

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CTH	CÉLULA TRONCO HEMATOPOÉTICA
CD34	CLUSTTER DE DIFERENCIAÇÃO
THY-1	CÉLULAS DENDRÍTICAS EPIDÉRMICAS THY-1
C-KIT	RECEPTOR TIROSINAQUINASE TRANSMEMBRANA
HLA	ANTÍGENO DE LEUCOCITÁRIO HUMANO
CXCR4	C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 4
SDF-1	STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1
VLA4	VERY LATE ANTIGEN-4
VCAM-1	VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE 1
ABO	GRUPO SANGUÍNEOS ABO
SCU	SANGUE CORDÃO UMBILICAL
DECH	DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO
CO <sub>2</sub>	DIÓXIDO DE CARBONO
SSO	SEQUENCIAMENTO POR OLIGONUCLEOTÍDEOS
MHC	COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE MAIOR
FLP	FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA
G-CSF	ESTIMULANTE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS
NuPMIA	NÚCLEO DE PATOLOGIA, MORFOLOGIA, IMUNOLOGIA APLICADA
TCTH	TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS
STF	SALINA TAMPONADA COM FOSFATO
EUA	ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA
USA	UNITED STATE OF AMERICA
ISHAGE	INTERNATIONAL SOCIETY OF HEMATOTHERAPY AND GRAFT ENGINEERING
FITC	ISOCIANATO DE FLUORESCÉINA
LABSCAN	SCANNER DE CITOMETRIA DE BEADS
°C	GRAUS CENTÍGRADOS
PI	IODETO DE PROPÍDEO
ANVISA	AGÊNCIA DE VIGILANCIA SANITÁRIA
STF	SISTEMA DE TAMPONAMENTO COM BICARBONATO
RPMI	<i>ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE MEDIUM</i>
BSA	ALBUMINA DE SORO BOVINO
ERNS	ESPÉCIE REATIVA DE NITROGÊNIO
EROS	ESPÉCIE REATIVA DE OXIGÊNIO
DCFDA	DICLORODIHIIDROFLUORESCÉINA-DIACETATO
DAFFM	DIAMINOFLUORESCÉINA DIACETATO
CNT	CÉLULAS NUCLEADAS TOTAIS

CD34	CLUSTTER DE DIFERENCIAÇÃO
THY-1	CÉLULAS DENDRÍTICAS EPIDÉRMICAS THY-1
C-KIT	RECEPTOR TIROSINAQUINASE TRANSMEMBRANA
HLA	ANTÍGENO DE LEUCOCITÁRIO HUMANO
CXCR4	C-X-C CHEMOKINE RECEPTOR TYPE 4
SDF-1	STROMAL CELL-DERIVED FACTOR-1
VLA4	VERY LATE ANTIGEN-4
VCAM-1	VASCULAR CELL ADHESION MOLECULE 1
ABO	GRUPO SANGUÍNEOS ABO
SCU	SANGUE CORDÃO UMBILICAL
DECH	DOENÇA DO ENXERTO CONTRA HOSPEDEIRO
CO <sub>2</sub>	DIÓXIDO DE CARBONO
SSO	SEQUENCIAMENTO POR OLIGONUCLEOTÍDEOS
MHC	COMPLEXO DE HISTOCOMPATIBILIDADE MAIOR
FLP	FIBRINA LEUCOPLAQUETÁRIA
G-CSF	ESTIMULANTE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIA DE GRANULÓCITOS
NuPMIA	NÚCLEO DE PATOLOGIA, MORFOLOGIA, IMUNOLOGIA APLICADA
TCTH	TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOÉTICAS
REREME	REGISTRO DE RECEPTORES DE MEDULA ÓSSEA
REDOME	REGISTRO DE DOADORES DE MEDULA ÓSSEA
O <sub>2</sub>	OXIGÊNIO
N	NITROGÊNIO
PS	FOSFATIDILSERINA

---

## **1. INTRODUÇÃO**



### **1.1. Caracterização das Células Tronco Hematopoéticas (CTH)**

As células tronco hematopoéticas (CTH) que habitam os nichos das medulas ósseas são caracterizadas pelo seu potencial de auto-renovação e capacidade hierárquica de diferenciação nas células progenitoras das linhagens hematopoéticas (eritróide, linfóide e mielóide). Estas células possuem vários níveis de maturação e podem ser identificadas fenotipicamente com marcadores específicos de superfície como o CD34, mas também pela expressão de antígenos específicos de membrana como o Thy-1 e c-kit, além da perda de moléculas de superfície à medida que a diferenciação se processa. Também, essas células apresentam baixa taxa de rejeição relativa à doença do enxerto versus hospedeiro, baixo índice de sensibilização relativa aos antígenos do HLA e baixo índice de infecção pelo citomegalovírus (Bryder et al.2006). Depois de transplantadas as CTH possuem grande capacidade de integração na matriz extracelular da medula óssea pela sua propriedade de interação com os receptores CXCR4-SDF1 e VLA-4\VCAM-1 (Bryder et al, 2006) expressos nessa matriz. Uma vez aderidas, as CTH são capazes de proliferar, diferenciar e de se auto-renovarem em função do perfil de proteínas expressos no microambiente medular, pela sinalização endotelial e pelas moléculas produzidas pelas células do sistema imunitário (Bryder et al. 2006; Raajimarkers et al. 2008).

O transplante de células tronco hematopoéticas (CTH) é empregado no tratamento de neoplasias hematológicas e tumores sólidos, nos erros inatos do metabolismo, nas doenças auto-imunes; no caso do transplante de medula óssea emprega-se altas doses de agentes quimioterápicos associados a infusão de células tronco hematopoéticas autólogas ou alogênicas. O sucesso do transplante como modalidade terapêutica depende de diferentes fatores como o percentual de células tronco CD34 obtidas por doador, a compatibilidade antigênica avaliada pelos grupos HLA (Antígenos Leucocitários Humanos) e ABO (Tipo sanguíneo/Antígenos eritrócíticos), o estadiamento da doença de base, o nível de lesão do microambiente medular do receptor e a infecção pelo citomegalovírus humano (Gluckman et al. 1997; Korbling et al. 2001).

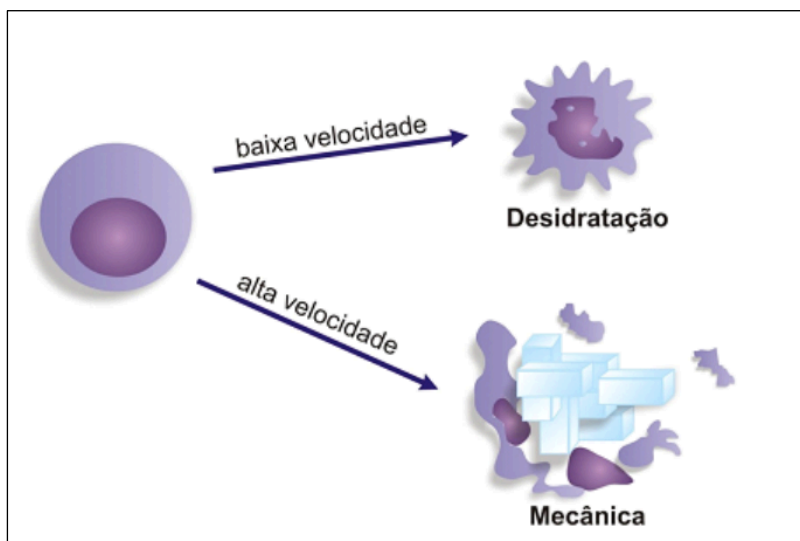
## **1.2. Fontes e obtenção das CTH com finalidade utilização terapêuticas**

A obtenção de células tronco hematopoéticas para aplicação em transplantes a partir do sangue periférico, da medula óssea ou do sangue do cordão umbilical (SCU) obedece a diretrizes internacionais, sendo que a escolha da fonte de obtenção depende da doença de base do paciente e da presença de doadores compatíveis; o cordão umbilical constitui uma boa fonte de células tronco (CT) por apresentarem alta concentração de células tronco e por serem tradicionalmente descartados nos centros obstétricos (Liu et al. 2010). Considera-se, no entanto, que alguns fatores podem interferir no sucesso e na qualidade da fonte de célula tronco, dentre esses merece atenção os aspectos demográficos das doadoras do cordão umbilical, os erros inatos do metabolismo fetal, a soroconversão infecciosa, as variantes anatômicas placentárias e as condições em que o parto se processa (Gluckmann et al. 2006; Ruggeri et al. 2010; Petra et al. 2010).

## **1.3. Criopreservação das CTH**

Uma etapa importante que se segue ao processo de obtenção é a criopreservação das células tronco. Esta, tem como objetivo preservar as células de maneira que mantenha sua viabilidade e seu potencial de proliferação *in vitro* e sua integridade funcional e sem induzir toxicidade uma vez transplantadas. Assim, é fundamental que os agentes de criopreservação sejam capazes de manter as propriedades das células durante o processo e período de congelamento, minimizando a formação de gelo intracelular (principal causa de ruptura da membrana e morte celular) e a desidratação que ocorre durante esse período. Esse processo somente foi possível pela descoberta das propriedades criopreservadoras do glicerol e mais tarde do DMSO (Dimetilsufóxido), sendo este último o mais utilizado na prática clínica pela sua propriedade de prevenir a formação de cristais de gelo intracelular (Petra et al. 2010; Stiff et al. 1995; Takaue et al. 1996). Os criopreservadores extracelulares como o hidroxietilstarch (HES) e a polivinilpirrolina (PVP) não penetram nas células, porém previnem a perda excessiva de água formando uma camada protetora ao redor da célula (Rowley et al. 1992; Stiff et al. 1995; Baust et al. 2007; Fleming et al. 2006).

Associado ao agente criopreservador, o método de congelamento gradativo se mostrou eficaz na prevenção da formação de gelo intracelular no processo de congelamento das CTH. Nesse método que ocorre em três fases, a desidratação ocorre de forma progressiva permitindo que a água se mova para o espaço extracelular e seja incorporada dentro de cristais de gelo (Figura 1); todo o processo pode ser mensurado pela curva de congelamento em nitrogênio líquido ou em ultra-freezer (-80 °C). Na fase inicial ocorre o decréscimo da temperatura a razão de -1 a -45 °C, na fase intermediária (fase crítica) tem-se a liberação do calor de fusão pelas células e a transição da fase líquida para sólida e na fase final ocorre o decréscimo da temperatura abaixo de -80 °C. Nessas condições, as CTH podem permanecer por muitos anos até que, uma vez selecionadas para uso terapêutico, são descongeladas, incubadas *in vitro* para expansão clonal e posteriormente infundidas nos pacientes com indicação de transplante (Chaytor et al. 2012; Fuller et al. 2004; Berz et al. 2007; Santis, Prata 2009).



**Figura 1.** Mecanismo da criopreservação da CTH.

Em que pese o processo de criopreservação ser eficaz para reduzir a níveis extremamente baixos o metabolismo celular, sabe-se que mesmo nessas condições o tempo de congelamento é um fator que afeta a viabilidade celular. Logo, para avaliar se as células hematopoiéticas são capazes de manter o seu potencial de proliferação e diferenciação celular, rotineiramente avalia-se a recuperação/quantificação dos granulócitos e das plaquetas. Essa quantificação ocorre, *in vitro*, durante a expansão clonal feita antes e depois

do processo de criopreservação e, *in vivo*, pela recuperação de células medulares em indivíduos submetidos ao transplante; de forma semelhante, avalia-se a viabilidade celular por diferentes métodos (Solomon et al. 2010; Morrison et al. 2008; Majado et al. 2011; Sutherland et al. 2007) como ensaio clonogênico, viabilidade pela citometria de fluxo e a própria recuperação hematopoética pós transplante de medula óssea.

#### **1.4. O papel das espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) nas CTH**

Nas últimas décadas, o potencial terapêutico do transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH) adquiriu um papel primordial no manejo de um amplo espectro de doenças, incluindo câncer, condições hematológicas, desregulações do sistema imunológico e erros inatos do metabolismo. Os diferentes tipos de TCTH, autólogo e alogênico, incluem riscos de complicações graves, incluindo complicações agudas e crônicas da doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), doença veno-oclusiva hepática, lesão pulmonar e infecções. O CTH é realizado para restaurar ou tratar várias condições congênitas nas quais as funções imunológicas estão comprometidas, por exemplo, por quimioterapia e radioterapia, e envolve a administração de células-tronco hematopoiéticas (CTHs) em pacientes com medula óssea (BM) depletada ou disfuncional. Como a biologia das CTHs é fortemente regulada pelo estresse oxidativo (OS), o controle dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) é importante para manter sua capacidade de autorrenovação (Bai et al 2018).

Em CTHs quiescentes, baixos níveis de ROS são essenciais para a manutenção do metabolismo celular; no entanto, os níveis fisiológicos de ROS promovem a proliferação e diferenciação de CTHs. Altos níveis de ROS estão envolvidos principalmente no repovoamento de curto prazo, enquanto baixos níveis de ROS estão associados à capacidade de repovoamento de longo prazo. A criopreservação é atualmente a única tecnologia confiável para armazenamento de CTH (Schuettpelz et al 2013; Ludin et al 2014) . Em temperaturas criogênicas (-150 a -196 °C), todo o metabolismo celular pode ser "suspenso". Após serem aquecidas em banho-maria (37 °C), as células

criopreservadas recuperar com viabilidade e funções mantidas. A criopreservação CTH é indispensável para garantir realização dos transplantes celulares (Ludin et al 2014). Os protocolos atuais para criopreservação de MSC requerem dimetilsulfóxido (DMSO), que é facilmente permeável e capaz de proteger CTH de crio-lesões (Kong et al 2016).

Tanto a criopreservação quanto fatores da coleta, características dos doadores, descongelamento podem liberar moléculas de oxigênio reativos e desencadear estresse celular e perda da integridade das CTH. Espécies reativas de oxigênio (ROS) desempenham papéis importantes na hematopoiese e regulam a autorrenovação, migração e diferenciação mielóide de células-tronco hematopoiéticas (CTH) (Bai et al 2018).

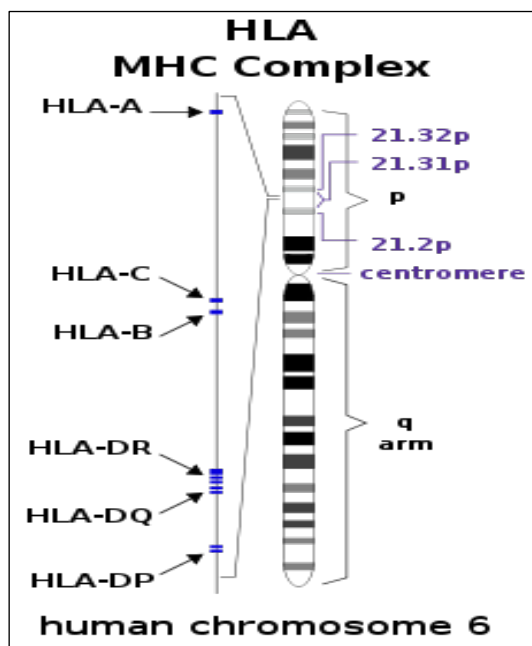
### **1.5. A histocompatibilidade das CTH**

Para que um transplante seja bem realizado, é necessário, entre outros fatores, que tenha compatibilidade doador-receptor para moléculas codificadas pelos genes HLA (Human Leucocyte Antigens) relacionados às classes I e II. Na presente rotina laboratorial dos exames de histocompatibilidade pré-transplante são analisados os locos HLA-A, HLA-B e HLA-DRB (Pasquini et al, 2004).

A herança HLA se dá de forma autossômica e codominante. Isto quer dizer, que um indivíduo expressa na superfície de suas células os produtos codificados pelos genes presentes nos cromossomos autossômicos parentais. De modo que, cada genitor possui dois cromossomos 6 (Figura 2) diferentes, quatro distintas combinações de haplótipos são possíveis para seus descendentes. Este modelo de herança é um fator relevante na busca de doadores aparentados compatíveis para transplante (Klein & Sato, 2000). Quando um irmão HLA genotipicamente idêntico não for identificado, existe a possibilidade de uma extensa busca na família. Diante disso, deve-se realizar uma análise mais extensa que inclua pais, avós, tios e primos em primeiro grau. Para os pacientes que não mostram um doador compatível na família, resta a alternativa de procurar um doador não consanguíneo (Pasquini et al. 2004). Além disto, há também o problema da rejeição de tecido transplantado pelo receptor, sendo provocado por complexos de proteínas presentes nas células do tecido doado. Portanto, foi descoberto há mais de 50 anos que o locus genético do HLA (Antígeno Leucocitário Humano) está

relacionado à rejeição do transplante e às doenças autoimunes e várias condições clínicas que envolvem o sistema imunológico (Klein & Sato, 2000).

O sistema é conhecido por rejeitar moléculas reconhecidas como antígenos no tecido transplantado. No entanto, apesar das rejeições entre indivíduos não totalmente compatíveis, essas estruturas são essenciais no sistema imunológico (SI), e existem em todas as células nucleadas porque sua principal função biológica é regular a Resposta Imune Adaptativa (Choo 2007). Nesse caso, esclarecer a ligação entre o transplante e o HLA é o achado mais importante da prática de transplante, uma vez que essa ligação é essencialmente o que define a importância da histocompatibilidade doador-receptor (Ayo et al. 2015); conhecer o perfil imunogenético dos doadores e pacientes é condição essencial para realização do TMO.



**Figura 2.** Estrutura do gene HLA (Klein & Sato, 2000).

### 1.6. A malha de fibrina e seu potencial regenerativo

O entendimento do uso terapêutico de um concentrado sanguíneo que agregasse plaquetas, leucócitos e fatores de crescimento em concentrações supra-fisiológicas fez surgir várias e distintas metodologias para sua obtenção, a partir da concentração seletiva dos elementos sanguíneos em um determinado volume (Di Liddo et al 2018, Baham et al 2018). Essa matriz biológica foi denominada, por proposição convencional, como uma fibrina rica em

plaquetas e leucócitos (FLP), sendo caracterizada como um produto biológico autólogo para fins terapêuticos exclusivamente autólogos.

Como reportado por Oliveira et al. (2020), os parâmetros utilizados na obtenção da FLP devem ser considerados para garantir as características biológicas e, conseqüentemente, o potencial de aplicação terapêutica. Dentre esses se destacam os tipos de tubos para coleção sanguínea, a força centrífuga relativa (FCR) e o ângulo do rotor da centrífuga (Oliveira et al. 2020).

Conforme consenso internacional, a matriz de FLP deve apresentar concentrações suprafisiológicas de plaquetas, rede densa de fibrina rica em junções fibrilares do tipo, conteúdo leucoplaquetário com integridade morfológica e liberação lenta e crescente do conteúdo de citocinas (Weisel et al. 2017).

Nas últimas três décadas, o enorme progresso na tecnologia de processamento celular aumentou a mudança geral de terapias baseadas em células-tronco heterólogas para autólogas. Na perspectiva de biomateriais e aditivos cirúrgicos bioativos com resultados previsíveis na medicina regenerativa, várias técnicas foram desenvolvidas para processar o sangue periférico e obter produtos úteis para controlar a inflamação e reforçar os eventos fisiológicos de hemostasia e cicatrização de feridas (Dohan et al. 2012; Burnouf et al. 2013, Marenzi et al. 2015, Dohan et al. 2017; Castro et al. 2017). Dependendo de seu conteúdo de plaquetas, leucócitos e arquitetura de fibrina, eles são comumente classificados em quatro famílias: ( *i* ) plasma puro rico em plaquetas (P-PRP, na forma líquida ou em gel); ( *ii* ) plasma rico em leucócitos e plaquetas (L-PRP, na forma líquida ou em gel); ( *iii* ) fibrina rica em plaquetas pura (P-PRF); e ( *iv* ) fibrina rica em leucócitos e plaquetas (L-PRF) (Dohan et al 2012). Entre eles, o L-PRF oferece maiores quantidades globais de TGF- $\beta$ 1 liberado, uma liberação sustentada e de longo prazo de fatores de crescimento (VEGF, IGF1, PDGF-AB) e citocinas (IL-1 $\beta$ ) e indução mais forte da migração celular *em in vitro* (Schar et al. 2015).

Obtidos por diferentes métodos e dispositivos de produção, os hemoderivados demonstram ser benéficos para tecidos com suprimento sanguíneo restrito, rotatividade celular lenta, restauração limitada da matriz extracelular facilitando o recrutamento, proliferação e maturação das células participantes regeneração. Eles são comumente usados em clínicas para inúmeras aplicações

médicas, incluindo ( *i* ) a cura de úlceras e queimaduras recalcitrantes; ( *ii* ) estimulação da regeneração tecidual em odontologia, implantodontia, cirurgia buco-maxilo-facial e plástica; ( *iii* ) o tratamento da osteoartrite do joelho; e ( *iv* ) o reparo do tecido musculoesquelético, tendão e lesões ligamentares (Bradán et al. 2018; Masoudi et al. 2016).

Até o momento, as potencialidades regenerativas intrínsecas do L-PRP têm sido comumente atribuídas a fatores derivados de plaquetas e leucócitos (fatores de coagulação, fatores de crescimento e citocinas) e matriz de fibrina que orquestram sinergicamente o recrutamento de células-tronco ou células progenitoras após uma resposta inflamatória impulsionado por neutrófilos, macrófagos polarizados M1 e linfócitos T (fase inicial) e macrófagos M2 (fase tardia)(Hart et al 2022). Um crescente corpo de evidências demonstra que a contribuição de L-PRF para a angiogênese e vasculogênese *in vivo* no local da lesão é mediada por células-tronco hematopoiéticas intrinsecamente transportadas (HSCs) (CD34<sup>+</sup>) e células progenitoras endoteliais (CD34<sup>+</sup>/VEGR-2<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>) (Caloprisco et al. 2010). Embora células multipotentes semelhantes a fibroblastos com propriedades proliferativas e multidiferenciadas tenham sido identificadas no sangue periférico humano (Kucia et al. 2008, Cesselli et al. 2009, Scapin et al. 2016), até o momento, nenhuma evidência sobre sua presença foi relatada em produtos L-PRF.

### **1.7. Justificativa do estudo**

Como dito anteriormente, e considerando que o tempo de criopreservação é um fator que afeta a viabilidade e o metabolismo celular, é possível supor que ele também possa afetar a expressão imune dessas células. Sabe-se que indivíduos transplantados com CTH podem apresentar resposta inflamatória depois de infundidos com hemocomponentes autólogos a partir de células tronco criopreservadas e obtidas de sangue periférico. Assim, especula-se acerca do grau de ativação gênica das CTH transplantadas. Logo, considerando que a seleção de CTH para transfusão depende da compatibilidade antigênica, é possível que boa parte das células criopreservadas apresentem perda da viabilidade e seu potencial de



diferenciação, assim como apresentem algum grau de ativação gênica e com expressão de proteínas.

Os meios de cultivo atuais para CTH humanas realizados nos centros de processamento celulares envolvem meios comerciais de difícil acesso e custo inacessível a prática brasileira de pesquisa. Assim, a pesquisa experimental em áreas básicas de rotinas laboratoriais em momentos de redução de custos e falta de incentivos de pesquisa são necessários para incentivo da ciência. O potencial regenerativo da malha de fibrina é amplamente pesquisado na medicina regenerativa, assim seu potencial como meio de cultivo de células tronco poderia ser uma nova forma de inovação tecnológica bem como redução do custeio quando comparados aos meios tradicionalmente disponíveis.

Considera-se que é fundamental para auxiliar a terapêutica clínica identificar o tempo em que as CTH permanecem viáveis e aptas para o transplante, se a expressão de imunomarcadores e o perfil imunogenético são capazes de afetar as funções imunitárias dos indivíduos transplantados e se o processo de criopreservação afeta o metabolismo e o estágio de ativação das células.

## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. OBJETIVO PRIMÁRIO**

Caracterizar e avaliar a viabilidade e os marcadores imunitários de células tronco hematopoiéticas humanas criopreservadas.

### **2.1.1. Objetivos específicos**

- Descrever o perfil epidemiológico e clínico dos indivíduos;
- Identificar e quantificar as células CD34<sup>+</sup>
- Avaliar a viabilidade celular, antes e depois da criopreservação;
- Determinar a tipagem HLA e sistema ABO;
- Determinar a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;

## **2.2. OBJETIVO SECUNDÁRIO**

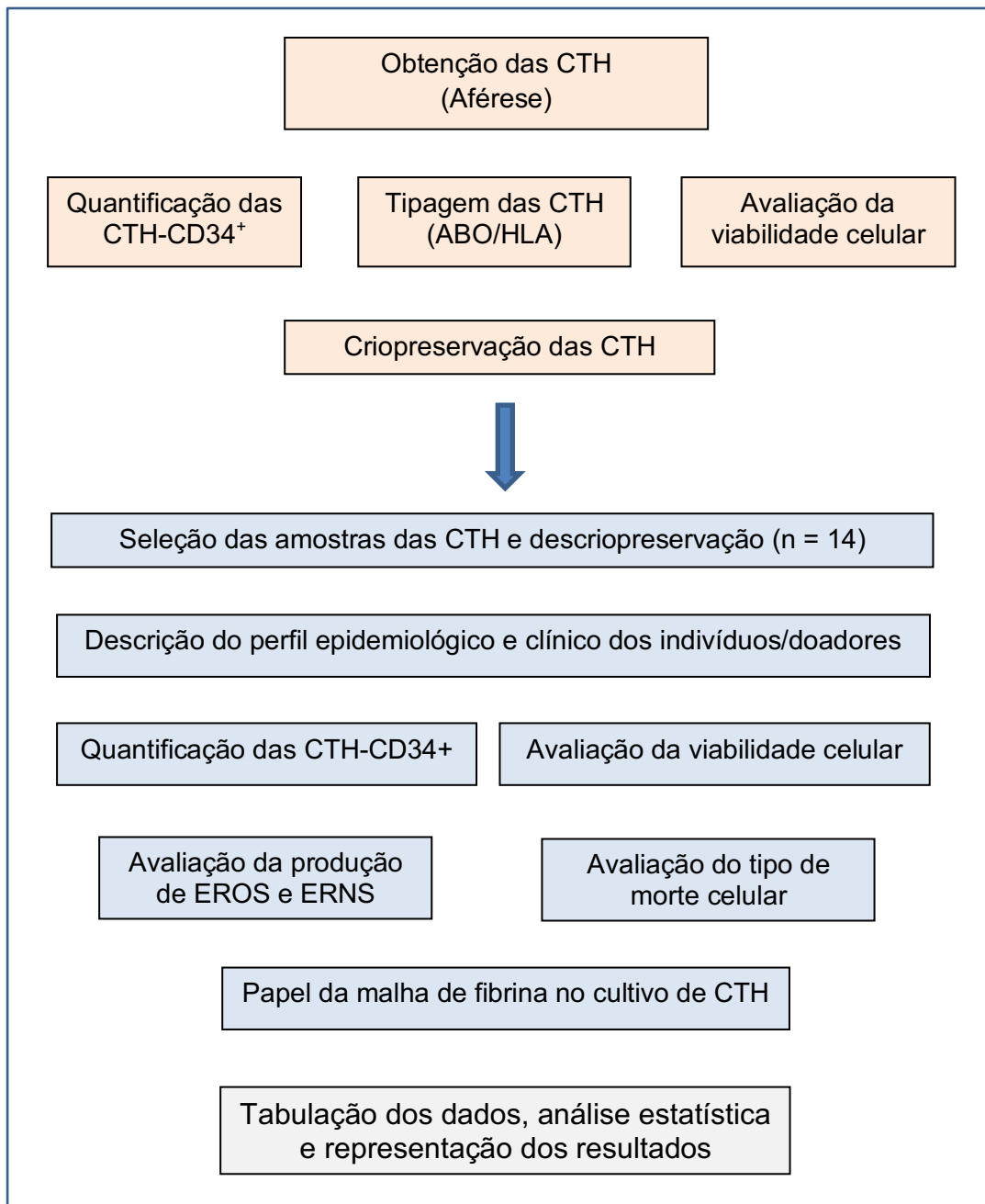
Avaliar o papel da fibrina leucoplaquetária (FLP) como substrato para o cultivo de células tronco hematopoiéticas (CTH).

### **2.2.1. Objetivos específicos**

- Descrever a morfologia das CTH incubadas por 1, 2, 3 ou 7 dias, na presença ou ausência da FLP;
- Determinar o efeito da FLP no *homing* celular;
- Identificar possíveis indícios de diferenciação celular.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Delineamento experimental



**Figura 3.** Fluxograma do estudo

### 3.2. Tipo e local do estudo

Trata-se de estudo retrospectivo descritivo para avaliar a viabilidade celular e os marcadores imunitários de células tronco hematopoéticas humanas criopreservadas, em função de variáveis epidemiológicas, do tempo e da solução de criopreservação, que influenciam na diferenciação e poder de auto-renovação das células tronco hematopoéticas de sangue periférico de

indivíduos saudáveis. O estudo está em desenvolvimento nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Morfologia e Imunologia Aplicada – NuPMIA, da Faculdade de Medicina, UnB e no Centro de Tratamento de Câncer de Brasília.

### **3.3. Normas éticas**

O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Santa Marta de Ensino e Pesquisa, para a utilização dos prontuários dos indivíduos e acesso às amostras das células tronco hematopoiéticas (CTH) (Protocolos 5.769.882 de 14/11/2022; 5.769.885 de 15/11/2022; 5.812.697 de 01/12/2022).

As normas éticas que regulamentam os estudos com seres humanos foram cumpridas durante a coleta dos dados, em concordância com a Declaração de Helsinki (WMA, 2013) e mediante assinatura termo de consentimento livre e esclarecido pelos indivíduos (Anexo 1).

### **3.4. Indivíduos, critérios de inclusão e exclusão**

As células tronco foram obtidas e criopreservadas a partir da aférese do sangue de 14 indivíduos adultos saudáveis, de ambos os sexos, não portadores de doenças infectocontagiosas; foram excluídos indivíduos que faziam uso imunossupressores e os que se recusaram a assinar o termo de consentimento livre e esclarecido.

Os indivíduos desse estudo estavam sob procedimento de doação das CTH para o tratamento de pacientes oncológicos (parentes de primeiro grau) que foram submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas alogênico cerca 24 meses antes dos ensaios. Assim, as amostras (1mL/amostra/indivíduo) de CTH estavam criopreservadas em freezer -80 °C em caixas individualizadas para controle de lote/congelamento dos componentes criopreservados (sem finalidade terapêutica) no Banco de Sangue São Lucas, Brasília – DF e, posteriormente, à aprovação do estudo pelo comitê de ética e TCLE dos indivíduos, as mesmas foram disponibilizadas para o estudo.

Tais amostras (1ml) são habitualmente descartadas após infusão regular das CTH nos pacientes, sem prejuízo aos receptores direcionados ou indivíduos doadores).

### **3.5. Obtenção do perfil epidemiológico**

Para descrever o perfil dos indivíduos foram obtidos os dados epidemiológicos (sexo e idade) e clínicos (hematológicos, bioquímicos, sorologia viral), além do tempo de recuperação hematológica, que se refere ao tempo necessário para a normalização das três linhagens leucocitárias (granulócitos, linfócitos e monócitos), eritrócitos e plaquetas.

### **3.6. Obtenção das de células tronco hematopoiéticas pela técnica de aférese**

Para o estudo foram utilizadas 14 amostras (alíquotas de 1 mL) de CTH obtidas de doadores saudáveis por aférese terapêutica (Cobe Spectra®) em kit específico contendo citrato como solução anticoagulante padrão (bolsa de aférese; 254 mL coletada).

Os indivíduos saudáveis (doadores) eram parentes consanguíneos de primeiro grau dos pacientes que foram submetidos ao TCTH. A obtenção das CTH foi por meio da técnica de aférese terapêutica (Figura 4). Os doadores utilizaram o medicamento chamado estimulador de formação de colônia de granulócitos (G-CSF) por 4 dias para estimular e liberar as CTH para corrente sanguínea. No quinto dia os mesmos eram submetidos à coleta de 4-5 volemias de aférese para a obtenção das CTH.



**Figura 4.** Doador realizando coleta de CTH pela técnica de aférese (EBHSER, 2021).

### **3.7. Isolamento, quantificação e caracterização das células tronco hematopoiéticas (CTH) por citometria de fluxo pré congelamento**

As bolsas de aférese contendo CTH foram mantidas sob refrigeração (4 °C) durante as etapas de remoção dos eritrócitos e dos granulócitos e da obtenção das células mononucleares, sob capela de fluxo laminar. Assim, para remover os eritrócitos a suspensão foi centrifugada por 10 minutos com força de 3000 x g e lavadas em STF a 4 °C. Em seguida, as células foram suspensas em 1 mL de Ficoll/Hypaque (Sigma–Aldrich®), centrifugadas por 25 minutos com força de 2000g. e lavadas com STF a 4 °C para a remoção dos granulócitos. A fração restante contendo as células mononucleares foi submetida à imunotipagem para remover os leucócitos mononucleares e para isolar e caracterizar as células CD 34<sup>+</sup>.

A fração de células mononucleares obtida no item 3.6 foi ressuspensa com 100 µL de solução contendo anticorpo anti-CD34/10<sup>8</sup> células (Sigma-Aldrich®, EUA). Depois de 30 min, as células CD34<sup>+</sup> foram isoladas a partir desta solução numa coluna de separação celular (Invitrogen®, EUA) com intervalo  $7 \times 10^5 - 3 \times 10^6$ . A separação celular foi feita por citometria de fluxo FACSCanto (Becton-Dickinson, NJ, USA®) usando CD34 anti-humano conjugado com PE (Bioscience,



USA®), CD38/FITC (Dako Cytomation, Denmark®), CD45/FITC (Dako Cytomation®) de acordo com as especificações do fabricante.

O protocolo ISHAGE- International Society for Hematotherapy and Graft Engineering (Sutherland et al 2015; Gramtma et al, 2003) foi utilizado para determinar e qualificar as 14 alíquotas de indivíduos contendo as células CD34+/CD45+/CD38- com baixa dispersão lateral. Essa etapa é realizada em laboratório de referência terceirizado do laboratório de criopreservação. A quantificação das CTH CD34+ foi realizada antes do congelamento (após coleta de aférese) e esses resultados estavam registrados dos prontuários dos indivíduos, sendo a técnica descrita acima esta descrita na literatura médica recomendada para este objetivo.

### 3.8 Tipificação dos antígenos de histocompatibilidade HLA e sistema ABO/Rh dos indivíduos

O resultado da tipagem para os antígenos do HLA e ABO foi obtida dos prontuários dos indivíduos. As amostras foram tipificadas para os loci HLA-A, -B, C, DQ e -DRB1 pela técnica de SSO (sequenciamento dos loci HLA pela técnica de oligonucleotídeos após extração do DNA leucocitário), utilizando metodologia de citometria de microesferas marcadas (Luminex) com kits comerciais padrão da instituição (OneLAmDa®) e interpretação pelo equipamento LABSCAN 3D® (Figura 5).

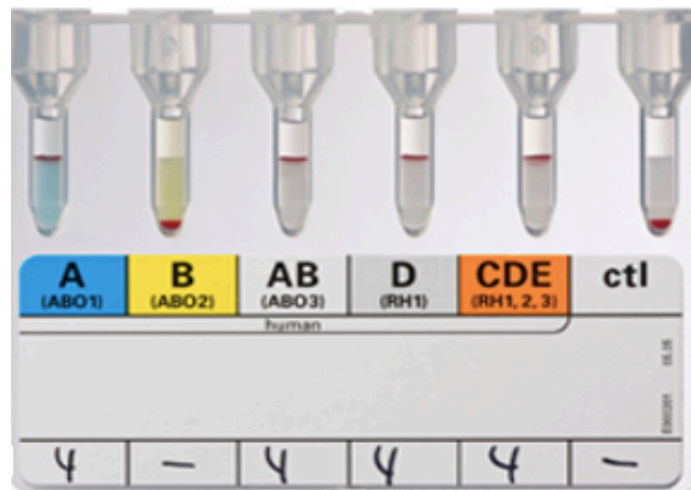


**Figura 5.** Técnica de execução da tipagem HLA pela metodologia de SSO. (Biometrix diagnostica, 2022).

A tipagem ABO/Rh dos indivíduos foi realizada pela técnica imunohematológica em cartão de gel (Figura 6). Esses dados foram registrados nos

prontuários dos indivíduos, sendo as técnicas de tipificação HLA e de tipagem ABO/Rh conforme recomendação da literatura.

Para os casos de não identificação alélica, situação comum em populações de grande variabilidade como a brasileira, a(as) amostra(s) foi(ram) encaminhada(s) para o sequenciamento gênico de alta geração em laboratório de referência e, posteriormente, reportado ao catálogo internacional de imunogenética e ao *genebank*.



**Figura 6.** Técnica de tipagem sanguínea ABO pela metodologia de cartão-gel (Fundação Pró-sangue-SP, 2022).

### 3.9. Técnica de Criopreservação das CTH

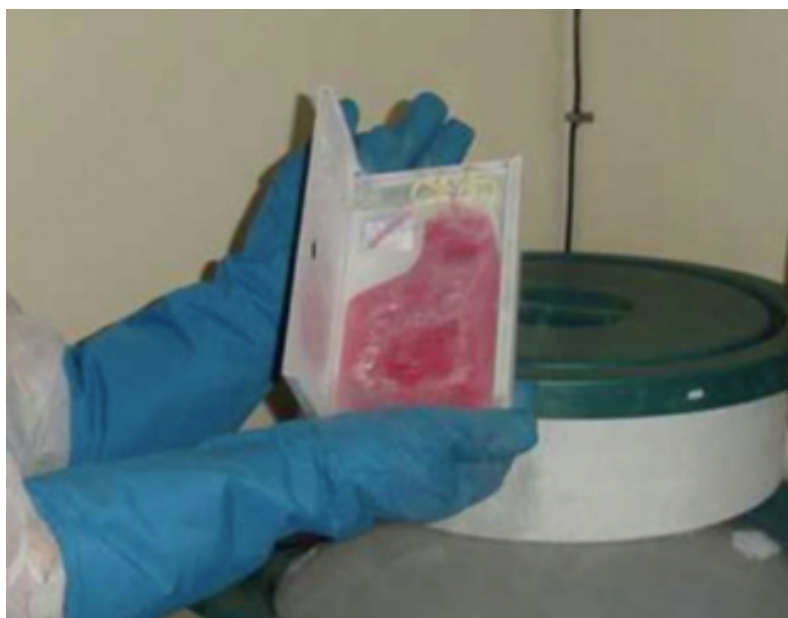
As bolsas de aférese contendo CTH foram mantidas sob refrigeração (4 °C) durante as etapas de remoção dos eritrócitos e dos granulócitos e da obtenção das células mononucleares, sob capela de fluxo laminar. Assim, para remover os eritrócitos a suspensão foi centrifugada por 10 minutos com força de 3000 x g e lavadas em STF a 4 °C. Em seguida, as células foram suspensas em 1 mL de Ficoll/Hypaque (Sigma–Aldrich®), centrifugadas por 25 minutos com força de 2000g. e lavadas com STF a 4 °C para a remoção dos granulócitos. A fração restante contendo as células mononucleares foi submetida à imunotipagem para remover os leucócitos mononucleares e para isolar e caracterizar as células CD 34<sup>+</sup>.

Depois de serem isoladas, o volume final das bolsas contendo a suspensão das CTH-CD34<sup>+</sup> era de 100 a 150 mL (Figura 7). Depois, as bolsas foram colocadas entre duas placas metálicas a fim de que a velocidade de congelamento fosse

igualmente distribuída em todo o seu volume. O conjunto bolsa/placas metálicas foi então introduzido em equipamento para congelamento a velocidade programada de 1 a 3 °C/minuto até atingir -80 °C.

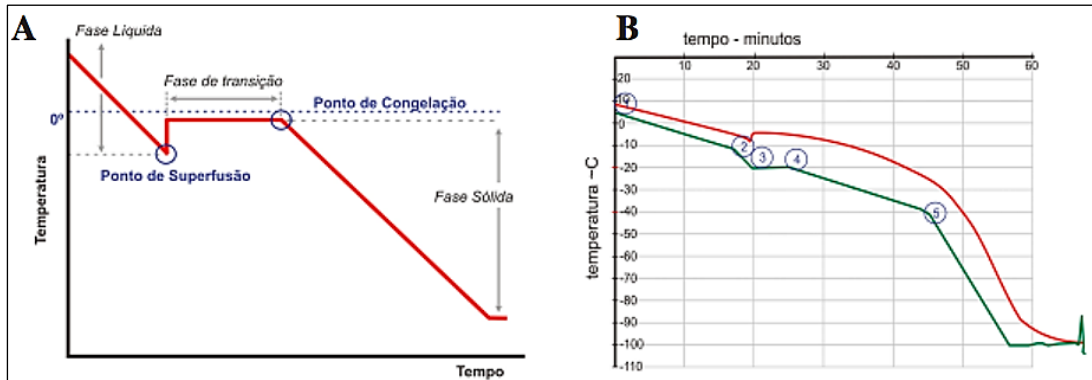
Depois de descongeladas, as CTH foram enxertadas nos indivíduos sob tratamento para supressão das medulas ósseas; esse procedimento resultou numa “pega” de 100% (sucesso clínico da enxertia).

As alíquotas excedentes das bolsas contendo a suspensão das CTH foram novamente criopreservadas em 3 alíquotas de 1 mL em Eppendorf; essas amostras foram acondicionadas em caixas criogênicas (-80 °C) e permaneceram até o início dos ensaios, o que aconteceu  $34 \pm 15$  meses depois.



**Figura 7.** Amostra contendo bolsa de criopreservação d CTH envolta pelo canister de alumínio sendo inserida em tanque de nitrogênio líquido (Santis & Prata 2009).

A curva de congelamento foi determinada pela leitura dos sensores (*loggers*) com sistema automatizado de criopreservação com fornecimento do gráfico com determinação das 3 fases críticas de criopreservação, líquida, transição e sólida (Figura 8), sendo que a fase de transição merece atenção pelo risco potencial de causar lesão celular.

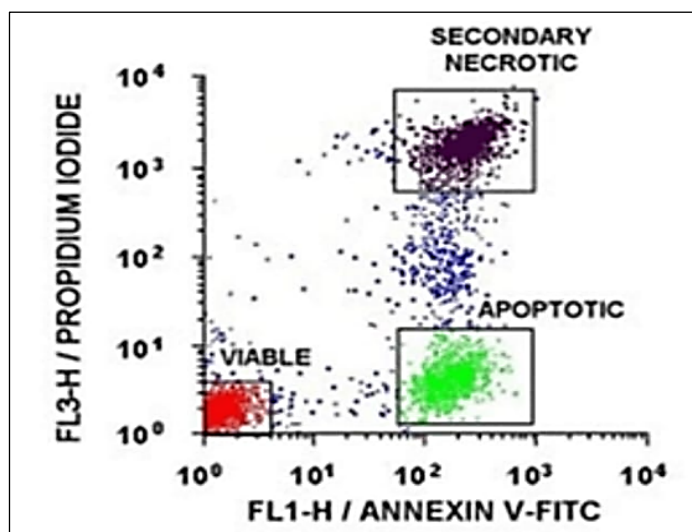


**Figura 8.** Curvas de congelamento programado de CTH. (Santis & Prata, 2009).

### 3.10. Avaliação da viabilidade celular pós descongelamento

Depois de descriopreservadas, avaliou-se a viabilidade celular pelo método de exclusão de nigrosina e por citometria de fluxo. Primeiramente, a uma alíquota das células ( $10^4$  células/100  $\mu$ L) foi adicionada uma solução de nigrosina (corante supravital do tipo aniônico que não penetra em células vivas) a 0,5%, em solução salina tamponada com fosfato. Em seguida, 5  $\mu$ L da suspensão foi inserida no hematocitômetro (câmara de Neubauer) para a quantificação das células vivas e mortas por microscopia óptica (400 x de aumento). O total de células vivas ou mortas foi dado pelo % células vivas/mL (Figura 9).

Para avaliar as células viáveis e mortas (apoptose ou necrose) as células foram submetidas ao método da dupla coloração de anexina V-FITC/PI. Assim,  $10 \times 10^3$  células/escavação foram incubadas em triplicata, em placa de 96 escavações, a 37°C por 24 horas sob 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Depois, foi adicionado 5  $\mu$ L da solução estoque Anexina V-FITC e 5  $\mu$ L de iodeto de propídio (PI) a solução estoque (eBioscience™ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, ThermoFisher BMS500FI-300). Em seguida, as células foram novamente incubadas por 10 minutos, no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, as escavações foram homogeneizadas para subsequente leitura por meio do citômetro LSR Fortessa™ (BD, Biosciences Pharmingen, Califórnia, USA) com no mínimo  $10 \times 10^3$  eventos.



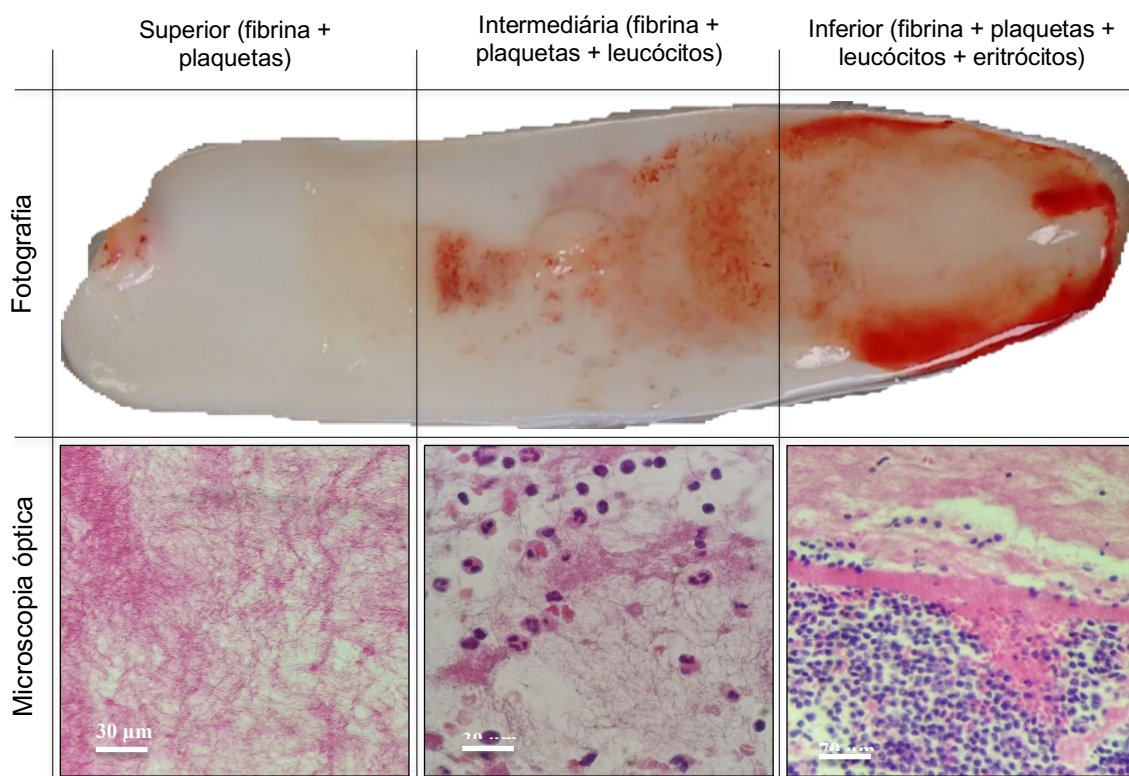
**Figura 9.** Gráfico de pontos mostrando células Ramos duplamente marcadas com anexina V:FITC (ANNEX100F) e iodeto de propídio (Gratama 2003). A figura mostra o padrão de dispersão das células vivas (vermelho) e mortas por apoptose (verdes) e necrose (roxo).

### 3.11. Obtenção da fibrina leucoplaquetária

Para a obtenção da fibrina leucoplaquetária (L-PRF) foram coletadas amostras de sangue venoso (10 mL) de dois adultos jovens saudáveis do sexo masculino, em frasco plástico não heparinizado. As amostras de sangue foram coletadas de cada participante em uma das veias periféricas da fossa antecubital (cefálica, basílica ou intermédia cubital) em tubos de vidro de 10mL FibrinTubes (Montsserat, China) - estes tubos são isentos de aditivos e possuem registro sanitário na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sob o número 80153030126 para obtenção da matriz de LPRF - utilizando o sistema de coleta à vácuo com agulha 21G (Greiner Bio-One, Brasil). Cada tubo apresenta tempo médio de preenchimento de  $20,0 \pm 2,0$  segundos. As amostras sanguíneas foram centrifugadas imediatamente após a coleta do último tubo.

Em seguida, o sangue foi centrifugado por 10 minutos em centrífuga de rotor fixo com ângulo de  $25^\circ$  (Montserrats®, China) por a  $200 \times g$ . Depois, a fração gelatinosa sobrenadante foi pinçada, o coágulo foi removido e, então, ela foi depositada sobre a placa metálica perfurada para obter a malha de fibrina

(~1 mm de espessura), sem excesso de soro. Em seguida, fragmentos da malha de fibrina (~ 10 mm de diâmetro) obtidos da região superior da FLP (Figura 10) foram depositados sobre lamínulas de vidro posicionadas dentro nas escavações de uma placa de 24 escavações.



**Figura 10.** Imagens da FLP obtidas por fotografia e fotomicrografia de uma secção histológica corada com hematoxilina & eosina. Observar as três regiões da FLP com seus constituintes: superior (fibrina + plaquetas), intermediária (fibrina + plaquetas + leucócitos) e inferior (fibrina + plaquetas + leucócitos + eritrócitos) (Oliveira et al. 2020).

### 3.12. Avaliação da FLP como substrato para o cultivo das CTH

Para esse ensaio foram utilizadas três amostras de células tronco hematopoiéticas (CTH) obtidas dos indivíduos selecionados (n = 14). Os ensaios foram realizados em triplicata sob 3 placas de microcultivo de 24 escavações em que, em cada uma delas era depositada uma lamínula de 13mm para a aderência das CTH descongeladas. Após o descongelamento das amostras de três indivíduos, obteve-se os percentuais de células vivas: **CTp1** com celularidade total



de  $6,2 \times 10^6$  células CD34<sup>+</sup> e viabilidade celular de 97%; **CTp2** com celularidade total de  $12 \times 10^6$  células CD34<sup>+</sup> e viabilidade celular de 97%; **CTp3** celularidade total de  $7,5 \times 10^5$  células CD34<sup>+</sup> e viabilidade celular de 98%.

Na sequência, as CTH ( $1 \times 10^6$  células) foram cultivadas em meio de cultura de RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St Louis, EHA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado com volume final de 1 mL.

Para avaliar o efeito de FLP, a fração gelatinosa sobrenadante foi pinçada, o coágulo foi retirado e, a seguir, depositado sobre a placa metálica perfurada para obtenção da malha de fibrina (~1 mm de espessura), sem excesso de soro. Em seguida, fragmentos (~10 mm) foram removidos da parte superior da malha de fibrina (fibrina + plaquetas) e depositados em lamínulas de vidro previamente inseridas nas escavações de uma placa de 24 poços. Em seguida,  $10^6$  células/escavação) foram incubadas em triplicata em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (volume final de 1 mL), em 4 placas de microcultivo (24 poços), em estufa de CO<sub>2</sub> (37 °C) por 24, 48 ou 72 horas, na presença ou ausência de FPL; em cada escavação, foi depositada uma lamínula de 13 mm para a aderência das células.

Finalizada a incubação, as células foram lavadas com STF a 37 °C (2 vezes) para remover as células não aderentes e cuidadosamente secas com ar aquecido. Posteriormente, as células foram fixadas com metanol e coradas com solução de Giemsa a 10%. As análises foram realizadas por um observador sob microscopia óptica (aumento de 1000x).

### **3.13. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio**

Para quantificar EROs e ERNs as CTH foram descritos preservadas em banho Maria, em tubos tipo Falcon e centrifugadas com uma solução de 2% albumina bovina em solução salina tamponada com fosfato (BSA/STF) a 4 °C por 3 vezes para remover a solução de criopreservação. Os ensaios foram realizados em triplicata, em placa de 96 escavações e incubadas ( $10^4$  células/escavação/200 mL) em câmara úmida a 37°C, na presença de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, na presença ou ausência de estímulo com 20 ng/mL de TNF ou 50 ng/mL de LPS.

Para quantificar a produção de EROs, as células foram incubadas por 30 min. Decorrido esse tempo, 100 µL de uma solução de uso da sonda DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, ThermoFisher P36242), obtida com 10 µL sonda DCFDA estoque + 4 mL STF 37°C, pH 7.2, foi adicionada às escavações. Depois de reincubadas nas mesmas condições descritas por 30 min e no escuro, as escavações foram homogeneizadas.

Para quantificar a produção de ERNs, as células foram incubadas por 24 horas. Decorrido esse tempo, 100 µL de uma solução de uso da sonda DAFFM Diacetate (4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate, ThermoFisher D23844), obtida com 10 µL sonda DAFFM estoque + 6240 µL STF 37°C, pH 7.2, foi adicionada às escavações e depois reincubadas por 1 h no escuro, as escavações foram lavadas com STF 37°C, pH 7.2 para a homogeneização.

Ambas as leituras, EROs e ERNs foram feitas no citometro LSR Fortessa™ (BD, Biosciences Pharmingen, California, USA) com no mínimo  $10 \times 10^3$  eventos. Os resultados foram expressos em percentagem da intensidade média de fluorescência (%MFI) pelo FlowJo Software (Tree Star Inc).

### **3.14. Análise estatística**

Para a aplicação dos testes estatísticos serão avaliadas a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e a variabilidade das variáveis pelo teste de Bartlett. Para as múltiplas comparações (+ 2 grupos) foram utilizados o teste de ANOVA ou Kruskal-Wallis para dados com distribuição normal ou não normal, respectivamente. Considerando a distribuição normal, a comparação entre duas amostras dependentes ou independentes foram utilizados o teste t-pareado ou o teste t, respectivamente. As diferenças entre as variáveis foram consideradas significativas quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devida ao acaso (erro tipo I) for menor que 5% ( $p < 0,05$ ). O programa Prism 5® software package (GraphPad, USA) foi utilizado para as análises e para a representação gráfica dos resultados.



#### **4. RESULTADOS**

#### 4.1 Perfil epidemiológico dos indivíduos

As amostras de células tronco hematopoiéticas foram obtidas de 14 doadores adultos jovens saudáveis com  $40 \pm 12$  anos, sendo 5 mulheres e 9 homens; não houve diferença nas proporções entre ambos (Teste de Fisher,  $p > 0,05$ ) (Tabela 1). As CTH foram transplantadas nos pacientes, resultando em 100% de sucesso na enxertia.

Os dados obtidos dos prontuários dos indivíduos mostraram similaridade entre homens e mulheres quanto às idades e quanto ao índice de massa corporal (IMC) (Teste t;  $p > 0,05$ ).

**Tabela 1.** Perfil dos indivíduos do estudo.

Indivíduos	Sexo	Data da coleta das células	Idade	IMC	
1	MF	F	07/2019	32	28
2	JV	F	09/2019	59	29
3	SMV	F	01/2020	45	33
4	CF	F	02/2020	43	27
5	GFM	F	01/2019	36	27
6	MHTH	M	03/2019	42	30
7	TEM	M	05/2019	23	28
8	FM	M	03/2020	34	30
9	ASS	M	10/2021	50	24
10	MFC	M	01/2020	47	36
11	WMT	M	02/2019	29	30
12	OFS	F	07/2021	19	26
13	DC	M	03/2018	52	27
14	JFE	M	01/2017	47	23
Média $\pm$ DP		-	40 $\pm$ 12	28 $\pm$ 3	

## 4.2. Perfil clínico dos indivíduos

Os indivíduos/doadores das CTH foram avaliados quanto aos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Os dados foram obtidos dos prontuários, compilados e analisados para avaliar se esses parâmetros se encontravam em conformidade com os valores normais de referência.

### 4.2.1. Parâmetros hematológicos

Os dados obtidos para os parâmetros hematológicos dos indivíduos/doadores mostraram similaridade com os valores de referência para o total de leucócitos, para os percentuais de cada tipo celular (neutrófilos e linfócitos), assim como para as plaquetas e o total de hemoglobina; não houve diferença entre homens e mulheres (Tabela 2).

**Tabela 2.** Perfil hematológico dos indivíduos.

Indivíduos	Sexo	Leucócitos $\times 10^3$ (mm <sup>3</sup> )	Neutrófilos (mm <sup>3</sup> )	Linfócitos (mm <sup>3</sup> )	Hemoglobina (g/dL)	Plaquetas $\times 10^3$ (mm <sup>3</sup> )	
1	MF	F	4,3	65	20	14,4	190
2	JV	F	9,2	76	21	14,2	310
3	SMV	F	11,0	76	19	13,9	230
4	CF	F	3,9	86	10	12,7	340
5	GFM	F	8,8	51	32	13,9	198
6	MHTH	M	3,9	64	19	13,5	240
7	TEM	M	10,0	46	34	12,3	210
8	FM	M	4,3	78	10	14,2	401
9	ASS	M	4,2	68	10	15,1	420
10	MFC	M	5,9	65	12	13,9	390
11	WMT	M	7,4	58	23	12,8	422
12	OFS	F	9,3	76	19	12,5	360
13	DC	M	9,0	80	17	14,2	390
14	JFE	M	6,7	56	20	13,2	430
<b>M <math>\pm</math> DP</b>			<b>5,5 <math>\pm</math> 3,1</b>	<b>68 <math>\pm</math> 12</b>	<b>19 <math>\pm</math> 7</b>	<b>14 <math>\pm</math> 13</b>	<b>14 <math>\pm</math> 1324 <math>\pm</math> 92</b>

#### 4.2.2. Parâmetros bioquímicos

Os dados dos parâmetros bioquímicos dos indivíduos/doadores apresentaram índices de transaminases oxalacética (TGO) e pirúvica (TGP), gama glutamil transferase (GGT), hormônio tireoestimulante (TSH), fosfatase alcalina (FAL) e proteína C reativa (PCR) dentro dos valores de referência; não houve diferença entre homens e mulheres (Tabela 3).

**Tabela 3.** Perfil bioquímico dos indivíduos.

Indivíduos	Sexo	TGO U/L	TGP U/L	FA U/L	GGT U/L	TSH mUI/L	PCR (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	
1	MF	F	20	23	78	32	2,5	2,1	0,8
2	JV	F	17	17	38	17	2,3	0,9	1,2
3	SMV	F	13	28	65	19	2,7	1,3	0,7
4	CF	F	31	15	76	28	3,9	2,3	0,7
5	GFM	F	19	23	47	31	3,8	0,9	1,2
6	MHTH	M	17	22	100	23	3,1	1,2	1,0
7	TEM	M	21	32	65	25	1,9	3,2	1,0
8	FM	M	27	17	45	32	3,0	0,8	0,7
9	ASS	M	22	26	98	21	2,1	1,3	1,0
10	MFC	M	26	24	35	17	2,1	2,5	0,8
11	WMT	M	22	19	56	23	3,1	2,2	1,1
12	OFS	M	17	15	78	34	3,3	1,9	0,7
13	DC	M	28	12	87	43	2,3	1,2	0,8
14	JFE	M	30	23	61	23	1,2	3,3	0,7
<b>M ± DP</b>		<b>22 ± 5</b>	<b>21 ± 6</b>	<b>66 ± 21</b>	<b>26 ± 7</b>	<b>3 ± 1</b>	<b>2 ± 1</b>	<b>1 ± 0</b>	

TGO - transaminase oxalacética; TGP - transaminase pirúvica; FA – fosfatase alcalina; TSH - Hormônio tireoestimulante; PCR - Proteína c reativa; GGT - Gama Glutamil Transferase

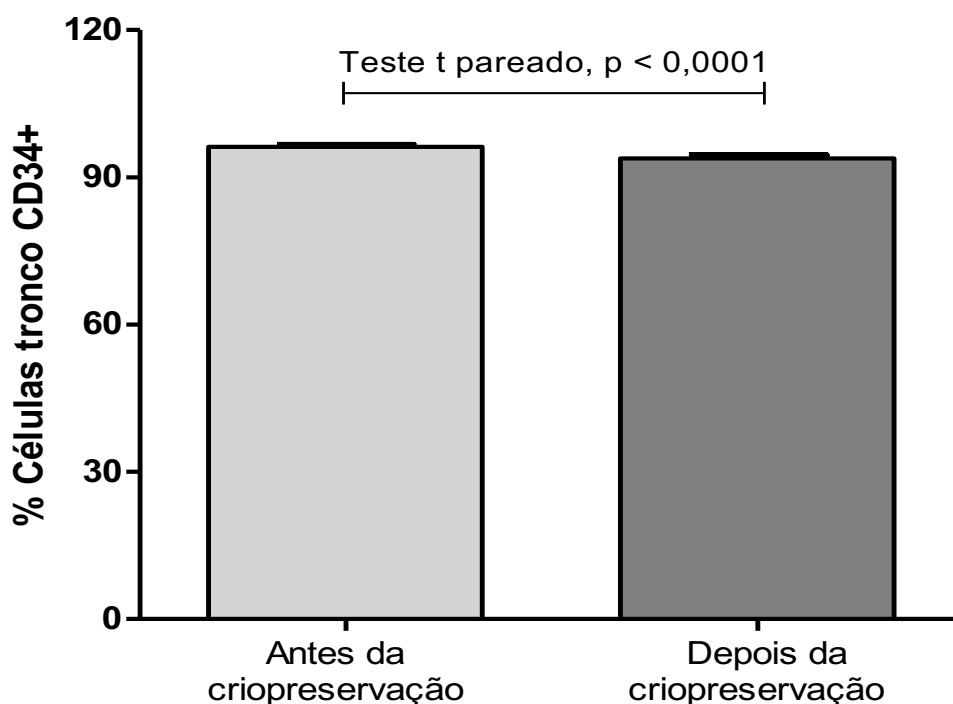
### 4.3. Análise da quantificação das CTH pela expressão do antígeno CD34+

Para determinar o percentual de CTH, as células obtidas por aférese foram submetidas à imunofenotipagem com o antígeno CD34, antes e depois da criopreservação.

Os resultados analisados pelo teste t pareado mostraram que a criopreservação por  $34 \pm 15$  meses causou a redução em 2% o percentual de células CD34+, sendo de  $96\% \pm 2\%$  antes do congelamento para  $94\% \pm 2\%$  depois desse procedimento ( $p < 0,0001$ ). Os resultados mostraram também não haver diferença nos percentuais de células CD34+ entre células congeladas até 30 meses e por mais de 30 meses (Teste t;  $p > 0,05$ ) (Tabela 4, Figura 11).

**Tabela 4.** Percentual de CTH CD34+, antes e depois da criopreservação.

Indivíduos	Sexo	Antes da		Depois da		Tempo de criopreservação (meses)
		criopreservação (%)	criopreservação (%)	criopreservação (%)	criopreservação (%)	
1	MF	F	98	98	36	
2	JV	F	97	93	34	
3	SMV	F	99	96	30	
4	CF	F	96	93	29	
5	GFM	F	95	92	42	
6	MHTH	M	98	97	39	
7	TEM	M	93	92	35	
8	FM	M	98	96	27	
9	ASS	M	93	91	8	
10	MFC	M	97	96	30	
11	WMT	M	99	95	41	
12	OFS	M	93	90	12	
13	DC	M	94	92	52	
14	JFE	M	97	93	66	
<b>M ± DP</b>			<b>96 ± 2</b>	<b>94 ± 2</b>	<b>34 ± 15</b>	

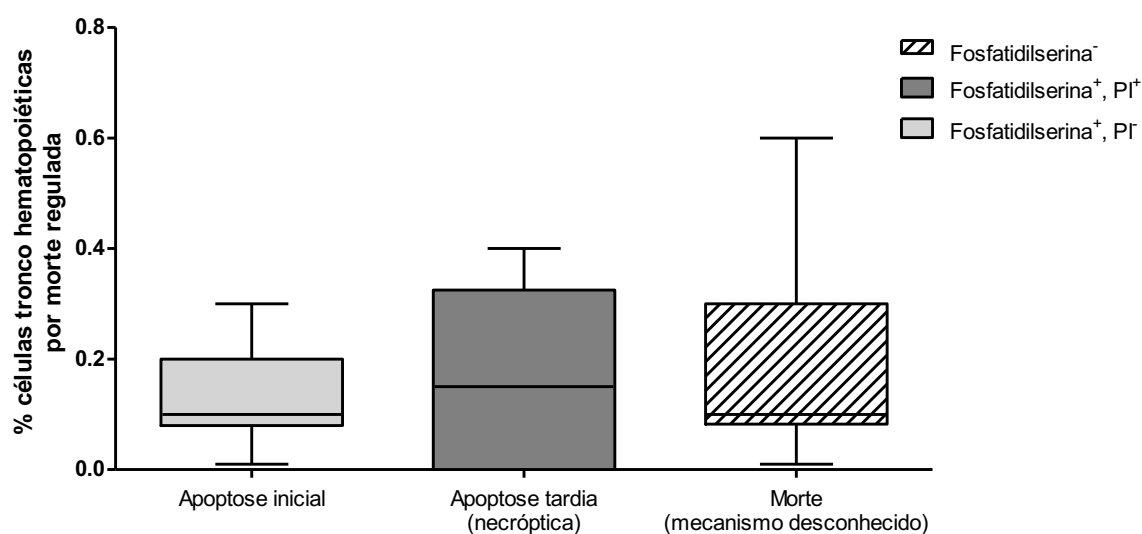


**Figura 11.** Percentual de células tronco CD34+ avaliado, antes e depois da criopreservação. Os resultados mostraram que o tempo em que as células estiveram sob congelação reduziu em 2% o percentual de células CD34+ (Teste t;  $p = 0,0130$ ). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.

#### 4.4. Avaliação do tipo de morte das CTH após descongelamento

Para identificar o tipo de morte regulada (com ou sem a liberação de fosfatidilserina), as CTH depois de descongeladas em banho maria foram duplamente marcadas com Anexina V-FITC/PI, sendo esse último reagente utilizado para verificar a morte não relacionada à apoptose.

Os resultados mostraram que as CTH mortas ( $94\% \pm 2\%$ ) morreram por mortes reguladas (não necrose), sendo que 0,10% estavam em apoptose inicial, 0,15% em apoptose tardia (morte necrótica) e 0,10% por mecanismo desconhecido. As análises mostraram similaridades entre as medianas dos percentuais para os três tipos de morte celular (Kruskal-Wallis,  $p = 0,657$ ) (Figura 8).



**Figura 12.** Percentual de células mortas pelo tipo de morte regulada das células tronco CD34+ depois da criopreservação. Os resultados mostraram não haver diferença entre os percentuais dos três tipos de morte celular (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). Estão mostradas as medianas, quartis, valores máximos e mínimos e pontos extremos.

#### 4.5. Identificação dos antígenos de histocompatibilidade HLA e sistema ABO/Rh dos indivíduos.

Os resultados do perfil imunogenético dos indivíduos avaliados os 10 locus do gene HLA (A, B, CW, DRB1 E DQB1).

Os indivíduos eram doadores HLA idênticos ou haploidênticos (semi-compatíveis) aos seus respectivos parentes.

Para a tipagem dos antígenos do HLA os resultados mostraram maior número de amostras com expressão do locus A\*02 (7 indivíduos), seguido pelo locus A\*03 (3 indivíduos); os loci A\*01, A\*26, A\*30 ou A\*32 foram identificados em amostras de quatro indivíduos.

Os resultados mostraram também uma ambiguidade no locus A\*33 das CTH do indivíduo MF (nº 8), não sendo possível identificar as variabilidades alélicas do código expresso (**A\*33:PXXD ?**). Assim, depois do sequenciamento gênico de alta geração foi identificado uma variante alélica *de novo* (A\*33:138) que, posteriormente, foi reportado ao catálogo internacional de imunogenética e ao *genebank* e, atualmente está inserido nos catálogos comerciais de identificação.

A tipificação ABO/Rh apresentou uma distribuição uniforme dos grupos sanguíneos, sendo 6 (seis) indivíduos do tipo O, 5 (cinco) do tipo A, 2 (dois) do tipo B e 1 (um) deles do tipo AB.

**Tabela 5.** Perfil dos antígenos HLA, do sistema ABO e fator Rh dos indivíduos.

Indivíduos		HLA	ABO	Rh
1	MF	A*03:CCNKR,A*23:CCCB/B*40:CVKP,B*51:CVKP/CW*02:DFTM, CW15*:DFTM/ DRB1*04:DMRB,DRB1*07:KCJN/DQB1*03:DEXJ, 03:DEXJ	O	+
2	JV	A*30:RDWE,A*74:RDUD /B*49:KEBW,B*81:CW*02:QASD,CW*4: FRMN/DRB1*11:JXKS,DRB1*12:JXKF/DQB1*03:DERI,DQB1*05: GRMN	A	-
3	SMV	A*02:PXTM,A*02:PXTM / B*15:RCDE,B*44:CERT /CW*07:CUYF , CW*16: CVBF/ DRB1*07:JXKS,DRB1*15:RAHP/ DQB1*: 02: CCBS, DQB1*06: ERTY	A	-
4	CF	A*02:PXTY,A*68:PXUS / B*40:AAUR,B*51:AAUR/ CW*07:CUYF , CW*16: CVBF DRB1*04:RCWF,DRB1*10:GMBR/ DQB1*: 02: CCBS, DQB1*06: ERTY	AB	+
5	GFM	A*03:PXXB,A*23:PYHU / B*07:RBYD,B*27:RCBS / CW*02:CUYF , CW*08: CVBF DRB1*11:RAUG,DRB1*11:RAVG/ DQB1*: 02: CCBS, DQB1*03: ERTY	A	+
6	MHTH	A*02:KVYZ,A*29:RUEP / B*15:RCAC,B*44:PYTX / CW*03:CUYF , CW*16: CVBF DRB1*04:RBKS,DRB1*07:RBMN/ DQB1*: 02: CCBS, DQB1*03: ERTY	O	+
7	TEM	A*02:PYCM,A*11:PYCM / B*27:PYPB,B*44:PYKF / CW*07:CUYF , CW*16: CVBF DRB1*01:GNHP,DRB1*07: EAPU/ DQB1*: 02: BPMN, DQB1*02: BPMN	A	+
8	FM	<b>A*01:PXTC,A*33:PXXD / B*14:DEGR,B*44:105 / CW*07:CUYF , CW*16: CVBF DRB1*01:VSR,DRB1*07:JXKR/ DQB1*: 02: CCBS, DQB1*06: ERTY</b>	B	-
9	ASS	A*03:RGAY,A*02:PYEK / B*50:KEBX,B*35:RCRU / CW*07:CUYF , CW*16: CVBF DRB1*15:JXMD,DRB1*07:JXKS/ DQB1*: 02: CCBS, DQB1*06: ERTY	O	+
10	MFC	A*02:PYD,A*30:PAKT / B*08:PYKE,B*15:PYKZ / CW*07:CUYF , CW*16: CVBF DRB1*03:RBMH,DRB1*07:MSGK/ DQB1*: 02: CCBS, DQB1*06: ERTY	O	+
11	WMT	A*26:AEPD,A*36:AE / B*44:RFEW,B*53:RCDP / CW*07:CUYF , CW*16: CVBF DRB1*08:AYUM,DRB1*11:RBNX/ DQB1*: 02: CCBS, DQB1*06: ERTY	B	+
12	OFS	A*02:RBWV,A*03:AE / B*18:PYJH,B*35:PYRS /CW*:02: DEGB, CW*04:RFNM/DRB1*04:ERFM,DRB1*08:AFYX/DQB1*03:ERFB, DQB1*04: WAQB	A	-
13	DC	A*32:RBWX,A*68:RDYY / B*39:SPC,B*40:RHTP / CW*07:CUYF , CW*16: CVBF DRB1*08:04,DRB1*14:RAHW/ DQB1*: 02: CCBS, DQB1*06: ERTY	O	+
14	JFE	A*02:PYDR,A*29:PYGY / B*14:RBCG,B*50:SWV / CW*02:BBVC , CW*05: BCVD DRB1*07:RAUN,DRB1*07:RAUN/ DQB1*: 01: BEDM , DQB1*02: BENN	O	+

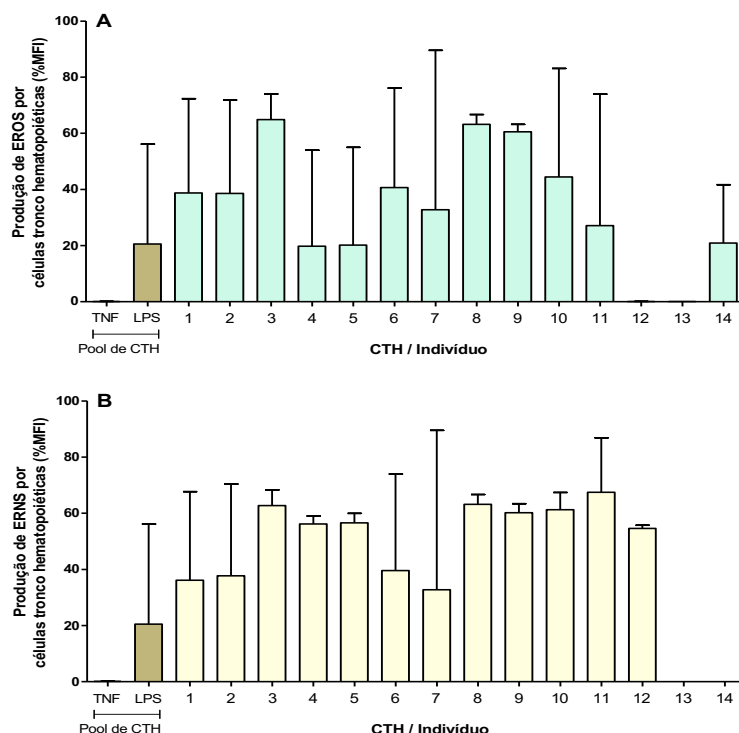


#### 4.6. Determinação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e nitrogênio (ERNS)

A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio não estimulada foi avaliada individualmente para as 14 amostras de CTH, mas para a produção estimulada com TNF (20 ng/mL) e LPS (50 ng/mL) utilizou-se o *pool* das CTH.

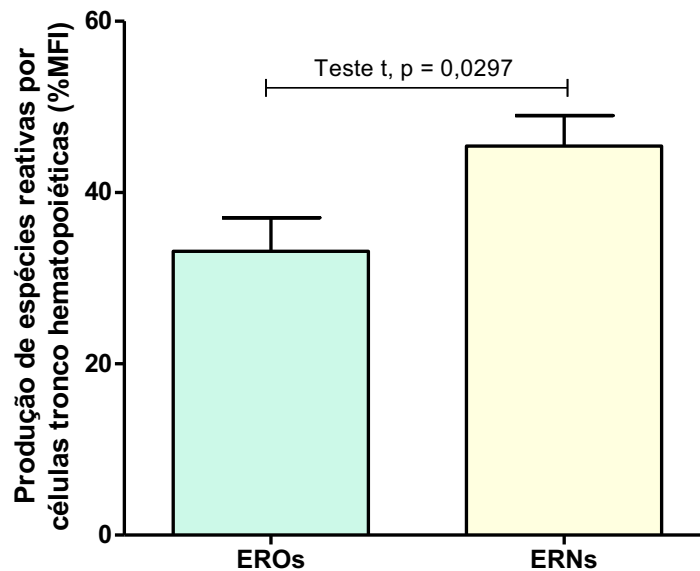
Os resultados mostraram grande variação na produção de ambas as espécies reativas, EROs (0,1 %MFI  $\pm$  0,0 %MFI a 63,2 %MFI  $\pm$  2,6 %MFI) e ERNs (0,0 %MFI  $\pm$  0,0 %MFI a 67,5 %MFI  $\pm$  19,4 %MFI); em duas amostras não houve produção de EROs (nº 12 e 13) ou ERNs (nº 13 e 14).

A utilização de 20 ng/mL de TNF não foi eficaz para estimular a produção de EROs pelo *pool* de CTH (0,0 %MFI  $\pm$  0,0 %MFI), no entanto estimulou uma pequena produção de ERNs (0,2 %MFI  $\pm$  0,1 %MFI). A utilização de 50 ng/mL de LPS estimulou a produção de EROs (20,1 %MFI  $\pm$  35.6 %MFI) e de ERNs (20,0 %MFI  $\pm$  35.3 %MFI) (Figura 13).



**Figura 13.** Percentual de produção de EROS E ERNS na regulação da morte regulada das células tronco CD34+ depois da criopreservação. Os resultados mostraram não haver diferença entre os percentuais dos três tipos de morte celular (Kruskal-Wallis,  $p > 0,05$ ). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.

A análise para o conjunto das amostras mostrou maior produção de ERNs (45,4 %MFI  $\pm$  12,9 %MFI) do que de EROs (33,1 %MFI  $\pm$  13,7 %MFI) (Teste t; p = 0,029) (Figura 14).



**Figura 14.** Produção de EROs e ERNs por CTH obtidas de 14 indivíduos. Os resultados mostraram maior produção de ERNs do que EROs (Teste t, p < 0,05). Estão mostrados as médias e os desvios padrão.

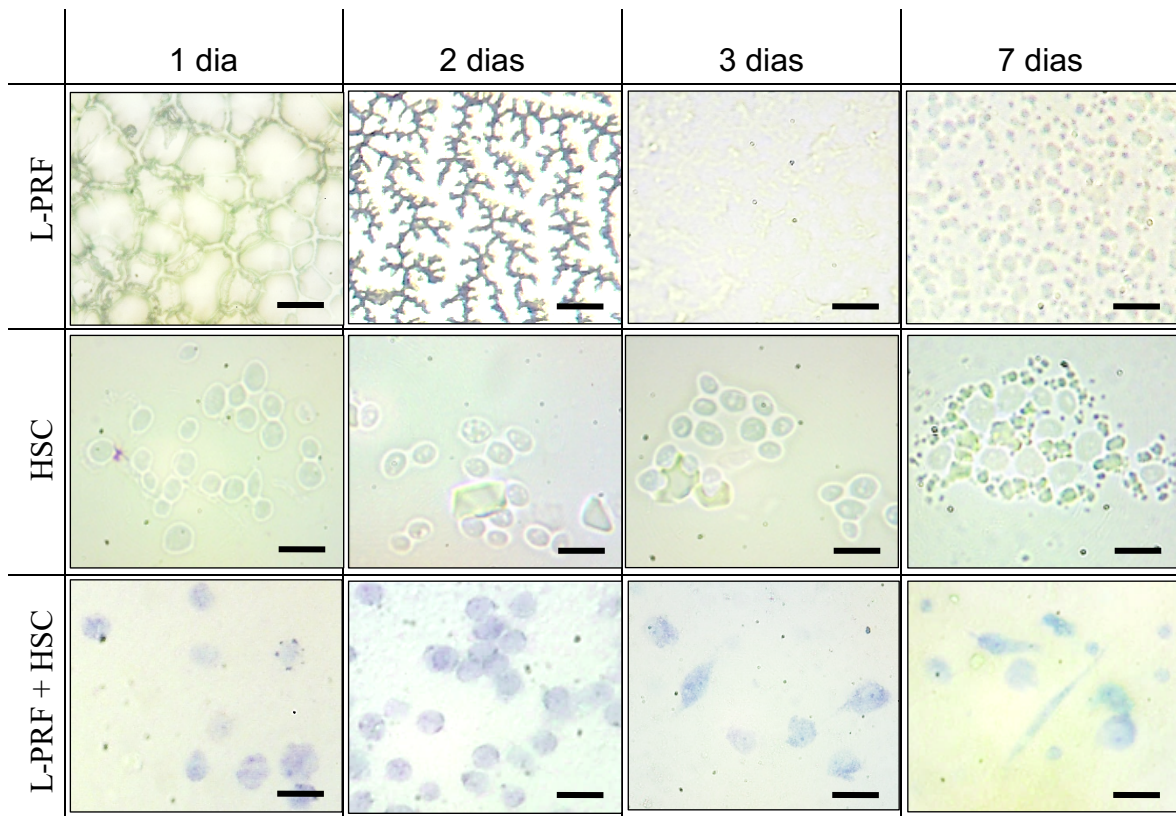
#### 4.7. Avaliação do papel da fibrina leucoplaquetária (FLP) como substrato para as CTH

A figura 11 representa os resultados dos cultivos das CTH incubadas na presença ou ausência da malha de fibrina por 1, 2, 3 ou 7 dias. A sequência do experimento foi registrada em cada estágio e formatada abaixo (Figura 15).

Na primeira linha, verifica-se a evolução da degradação da malha de fibrina até 7 dias em meio de cultura e a 37 °C. A avaliação morfológica mostrou que, decorridas 24 horas, a malha de fibrina (~2  $\mu$ m espessura) apresentava estrutura tridimensional preservada e em formato poliédrico (ver 1º linha x 1º coluna), que estava ausente com 48 horas de incubação (1º linha x 2º coluna). Decorridos 3 dias, observou-se fragmentos da malha de fibrina e estrutura poliédrica esparsa (1º linha x 3º coluna), mas com 7 dias de incubação estavam presentes apenas pequenos fragmentos da malha de fibrina (1º linha x 4º coluna)

Na segunda linha, as CTH incubadas em meio RPMI estavam dispersas com 1 e 2 dias (2º linha x 1º e 2º colunas), mas decorridos 3 dias elas se agregaram em formação sugestiva de *homing* (colônia de células) (2º linha x 3º coluna). No sétimo dia, os nichos celulares de CTH foram visíveis, assim como, fragmentos (debris) sugestivos de restos de células mortas (2º linha x 4º coluna).

Os registros morfológicos da terceira linha mostram interação entre a malha de fibrina e as CTH. Decorridos 2 dias de incubação eram nítidos os sinais de *homing* celular das CTH (2º coluna). Aos 3 e 7 dias (3º e 4º colunas), registrou-se alteração morfológica das CTH. Dentre essas, as células tornaram-se alongadas, cromatina condensada, presença de nucléolo e indícios de interação celular pela formação de pseudópodes.



**Figura 15.** Fotomicrografias de células-tronco hematopoiéticas (CTH) incubadas com ou sem fibrina leucoplaquetária (FLP) por 1, 2, 3 ou 7 dias. Na primeira linha, veja a degradação da malha de fibrina até 7 dias. Na segunda linha é possível identificar as células-tronco em possível processo de migração e adesão após 3 dias. Na terceira linha, as CTH aderiram a FLP em possível *homing* após 2 dias e com sinais de ativação celular (pseudópodes) aos 3 e 7 dias. Coloração Giemsa 10%, aumento de 1000x.

#### 4.8. SUMÁRIO DOS RESULTADOS

**Tabela 6.** Tabela contendo sumário dos resultados dos experimentos.

Parâmetros			Análise estatística
Epidemiológico	Idade (anos)	40 ± 12 anos	-
	IMC	28 ± 3	-
Hematológicos	Leucócitos x10 <sup>3</sup> (mm <sup>3</sup> )	5,5 ± 3,1	p > 0,05
	Neutrófilos (mm <sup>3</sup> )	68 ± 12	
	Linfócitos (mm <sup>3</sup> )	19 ± 7	
	Plaquetas x10 <sup>3</sup> (mm <sup>3</sup> )	324 ± 92	
	Hemoglobina (g/dL)	14 ± 1	
Bioquímicos	TGO (U/L)	22 ± 5	p > 0,05
	TGP (U/L)	21 ± 6	
	FA (U/L)	66 ± 21	
	GGT (U/L)	26 ± 7	
	TSH (mU/L)	3 ± 1	
	PCR (mg/dL)	2 ± 1	
	Creatinina (mg/dL)	1 ± 0	
Total de CTH-CD34 <sup>+</sup> vivas	Antes da criopreservação (%)	96 ± 2	t pareado p < 0,0001
	Depois da criopreservação (%)	94 ± 2	
Criopreservação	Tempo de (meses)	34 ± 15	
Tipo de morte regulada	Apoptose inicial	0,10%	Kruskal-Wallis p = 0,657
	Apoptose tardia	0,15%	
	Mecanismo desconhecido	0,10%	
Tipagem HLA	Maior expressão dos loci	A*02, DRB1*04, DRB1*07	-
Tipagem ABO	Tipo O	n = 6	-
	Tipo A	n = 5	
	Tipo B	n = 2	
	Tipo AB	n = 1	
Fator Rh	Positivo	n = 10	-
	Negativo	n = 4	
Espécies reativas	EROs	33,1 %MFI	Teste t; p = 0,029
	ERNs	45,4 %MFI	
Possível homing	CTH + RPMI	3 dias	-
	CTH + fibrina	2 dias	
Alteração morfológica das CTH	CTH + RPMI	-	-
	CTH + fibrina	3 e 7 dias	

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1. Considerações sobre o perfil epidemiológico e clínico dos doadores**

Considerando a importância do TCTH no tratamento das doenças onco-hematológicas e autoimunes é de suma importância aprofundamento do conhecimento de variáveis clínicas, laboratoriais e imunológicas que possam influenciar a qualidade, a viabilidade e o poder regenerativo das CTH. A escolha dos indivíduos foi baseada na necessidade de estabelecer um padrão de identificação de características pouco estudadas e correlacionadas no processo de coleta e criopreservação das CTH com fins terapêuticos. A escolha de pacientes como população estudada poderia apresentar dificuldades técnicas e de padrão de expressão diversos devido a fatores como: doença de base, quimioterapias prévias, radioterapia prévia, antibióticos de amplo espectro e comorbidades; situações essas que sabidamente interferem no microambiente medular e na vitalidade das CTH (Majado et al. 2011).

Os indivíduos eram doadores familiares sem comorbidades com média de idade de 40 anos ( $\pm 2$ ) sem significância estatística entre distribuição de sexo ou IMC. Os achados hematológicos e bioquímicos são compatíveis com indivíduos sem anormalidades clínicas, situação essa, que dependendo da gravidade, haveria um impedimento na doação conforme recomendações nacionais e literatura internacional (Gluckmann et al. 2006; Ruggeri et al. 2010; RDC no. 34, 2017). Verificamos uma média de idade mais velha que o habitual de doadores não aparentados (incluídos no banco do Registro Nacional de Doadores -REDOME), porém os indivíduos selecionados eram doadores dirigidos familiares e de saúde suplementar, assim são permitidos doadores mais velhos.

### **5.2. Considerações sobre os antígenos expressos pelos indivíduos**

O Brasil é um país continental e sua população foi constituída por vários grupos étnicos diferentes, tornando sua constituição genética, diversa e heterogênea. Inicialmente, o país era habitado por Ameríndios e, no século XVI, houve a chegada de portugueses na costa da região Nordeste. Posteriormente, franceses, holandeses e africanos, provenientes de países da África subsaariana (Angola, Guiné, Benim, Nigéria, Moçambique e Congo). No século XIX, espanhóis,

alemães, italianos e, no século XX, asiáticos, em especial, japoneses. Assim, a diversidade cultural que tanto caracteriza o Brasil, também proporciona uma variedade imunogenética típica de cada região brasileira (Monte et al. 2000).

A diversidade imunogenética (indivíduos com mesma expressão do gene HLA) nos transplantes de células tronco ocasiona uma dificuldade na busca de doadores HLA idênticos. Para a realização de TCTH são necessários a compatibilidade fullmatch ou no mínimo 1 mismatch (1 incompatibilidade) além de critérios clínicos e laboratoriais dos doadores.

Geopoliticamente, o país é dividido em 5 regiões: Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Cada uma apresenta uma história complexa de colonização e assim, proporções étnicas diferentes. De acordo com o censo do IBGE de 2010, em todas as regiões, com exceção da Sul, há um percentual maior que 35% da população que se auto declara mestiça. Além disso, estudos demonstram discrepância entre autodeclaração e ancestralidade genética. Um desses destacou que indivíduos brasileiros que se autodeclararam negros, apresentam cerca de 40% de ancestralidade genética europeia, enquanto os pardos, 70% (Meinz et al. 2008; Torres et al. 2017).

De acordo com a Companhia do Planejamento do Distrito Federal (DF), o DF, localizado no Centro-Oeste, foi criado em 1956 pela Lei nº 2.874 pelo então Presidente Juscelino Kubitschek. Sua criação e construção atraiu diversos imigrantes brasileiros e estrangeiros. A miscigenação, característica marcante do Brasil, tornou-se ainda mais destacada no DF. As contribuições mais expressivas para constituição da população do DF foram de imigrantes provenientes do Nordeste e do Sudeste (C. M. Ayo et al. 2015). Assim, a partir dos resultados apresentados, pode-se verificar essa diversidade genética na expressão do gene HLA, imprescindível para seleção de doadores de órgãos e tecidos. O alelo HLA-A\*02 identificado como o mais frequente alelo do locus A, é comumente expresso nas populações caucasianas corroborando dados populacionais conhecidos do DF sobre indivíduos de origem europeias. Lembramos que aqui a população estudada é pequena e que reflete apenas doadores aparentados, onde a maioria da amostra era de etnia declarada branca. Como já visualizados nos dados do REDOME

também houve elevadas frequências de grupos de alelos comuns na população caucasiana da Europa, como o HLA-DRB1\*04 e HLA-DRB1\*07, sendo tal comparação realizada por meio ao banco de dados do REDOME do Distrito Federal, cujos dados foram retirados na plataforma [www.allelefrequencies.net](http://www.allelefrequencies.net).

O perfil imunogenético da população brasileira ainda pouco publicado, mesmo sendo um dos países com maiores banco de doadores cadastrados mundialmente (Monte et al. 2000, Mainz et al. 2008). Os registros brasileiros publicados são de períodos pontuais e regionais, refletindo muitas vezes a imunogenicidade regional.

### **5.3. Considerações sobre os fatores que interferem na viabilidade/morte das células tronco**

Considerando os fatores analisados quanto a viabilidade celular pré congelamento (isto é, pós processamento celular das CTH envolvendo centrifugação, separação celular, manipulação das CTH em capela de fluxo laminar) a mediana de viabilidade celular pré criopreservação (pré congelamento) foi de 96% (+/-2). Tal análise foi realizada pelo protocolo de ISHAGE (Gratama et al. 2003, Sutherland et al. 2007), protocolo esse padronizado para todos os serviços que realização criopreservação celular com finalidade de uso terapêutico. Os achados de 96% de viabilidade celular de células CD34+ evidenciam elevados padrões de qualidade das CTH coletadas, pois valores acima de 92% se correlacionam inversamente proporcional com perdas celulares no na técnica de processamento inferiores a 10% (Stiff et al. 1995, Rowley et al. 1992, Berz et al. 2007, Majado et al. 2011, Santis et al. 2009). Os dados se repetem na avaliação da viabilidade celular pós descongelamento, ferramenta essa útil para avaliar problemas ou interferências no processo de criopreservação como:

- a) formação de cristais de gelo celular devido congelamento rápido;
- b) uso de criopreservantes intracelulares com concentrações tóxicas (DMSO>10%);



- c) manipulação do freezer -80°C durante o congelamento das bolsas criogênicas provocando variações de temperaturas não esperadas;
- d) nível de criopreservante em quantidade inconsistente com celularidade requerida (Berz et al. 2007, Majado et al. 2011, Santis et al. 2009).

Tais situações não ocorreram nas amostras dos indivíduos devidos aos baixos níveis de redução da viabilidade celular pós descongelamento com média de 94% (+/-2).

Sabe-se que o tempo de criopreservação é um fator de risco para desenvolvimentos de anormalidades estruturais e metabólicas das CTH. Vários achados recentes mostram que as CTHs não param o seu metabolismo durante a criopreservação. Na verdade, elas iniciam um processo de “quiescência” com redução do metabolismo e das trocas enzimáticas com meio. Por isso, o criopreservante extracelular é geralmente utilizado no processamento celular (componentes a base de albumina ou hidroxietilamido) como tentativa de nutrição continuada durante o período de criopreservação que pode durar anos (Santis et al. 2009, Morrison et al. 2008, Fleming et al. 2006, Chaytor et al. 2011, Braham et al. 2019, Frisch et al. 2014, Fuller et al. 2004).

Diante dos nossos resultados de viabilidade pré e pós congelamento das CTHs evidenciamos achados de conformidade com a literatura em relação a técnica de processamento, metodologia de criopreservação com congelamento programado em freezer -80°C bem como nos achados da qualidade de renovação das CTHs pela viabilidade celular pelas técnicas de nigrosina e citometria de fluxo pelo protocolo ISHAGE (Takaue et al. 1994, Gratam et al. 2003; Baust et al. 2007, Solomon et al. 2010).

A exposição de fosfatidilserina (PS) na membrana plasmática externa tem sido considerada uma característica única de células apoptóticas. Juntamente com outros sinais “*eat me*”, permite o reconhecimento e a fagocitose de células “doentes ou em processo de morte” (eferocitose), ajudando a explicar a natureza imunologicamente silenciosa de apoptose.

No estudo, delineamos as evidências da exposição a PS em CTH descongeladas e discutimos possíveis mecanismos de morte celular por via

apoptótica e não apoptótica com base em nosso conhecimento da exposição a PS. Ao examinar o padrão de fluorescência das CTH marcadas com PS, desafiamos a abordagem estabelecida de distinguir a apoptose de outras vias de morte celular pela coloração de Anexina. A exposição ao PS define a apoptose como um processo imunologicamente silencioso distinto de outras vias de morte celular não apoptótica e inflamatória (Shlomovitz et al. 2019) e anexina auxilia na identificação de morte celular por via necrótica.

Em nosso estudo a taxa de morte celular foi inferior a 10%, sendo que a percentagem de células mortas testadas para a morte celular apoptótica foi mais prevalente (94% das CTH) seguida pela morte celular do tipo necrótica 0,10%. Assim, sugere-se que as vias apoptóticas são ativadas por fatores criopreservantes ou imunitários ocasionando apoptose. Porém, a taxa de morte por via necrótica pode estar em valores reduzidos devido a ausência de fagócitos na amostra, pois as amostras selecionadas só possuíam CTH CD34+.

Em última análise, sugerimos que uma compreensão completa dos processos regulados de morte celular que afetam as CTH criopreservadas devem ser esclarecidas com estudos adicionais.

A molécula de  $O_2$  desempenha um papel fundamental no processo de fosforilação oxidativa, permitindo ao nosso organismo utilizar a energia proveniente de nutrientes como carboidratos, lipídios e proteínas com maior eficiência, uma pequena fração do seu consumo mitocondrial é transformada em espécies reativas de oxigênio (EROs) (Ludin et al. 2014). As espécies reativas de  $O_2$  são causadoras de danos oxidativos aos tecidos em organismos vivos e que certos antioxidantes podem proteger os tecidos contra esses danos. Por definição, denominam-se radicais livres as espécies químicas com existência independente, que possuem um ou mais elétrons desemparelhados, o que implica em maior reatividade, pois necessitam completar seus pares de elétrons para se estabilizarem. É importante destacar que, embora a molécula de  $O_2$  possua dois elétrons desemparelhados, ela não pode ser classificada como radical livre. A posição paralela de seus dois elétrons mais externos aumenta sua restrição de spins às moléculas biológicas, fazendo ela pouco reativa. Entre as EROS, o radical  $\cdot OH$  é considerado o mais

potente oxidante em sistemas biológicos devido ao seu tempo de vida extremamente curto ( $1 \times 10^{-9}$ s) e de sua alta reatividade com uma grande variedade de moléculas orgânicas. Além da sua geração na cadeia de transporte de elétrons, o radical  $\cdot\text{OH}$  pode, ainda, ser formado por duas diferentes vias alternativas em organismos vivos (Bredt et al. 1999, Crow et al. 1997).

A partir de então, houve um grande avanço nas investigações envolvendo a formação de EROS tecidos humanos, incluindo CTH. As evidências crescentes sugerem que as EROS também desempenham um papel importante na hematopoiese normal, condicionando o microambiente da medula óssea e promovendo a autorrenovação, migração e desenvolvimento de células-tronco. Esses efeitos são mediados pela citocina CXCL12, que é produzida e secretada pelas células do estroma. As EROS também estimulam a expressão ligada à membrana de CXCL12 nas células estromais da medula óssea, o que promove a migração e retenção de HSC no nicho hematopoiético. Os níveis moderados de EROS também são necessários para a hematopoese durante o desenvolvimento embrionário e para a homeostase hematopoiética em adultos (Ludin et al. 2014, Bai et al. 2018, Schuettpelz et al. 2013).

Outra importante espécie reativa é o óxido nítrico (NO), porém, agora, com sua origem proveniente do nitrogênio (espécie reativa de nitrogênio, ERN). O NO é considerado um segundo mensageiro intracelular com inúmeras funções biológicas, incluindo as funções neurotransmissora, vasodilatadora, imunológica e metabólica (Bredt et al. 1999). Embora os neutrófilos saibam aproveitar o potencial oxidante das EROS para proteger nosso organismo contra bactérias e outros microrganismos, evidências sugerem que altos níveis de ERN podem causar sérios distúrbios no estado redox do nosso organismo. Esse efeito deletério dessas espécies é conhecido como estresse oxidativo e, quando ocorre, diferentes componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA podem sofrer oxidação devido ao ataque das EROs comprometendo as principais funções celulares (Ludin et al. 2014, Bredt et al. 1999).

O estabelecimento de um método sensível na detecção de EROs e ERN tem sido fundamental devido ao amplo papel fisiológico e deletério dessas espécies

no tecido muscular. Devido a todas as dificuldades existentes na determinação de EROS e ERN, nos últimos anos muitos estudos têm surgido apresentando métodos cada vez mais atrativos para a determinação de EROS. Devido a uma maior sensibilidade, os métodos fluorescentes têm sido extremamente utilizados para monitorar a produção de EROS e ERNS em células de diferentes tecidos, conhecidas como 2,7-Diclorodihidrofluoresceína- diacetato (DCFH-DA) (reativo ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e 4,5- Diaminofluoresceína diacetato (DAF-2-DA) (reativo ao NO), reagentes esses idênticos aos utilizados em nosso experimento (Lewandovisky et al. 2009).

O percentual de fluorescências gerado por cada amostra testada nesse estudo reflete os marcadores oxidativos tanto no meio intracelular como no meio extracelular de EROS e ERNS. Por ser o grupo diacetato apolar, essas sondas difundem-se facilmente através da membrana celular em diferentes tecidos. Dentro das células, o grupo diacetato é facilmente hidrolizado por esterases citosólicas, deixando livres as moléculas de DCFH e DAF-2. Por serem, agora, polares, essas moléculas proporcionam um excelente substrato ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ao NO gerados em excesso durante aumento do metabolismo oxidativo. Porém, apesar de sua popularidade, a especificidade do DCFH ainda é bastante discutida na literatura. Os resultados divergentes têm sido apresentados quando experimentos usando o DCFH como marcador oxidativo de EROS principalmente na delimitação de “valores de corte“ entre o padrão normal/fisiológico de liberação das espécies reativas versus hiperexpressores/hipoexpressores (Bai et al, 2018, Xu et al 2010, Lewandovisky et al. 2009). Portanto, os nossos resultados com amostras de CTH de indivíduos saudáveis seguiu o padrão de distribuição de valores de corte de expressão do EROS (Figuras 13 e 14) conforme verificado nos resultados do estudo em amostras de CTH de pacientes portadores de mieloma múltiplo criopreservadas (Bai et al, 2018) dividindo indivíduos considerados EROS hiperexpressores e hipoexpressores conforme gráfico de expressão da IMF.

Nesse estudo, sugerimos um valor de corte de 45% MFI para EROS, sendo identificados 3 indivíduos com MFI acima de 45% de expressão sendo considerados hipoerexpressores (3, 8,9,10), dois indivíduos que não expressaram (12 e 13) e demais com padrão de expressão considerado regular (entre 1 e inferior

a 45% MFI). Único achado de associação entre os hiperexpressores de EROS foi tipificação HLA em que os indivíduos 3,9,10 apresentavam predomínio do alelo A\*02 e que eram do sexo masculino. As demais variáveis clínicas, bioquímicas e de viabilidade celular não evidenciaram padrão de associação, quando comparado ao estudo de Bai et al. (2018). No citado estudo, a população de pacientes estudada verificou que os indivíduos com maiores liberação de EROS apresentaram níveis de leucócitos coletados acima da média do grupo e sinais de recuperação hematológica mais célere.

Os dados conflitantes sugerem que as EROS podem ser benéficas e prejudiciais para a sobrevivência e diferenciação das células HSC. Os altos níveis de EROS podem ser tóxicos para as células e desencadear apoptose, mas outros estudos mostraram que um grau de acúmulo de ROS é importante na regulação da hematopoiese no embrião em desenvolvimento (Lewandovisky et al. 2009) e para a diferenciação de células-tronco HSC adultas em progenitores mielóides (Xu et al. 2010). Os dados previamente publicados sugerem que as EROS podem estimular a diferenciação de CTH ao longo da linhagem mielóide e estudos *in vitro* que sugerem que as células definidas como EROS hiperexpressas têm maior capacidade de formação de colônias do que as células EROS hipoexpressos em condições que estimulam a diferenciação de granulócitos (Bai et al 2018; Xu et al. 2010). Essa associação não conseguimos realizar a análise devido a ausência de realização de ensaios clonogênicos com amostras de CTH devido elevado custo.

Os resultados encontrados na análise do padrão de liberação de ERNS, estabelecendo um valor de corte acima de 35% de MFI para os hiperexpressos, houve uma leve tendência dos indivíduos com maiores taxas percentuais de MFI apresentarem idade superior a 35 anos e com maiores períodos de criopreservação (acima de 24 meses e inferior a 55 meses). Apenas dois indivíduos (nº 13 e 14) apresentaram ausência de liberação de ERNs e respectivamente apresentaram tempos de criopreservação superior a 55 meses, individuo 13 com 55 meses e o individuo 14 com 62 meses. Diante do perfil de expressão de ERNs indivíduos doadores aparentados não identificamos trabalhos similares para podermos comparar tais características, as citações estão presentes apenas em padrões de

expressão em CTH de linhagens comerciais ou em tecidos especializados onde identificam que hiperexpressão de ERNs esteja relacionado com longevidade das CTH em cultivo *in vitro* e no aumento da sua replicação em nível de nicho de medula óssea (Vlaski et al. 2015).

Hipotetizamos que conhecendo a via da cascata de produção e metabolismo do nitrogênio via intracelular, seu papel na sua maior expressão esteja ligado a fatores de manutenção do pH da CTH bem como em reações enzimáticas. O que não está claro é que as espécies reativas de Nitrogênio (ERNS) não são de fácil degradação celular por não possuírem enzimas catalíticas como EROS e que o padrão de hiperexpressão (*upregulation*) ocasionem lesão celular e morte celular em outras células de linhagem endotelial (Vlaski et al. 2015).

Nesse estudo, identificamos ao contrário dos achados nos tecidos supracitados. Essa situação não foi verificada em nosso experimento diante dos indivíduos com maiores expressões de ERNS apresentarem níveis de viabilidade celular pós descongelamento dentro dos padrões estabelecidos de qualidade (> 92%). Porém, os indivíduos 13 e 14, sem expressão de ERNS, apresentaram maiores períodos de criopreservação, assim sugerimos que em CTH a ausência de liberação de ERNS seja ocasionada pelo prolongado período de criopreservação ocasionando uma redução intensa no metabolismo celular com inibição intensa das vias metabólicas e das espécies reativas de nitrogênio.

A hipótese de uma intensa morte celular pela criopreservação não é justificável devido ao estudo de viabilidade celular realizado nos dois indivíduos evidenciando padrões acima de 92% de células vivas pela técnica de ISHAGE (pré congelamento) e pós descongelamento. Portanto, a acessibilidade desses reagentes para experimentos das espécies reativas de O<sub>2</sub> no meio intra e extracelular em CTH faz delas um excelente modelo experimental na detecção intra e extracelular de EROS e ER. (Vlaski et al. 2015), porém necessitamos estabelecer valores de padrão de expressão em cada fase da etapa de criopreservação associada análise de expressão proteica em cada população específica estudada.

#### **5.4. Considerações sobre a diferenciação de CTH**

As culturas e ensaios específicos de HSC são necessários para manter e expandir a população de HSC antes do uso terapêutico, pesquisa experimental e análises funcionais. As culturas de CTH devem consistir em componentes capazes de fornecer o microambiente adequado para a manutenção das propriedades das HSC. Assim, as culturas de CTHs imaturas são iniciadas com uma camada de células alimentadoras do estroma para complementar as células com quantidades aumentadas de fatores de crescimento (Frisch et al. 2014). No entanto, esses modelos são caros e geralmente indisponíveis em países em desenvolvimento. Além disso, a natureza bidimensional das culturas impossibilita a interação entre as células e o microambiente do nicho natural das CTH, sugerindo condições subótimas para culturas de CTH (Ribeiro et al. 2019).

Os vários modelos têm sido propostos para cultivar CTHs em um ambiente tridimensional mais natural. Braham et al demonstraram a eficácia do uso de hidrogéis para mimetizar a matriz extracelular presente no nicho das CTH no suporte ao crescimento das CTH sem a presença de fatores de crescimento, otimizando a quantidade de células alimentadoras (células com função de transporte de nutrientes associada a células endoteliais e mesenquimais) (Braham et al. 2019).

Além dos métodos descritos acima, existem vários métodos em desenvolvimento, como esferoides, organoides, bioimpressão 3D e órgãos em chip, e estes enfrentam o desafio de cultivar CTHs mantendo suas propriedades biológicas (Frisch et al. 2014; Ribeiro et al. 2019; Weisel et al. 2017).

A fibrina leucoplaquetária (FLP) é uma excelente e acessível fonte de fatores de crescimento e outros fatores solúveis, tanto para uso nas pesquisas, quanto para fins terapêuticos. Assim, é possível que uma matriz biológica aderente otimizada, composta por plaquetas e fibrina, fornece os fatores específicos de nicho essenciais e suporte estrutural tridimensional para a adesão, expansão e interação das CTHs com o microambiente extramedular, resultando em sinalização e diferenciação ativas de CTH (Dohan et al. 2017). A matriz de fibrina orquestra sinergicamente o recrutamento de células-tronco ou células progenitoras após uma

resposta inflamatória dirigida por neutrófilos, macrófagos M1 polarizados e linfócitos T (fase inicial) e macrófagos M2 (fase tardia) (Ilelecki et al. 2012). Um crescente corpo de evidências demonstra a contribuição de L-PRF *in vivo* na angiogênese e vasculogênese no local lesionado, tal sinalização é mediada por células-tronco hematopoiéticas intrinsecamente transportadas (CTHs) (CD34+) e células progenitoras endoteliais (EPCs) (CD34+ /VEGR -2+/CD133+) (Di Liddo et al. 2018, Schar et al. 2015).

Considerando o potencial de renovação celular da FLP, o estudo demonstrou dentro de 48-72 horas que há uma mudança considerável na morfologia das HSC com células apresentando um padrão de diferenciais com citoplasma alongado, sinais de pontes intercitoplasmáticas e algumas HSC com características de células endoteliais. Sugerimos que fatores de crescimento endotelial, proteínas de adesão, citocinas inflamatórias e outros marcadores presentes na malha de fibrina podem ter atuado como estimulantes da diferenciação e permanência da adesão das CTH. Os achados após 7 dias sugerem diminuição da concentração de CTH, mas identificação de alterações morfológicas importantes, como a presença de célula alongada sobreposta à malha de fibrina, sugerindo diferenciação em células de origem endotelial (aparentemente fibroblastos).

A expansão *ex vivo* de CTHs ainda é um dilema. Quando cultivadas, as CTHs se diferenciam rapidamente o que resulta no esgotamento do pool de células-tronco (Khosrowshahi et al. 2016). O desenvolvimento de metodologias que permitam a expansão dessas células é de grande relevância para o desenvolvimento de terapias e para o estudo da capacidade de autorrenovação e comissionamento de CTHs (Burnouf et al. 2013).

A dificuldade na construção de sistemas *in vitro* para o cultivo de CTH se deve essencialmente à complexidade do microambiente medular onde residem as CTH. O nicho hematopoiético exerce importante influência nas CTHs, sobretudo pela preservação do *pool* de HSCs e pela formação contínua de células maduras (Cesselli et al. 2009; Huang et al. 2016; Khosrowshahi et al. 2016).



Os sistemas de cultivo de células estromais com células hematopoiéticas têm se tornado metodologias amplamente utilizadas em protocolos de expansão e diferenciação de CTH, bem como no estudo da interação de elementos estromais com CTHs (Crane et al. 2017). No entanto, essas metodologias não mimetizam a real arquitetura tridimensional da medula óssea e, portanto, não refletem a real configuração do microambiente hematopoiético (Mousavi et al. 2015).

Para tentar imitar a arquitetura real da MO, os sistemas de cultura CTH foram desenvolvidos em ambientes tridimensionais (3D) que usam escafoides ou elementos da matriz extracelular, como colágeno e fibronectina. Culturas 3D favorecem a reconstrução de um microambiente mais complexo que permite maior interação entre as células. Alguns estudos mostraram que ambientes 3D *in vitro* favorecem a proliferação e preservação do pool de CTH de forma mais eficaz do que culturas em ambientes bidimensionais (Masoudi et al. 2016; Caloprisco et al. 2010; Scapin et al. 2016).

No entanto, nenhum estudo demonstrou a viabilidade desses protocolos para obtenção de CTHs com alta capacidade de reconstituição hematopoiética *in vivo*. O desenvolvimento de modelos *in vitro* que mimetizem a formação do microambiente existente *in vivo* torna-se importante para o entendimento da biologia das CTHs, bem como para a obtenção de CTHs funcionais que possam ser utilizadas na prática clínica. As células-tronco pluripotentes, especialmente as células-tronco humanas, são promissoras para o desenvolvimento desses modelos. Sob condições específicas, essas células são capazes de recriar um ambiente tridimensional *in vitro* que permite o desenvolvimento de CTHs (Castro et al. 2017).

Com base nos achados acima, nosso estudo tentou simular um ambiente tridimensional com malha de fibrina naturalmente enriquecida com PRF fisiológico como um potencial meio de cultura de CTH. Os achados e as hipóteses desenvolvidas neste trabalho propõem novos estudos de identificação por meios moleculares, imunológicos e enzimáticos dos achados verificados.

Os achados histológicos e celulares foram registrados descritivamente de acordo com o cronograma de etapas mencionado anteriormente. Lembramos que

por se tratar de um trabalho experimental e piloto, muitos achados morfológicos são considerados como hipótese de um novo meio de cultura para proliferação e diferenciação de células-tronco hematopoiéticas (Paes et al. 2019; Costa et al. 2016). Os vários trabalhos experimentais anteriores realizaram o registo fotográfico digital das fases evolutivas da diferenciação das CTH, porém nenhum meio confeccionado com FLP.

Os achados *in vitro* neste estudo sugerem que A FLP tem o potencial de estabilizar e manter o crescimento de células imaturas ou pouco diferenciadas. Além disso, as CTHs podem interagir com várias células em tecidos que podem ser usadas em terapia especializada. Essas propriedades precisam ser confirmadas usando técnicas sensíveis e especializadas.

### **5.5. Contribuições do estudo**

O potencial terapêutico das CTH já está bem estabelecido na literatura mundial. As melhorias nas técnicas de criopreservação nos últimos anos reduziram as taxas de falha de enxertia, reduziram o tempo de internação hospitalar e melhoraram as características biológicas de renovação das CTH. Porém, ainda muitos aspectos imunológicos ainda são estão bem esclarecidos durante o processamento e descongelamento das CTH, principalmente no que se trata de vias oxidantes e de viabilidade celular pelo efeito criopreservante em população de pacientes e indivíduos saudáveis. Em determinadas situações de falha de enxertia ou elevada quantidade de morte celular com redução da viabilidade celular e piores resultados no TCTH podem ser secundários a alterações nas vias de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Assim, a estabelecemos dados que podem contribuir para o início de vias metabólicas especializadas das CTH ainda sem muitas respostas. A reprodutibilidade do cultivo das CTH em meios comerciais não é de acessibilidade rotineira nos centros de pesquisas brasileiros devido elevado custo comercial. O desenvolvimento de substratos experimentais com fibrina leucoplaquetária pode ocasionar novos questionamentos dos meios de cultivos hoje utilizados, sendo de

fácil acesso biológico, totalmente humanizado e com resultados em várias linhagens teciduais muito promissoras.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados análise retrospectiva dos parâmetros clínicos, epidemiológicos e imunitários das CTH permitem concluir que:

- Os indivíduos doadores das CTH foram adultos jovens com parâmetros hematológicos e bioquímicos dentro dos valores normais de referência;
- O tempo de criopreservação de  $34 \pm 15$  meses reduziu em 2% o total de CTH-CD34<sup>+</sup>;
- Quanto aos antígenos HLA houve maior expressão dos loci A\*02, DRB1\* 04, DRB1\*07;
- Quanto ao tipo de morte celular regulada não houve diferença entre os percentuais de apoptose inicial, apoptose tardia e por mecanismo desconhecido;
- Quanto à tipagem do sistema ABO houve predomínio do tipo O (6 indivíduos), seguido pelo tipo A (5 indivíduos);
- Quanto à tipagem do fator Rh houve predomínio do tipo positivo (10 indivíduos);
- Quanto à expressão de espécies reativas pelas CTH posteriormente à criopreservação houve grande variabilidade individual e maior produção de ERNs do que EROs pelo conjunto dos indivíduos;
- O uso da malha de fibrina favoreceu a antecipação do agrupamento celular (*homing* / 2 dias de incubação), enquanto na ausência da fibrina o agrupamento foi observado com 3 dias;
- O uso da malha de fibrina favoreceu o surgimento de sinais de diferenciação celular (pseudópodes e nucléolo evidente) com 3 dias de incubação, enquanto no controle esses sinais estavam ausentes.

O conjunto dos resultados listados acima mostram que os parâmetros relacionados à criopreservação devem ser considerados para garantir a qualidade das CTH. A constatação de que houve redução na viabilidade das células depois

de serem descongeladas e que algumas amostras apresentaram metabolismo mitocondrial próximo de 0 (zero) por ocasião da avaliação das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio sugerem que as CTH podem ter sido afetadas pelo método de criopreservação/descongelamento ou mesmo pelo tempo de congelamento. No entanto, considerando ainda que a enxertia das CTH nos indivíduos submetidos aos transplantes de medula óssea foi 100% bem-sucedida, acredita-se que o total de células viáveis/inóculo foi satisfatória.

Ainda, considerando que a malha de fibrina rica em plaquetas, como substrato para o cultivo das CTH proporcionou a adesão, o *homing* e os sinais de diferenciação celular, acredita-se que os parâmetros relacionados ao método de congelamento/descongelamento e ao tempo de criopreservação foram apropriados para garantir a qualidade das amostras de CTH. No entanto, sugere-se a continuidade dos estudos para determinar o efeito a curva de tempo x qualidade das células para auxiliar a tomada de decisão dos bancos nacionais de criopreservação de células tronco.

## **7. LIMITAÇÕES E PERPECTIVAS**

O estudo foi desenvolvido de forma experimental e com técnicas inovadoras que visam ampliar o potencial de viabilidade das CTH e a fibrina leucoplaquetária como substrato de estabilidade da CTH. Foram identificadas várias limitações durante o estudo dentre elas:

- a) Os insumos e manuseio dos reagentes de citometria de fluxo para as análises de EROS e ERNS, devido ao seu alto valor de custeio, sua instabilidade após manipulado;
- b) A falta de valores de referências publicados ou estabelecidos para a análise dos resultados do EROS e ERNS nas linhas de CTH;
- c) Dificuldades na obtenção e manuseio da fibrina leucoplaquetária, sendo necessária simulação prévia para a correta coleta e manipulação para o experimento;
- d) A análise da microscopia óptica das CTH devido sua dificuldade de coloração e morfologia não padrão;

Porém identificamos um potencial ilimitado de perspectivas e questionamentos que são necessários respostas diante dos achados do estudo, dentre eles :

- a) A replicação do desenho do estudo com amostragem superior para confirmarmos a reprodução dos dados encontrados;
- b) A análise mais detalhada de EROS, ERNS incluindo citocinas, ensaios clonogênicos com meio especializado com finalidade de verificar perfil de expressão das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio com taxa de recuperação medular, taxas de neutrófilos e plaquetas pós enxertia de CTH;
- c) Realizar a análise de EROS e ERNS em amostras de pacientes portadores de doenças onco-hematológicas quando comparados com indivíduos saudáveis;
- d) Realizar estudo detalhado da fibrina leucoplaquetária como substrato de CTH com análise de microscopia eletrônica, estudo de metabolismo celular, padrão de expressão proteica e identificar nutrientes para aumentar potencial de uso como meio de cultivo das CTH.



## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Badran Z, Abdallah MN, Torres J, Tamimi F. Platelet concentrates for bone regeneration: Current evidence and future challenges. *Platelets*, 29:105–12, 2018
2. Bai L, Best G, Xia W, Peters L, Wong K, Ward C, Greenwood M. Expression of Intracellular Reactive Species in Hematopoietic Stem Cells Correlates with Time to Neutrophil and Platelet Engraftment in Patients Undergoing Autologous Bone Marrow Transplantation. *Biol Bone Marrow Transplant*, 24:1997-2000, 2018.
3. Baust, John M. Cell and tissue properties influencing preservation outcome: molecular basis of preservation-induced cell death. *Advances in biopreservation*,3: 63-87, 2007.
4. Berz, David. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *American Journal of Hematology*,82: 463-472, 2007.
5. Braham MVJ, Li Yim ASP, Garcia Mateos J, Minnema MC, Dhert WJA, Öner FC, et al. A human hematopoietic niche model supporting hematopoietic stem and progenitor cells in vitro. *Adv Healthc Mater*,8:180-184, 2019.
6. Bredt David. Endogenous nitric oxide synthesis: Biological functions and pathophysiology. *Free Rad Res*, 31: 77-96, 1999.
7. Bryder, David; Rossi, Derrick J.; Weissman, Irving L. Hematopoietic stem cells: the specific stem cell of paradigmatic tissue. *The American journal of pathology*,169: 338-346, 2006.
8. Burnouf T, Goubran HA, Chen T-M. Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev*, 27: 77– 89, 2019.
9. Caloprisco G, Borean A, De Angeli S, et al. New method to produce hemocomponents for regenerative use from peripheral blood: integration among platelet growth factors monocytes and stem cells. *Transfus Apher Sci*, 42: 117– 24, 2010.

10. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, *et al.* Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol*, 44: 67– 82, 2017.
11. Cesselli D, Beltrami AP, Rigo S. Multipotent progenitor cells are present in human peripheral blood. *Circ Res*, 104: 1225– 34, 2009.
12. Chaytor, Jennifer L. *et al.* Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology*. 22:123-133, 2011.
13. Choo, Sung Yoon. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei medical journal*. 48: 11-23, 2007.
14. Ayo CM. “Frequencies of allele groups HLA-A, HLA-B and HLA-DRB1 in a population from the northwestern region of São Paulo State, Brazil,” *Int. J. Immunogenet.* 42: 19–25, 2015.
15. Costa, Everton de Brito Oliveira. Eficiente produção *in vitro* de células-tronco/progenitoras hematopoéticas a partir da diferenciação de células-tronco embrionárias humanas / Everton de Brito Oliveira Costa; Orientador Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas. – Ribeirão Preto, 2016.
16. Crane GM, Jeffery E, Morrison SJ. Adult haematopoietic stem cell niches. *Nat Rev Immunol*. 17: 573–90, 2017.
17. Crow JP. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite *in vitro*: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide*. 1:145-57, 1997.
18. Oliveira LA, Borges TK, Soares RO, Buzzi M, Kückelhaus SAS. Methodological variations affect the release of VEGF *in vitro* and fibrinolysis' time from platelet concentrates. *PLoS One*. 7;15-22, 2020.
19. Di Liddo R, Bertalot T, Borean A, Pirola I, Argentoni A, Schrenk S, Cenzi C, Capelli S, Conconi MT, Parnigotto PP. Leucocyte and Platelet-rich Fibrin: a carrier of autologous multipotent cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*.

22:1840-1854, 2020.

20. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol.*13: 1131– 7, 2012.
21. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets.* 2: 1– 14, 2007.
22. Fleming, K.K.; Hubel, A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. *Transfusion and scientific measurement.* 34: 309-315, 2006.
23. Frisch BJ, Calvi LM. Hematopoietic stem cell cultures and assays. *Methods Mol Biol.* 1130:315–24, 2014.
24. Fuller, Barry; Paynter, Sharon. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reproductive biomedicine online.* 9: 680-691, 2004.
25. Gluckman, E; Rocha, V. Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Current opinion in immunology.* 18: 565-570, 2006.
26. Gluckman, E; W Rock; Pasquini R; Outcome of Cord-Blood Transplantation from Related and Unrelated Donors. *New England Journal of Medicine.* 337: 373-381, 1997.
27. Gratama JW. Validation of the single platform ISHAGE method for CD34+ hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. *Cytotherapy.* 5: 55-65, 2003.
28. Hart J. Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. *J Wound Care.* 11: 205– 9, 2002.
29. Huang X, Zhu B, Wang X, Xiao R, Wang C. Three-dimensional co-culture of

- mesenchymal stromal cells and differentiated osteoblasts on human bio-derived bone scaffolds supports active multi-lineage hematopoiesis in vitro: Functional implication of the biomimetic HSC niche. *Int J Mol Med*. 38:1141–51, 2016.
30. Ielecki T, Dohan Ehrenfest DM. Leukocyte- and platelet-rich Plasma (L-PRP)/fibrin (L-PRF) in medicine - past, present, future. *Curr Pharm Biotechnol*. 3: i– ii, 2012.
  31. Khosrowshahi YB, Khoshfetrat AB, Shamsasenjan K. Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells in a proliferation chamber with external stirred conditioning tank: Sequential optimization of growth factors. *Eng Life Sci*. 16:254–62, 2016.
  32. Klein, J. A. N.; Sato, Akie. The HLA system. *New England Journal of Medicine*. 343: 702-709, 2000.
  33. Kong Y, Song Y, Hu Y. increased reactive oxygen species and exhaustion of quiescent CD34 positive bone marrow cells may contribute to poor graft function after allotransplant. *Oncotarget*. 7: 30892-30906, 2016.
  34. Kucia MJ, Wysoczynski M, Wu W. Evidence that very small embryonic-like stem cells are mobilized into peripheral blood. *Stem Cells*. 26: 2083– 92, 2008.
  35. Torres L, LF da Silva Bouzas, A. Almada, LCM de Sobrino Porto, and E. Abdelhay, “Distribution of HLA-A, -B and -DRB1 antigenic groups and haplotypes from the Brazilian bone marrow donor registry ( REDOME),” *Humm. Immunol*. 78: 602–609, 2017.
  36. Lewandowski D, Barroca V, Duconge F. In vivo cellular imaging pinpoints the role of reactive oxygen species in the early steps of adults hematopoietics reconstitution. *Blood*.115: 443-451, 2009.
  37. Liu Y, Xu X, Ma X, Martin Rendon E, Watts S, Cui Z. Cryopreservation of mesenchymal stem cell derived from human bone marrow with reduced

- DMSO and well-defined freezing solutions. *Biotechnol. Prog.* 26:1635-43, 2010.
38. Ludin A, Cohen G, Golan K, Kaufmann K. Reactive Oxygen Species regulate hematopoietic Stem Cell Self renewal, migration and development, AS well as their bone marrow microenvironment. Antioxidants and Redox signaling. 21: 1605- 1619, 2014.
  39. Körbling M, P. Anderlini. Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood*, 98: 2900-2908, 2001.
  40. Majado, Maria J. Cryopreservation impact on blood progenitor cells: influence of diagnoses, mobilization treatments, and cell concentration." *Transfusion*. 51: 799-807, 2011.
  41. Marenzi G, Riccitiello F, Tia M. Influence of Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin (L-PRF) in the healing of simple postextraction sockets: a split-mouth study. *Biomed Res Int*. 2015: 369273-9, 2015.
  42. Masoudi E, Ribas J, Kaushik G, *et al*. Platelet-rich blood derivatives for stem cell-based tissue engineering and regeneration. *Curr Stem Cell Reports*. 2: 33– 42, 2016.
  43. Meinz C. Avaliação do percentual de compatibilidade HLA entre membros da mesma família para pacientes à espera de transplante de medula óssea em Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*. 30(5):359-362, 2008.
  44. Monte SJH, Moita JMN, Rampim GF, Shulzhenko N, Morgun A, Gerbase-Delima M. Polimorfismo do sistema HLA em uma amostra de mestiços da população de Teresina, Piauí. *Revista da Associação Médica Brasileira*. 50(4):422-8, 2004.

45. Morrison, J. Sean; Spradling, Allan C. Stem cells and niches: mechanisms that promote the maintenance of stem cells throughout life. *Cellular*. 4: 598-611, 2008.
46. Mousavi SH, Abroun S, Soleimani M, Mowla SJ. Expansion of human cord blood hematopoietic stem/progenitor cells in three-dimensional Nanoscaffold coated with Fibronectin. *Int J Hematol Stem Cell Res*. 9:18–25, 2015.
47. Paes, Bárbara Cristina Martins Fernandes. Geração de células-tronco/progenitoras hematopoéticas e progenitoras eritróides a partir de células-tronco de pluripotência induzida derivadas de pacientes com anemia falciforme. 10.11606/D.17.2019.tde-08012019-151743.
48. Pasquini R. Antígenos de histocompatibilidade. In: Zago MA, Falcão RP, Pasquini R, editores. *Hematologia - Fundamentos e Práticas*. São Paulo: Atheneu.1: 935-948,2004.
49. Petra S, Schwinger W, Lackner H et al. *Haematologica*. 95:1616-51, 2010.
50. Stiff PJ, Koester AR, Weidnwe MK, Dvorak K et al. Autologous bone marrow transplantation using cryopreservation of non-fractionated cells in DMSO and HES without controlled rate freezing. *Blood* 70:974-978, 1995.
51. Raaijmakers, Marc Hgp; Scadden, David T. *Current opinion in hematology*, 15: 301-306, 2008.
52. Resolução RDC nº 34, de 11 de junho de 2014 (RDC 34/2014) - Dispõe sobre as Boas Práticas no Ciclo do Sangue. Portaria de consolidação MS-GM nº 5 de 28 de setembro de 2017.
53. Ribeiro-Filho AC, Levy D, Ruiz JLM, Mantovani M da C, Bydlowski SP. Traditional and Advanced Cell Cultures in Hematopoietic Stem Cell Studies. *Cells*. 8:1628-9, 2019.
54. Rowley, Scott D. Cryopreservation of hematopoietic stem cells: a review of current techniques. *Hematotherapy journal*. 1: 233-250, 1992.

55. Ruggeri A, Ciceri F, Gluckman E, Lapopin M. Alternative donors hematopoietic stem cell transplantation for adults with acute myeloid leukemia. *Best Practices Res. Clin. Hematol.* 23(2):207-16, 2010.
56. Santis, G. C.; Prata, K. L. Criopreservação de células-progenitoras hematopóéticas. *Medicina (Ribeirão Preto)*. 42: 36-47, 2009.
57. Scapin G, Bertalot T, Vicentini N. Neuronal commitment of human circulating multipotent cells by carbon nanotube-polymer scaffolds and biomimetic peptides. *Nanomedicine (Lond)*.3: 32-9, 2016.
58. Schär MO, Diaz-Romero J, Kohl S. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res*.473: 1635– 43, 2015.
59. Schuettpeiz L, Link D. Regulation of hematopoietic stem cell activity by inflammation. *Frontiers in Immunology*. 4: 1-12, 2013.
60. Shlomovitz, I., Speir, M. & Gerlic, M. Flipping the dogma – phosphatidylserine in non-apoptotic cell death. *Cell Commun Signal* 17: 139-46, 2019.
61. Solomon M, Wofford W, Johnson C. *Transfusion*, 50:820-30, 2010.
62. Sutherland Dr. Keeney M. *Flow Cytometry in clinical diagnosis*. 4 ed. Chicago, IL: ASCP Press:321-44, 2007.
63. Takaue Y, Abe T, Kawano Y, Suzue T, Hirro A ET AL. *Bone Marrow Transplant*. 13:801-804, 1994.
64. Vlaski-Lafarge M, Ivanovic Z. Reliability of ROS and RNS detection in hematopoietic stem cells--potential issues with probes and target cell population. *J Cell Sci*.128:3849-60,2015.
65. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin formation, structure and properties. *Subcell Biochem*. 82:405–56, 2017



66. Xu X, Cowley , Flam CJ. The roles of apoptotic pathways in the low recovery rate after cryopreservation of dissociated human embryonic stem cells. *Biotechnol Prog.*26:827-837, 2010.



## 9.1 PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA (PROCOLO 5.769.882)



HOSPITAL SANTA MARTA/ DF



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Septic arthritis due cytomegalovirus infection after haploidentical hematopoietic stem cell transplant: case report and review of literature.

**Pesquisador:** Flavia Zattar Piazeria

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 65194222.3.0000.8101

**Instituição Proponente:** ISMEP - INSTITUTO SANTA MARTA DE ENSINO E PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.769.882

#### Apresentação do Projeto:

**RELATO DE CASO E REVISÃO DA LITERATURA: ARTRITE SÉPTICA POR INFECÇÃO POR CITOMEGALOVÍRUS APÓS TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HAPLOIDÊNTICAS HEMATOPOIÉTICAS**

A infecção por citomegalovírus (CMV) é uma complicação grave do transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas (TCTH). Pode ter vários efeitos agudos ou tardios nos órgãos, e os pacientes com infecção por CMV pós-TCTH apresentam alto risco de mortalidade. Descrevemos um caso de artrite séptica secundária ao TCTH. O paciente era um homem branco de 41 anos com leucemia linfoblástica aguda com cromossomo Filadélfia positivo e uma mutação p190 BCR-ABL. Como terapia de indução, ele recebeu o esquema Berlin-Frankfurt-Münster mais imatinibe, após o qual a doença residual mínima foi negativa e o mRNA de BCR-ABL não foi detectado. Ele foi submetido a HSCT haploidêntico; terapia de condicionamento com fludarabina, ciclofosfamida e irradiação corporal total; e imunoprofilaxia com ciclosporina, micofenolato e ciclofosfamida. Posteriormente, apresentou artrite séptica, confirmada radiologicamente, sendo detectado CMV no líquido sinovial e no soro via reação em cadeia da polimerase. O paciente foi tratado com sucesso com ganciclovir, mas apresentou vários efeitos adversos associados à toxicidade e interações medicamentosas.

**Endereço:** QSE AE 9 Setor E Sul

**Bairro:** TAGUATINGA SUL (TAGUATINGA)

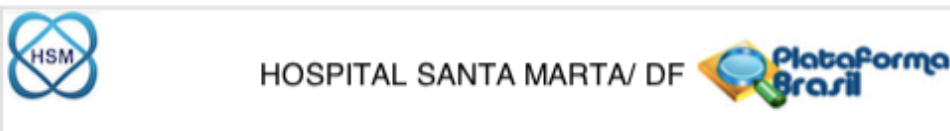
**UF:** DF **Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3932-6434

**CEP:** 72.025-090

**E-mail:** cep@ismep.com.br

## 9.2 PARECER DO COMITE DE ÉTICA (PROTOCOLO 5.769.885)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Identification of a new HLA-A\*33 allele by Next Generation Sequencing (NGS) technology in a bone marrow donor.

**Pesquisador:** Flavia Zattar Piazeria

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 65197022.9.0000.8101

**Instituição Proponente:** ISMEP - INSTITUTO SANTA MARTA DE ENSINO E PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.769.885

#### Apresentação do Projeto:

Identificação de um novo alelo HLA-A\*33 pela tecnologia Next Generation Sequencing (NGS) em um doador de medula óssea

Os genes HLA codificam proteínas de superfície que reconhecem os próprios antígenos de um indivíduo e os distinguem dos antígenos provenientes de fontes estranhas. O sistema HLA está localizado no braço curto do cromossomo 6, mais especificamente em 6p21. Os genes HLA são altamente polimórficos, o que explica a alta especificidade do sistema imune. O desenvolvimento de novas metodologias na área de biologia molecular permitiu uma melhor identificação do polimorfismo HLA, resultando em ótima resolução para tipagem HLA. Isso trouxe muitas melhorias nos protocolos terapêuticos e na seleção de doadores para pacientes candidatos para um órgão sólido ou transplante de células-tronco hematopoiéticas. O Registro Nacional de Doadores de Medula Óssea do Brasil tem sido uma ferramenta de grande valia na busca de doadores. Assim, a descoberta de alelos não descritos em bancos internacionais e a presença de haplótipos descritos como raros devido às baixas frequências em bancos europeus e americanos, são condições comuns na realidade do perfil imunogenético brasileiro. A implantação de técnicas de NGS juntamente com ferramentas de bioinformática proporcionaram um aumento na precisão da genotipagem e comprimento de leitura para obtenção sequências completas de haplótipos HLA. O novo alelo A\*33 tem a correspondência mais próxima com HLA-A\*33:03:01:01, exceto por uma incompatibilidade na posição 270 no Exon 2. No caso avaliado, em vez do T esperado, um A foi

**Endereço:** QSE AE 3 Setor E Sul  
**Bairro:** TAGUATINGA SUL (TAGUATINGA) **CEP:** 72.025-090  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA

### 9.3 PARECER DO COMITE DE ÉTICA (PROTOCOLO 5.812.697)



HOSPITAL SANTA MARTA/ DF



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE RETROSPECTIVA DOS PACIENTES ONCO-HEMATOLOGICOS ATENDIDOS E SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS TRONCO HEMATOPOIÉTICAS & TCTH NUMA INSITUIÇÃO PRIVADA BRASILEIRA: SERIE

**Pesquisador:** Flavia Zattar Plazera

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 65677022.5.0000.8101

**Instituição Proponente:** ISMEP - INSTITUTO SANTA MARTA DE ENSINO E PESQUISA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.812.697

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo descritivo e comparativo, experimental não pareado, retrospectivo, envolvendo registro médico de pacientes com as neoplasias hematológicas mais comuns, submetidos a transplante de células hematopoiéticas progenitoras na instituição CETTRO/ICB/Oncologia Santa Marta/Oncoclinicas.

##### Objetivo da Pesquisa:

Este estudo se propõe retrospectivamente os pacientes atendidos e submetidos ao TCTH(Transplante de célula Tronco Hematopoiética) num serviço privado de assistência médica em Brasília-DF num período histórico. É uma pesquisa retrospectiva, quantitativa, em que as informações serão obtidas através de revisão de prontuário eletrônico. Os dados obtidos serão analisados estatisticamente através gráficos e tabelas e testes estatísticos:

Serão Analisados:

- Perfil epidemiológico, nutricional, status da doença de base, linhas previas de quimioterapia.
- Grau de stress dos pacientes submetidos ao TCTH.
- Padrão nutricional dos pacientes oncohematologicos submetidos ao TCTH.
- Modalidade de TCTH submetidos: alogênico, autólogo ou heploidentico.
- Complicações infecciosas e imunológicas dos pacientes.
- Tempo de internação dos pacientes durante TCTH.

**Endereço:** QSE AE 3 Setor Sul, Prédio ISMEP

**Bairro:** TAGUATINGA SUL (TAGUATINGA)

**CEP:** 72.025-090

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61) 3333.3333

**E-mail:** cep@hsm.com.br

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

Convidamos o(a) Senhor(a) a participar voluntariamente do trabalho Cutaneous involvement in multiple myeloma in the era of the proteasome inhibitors why the unfavorable outcome did not change, sob a responsabilidade do pesquisador FLAVIA ZATTAR PIAZERA. O trabalho é modalidade de relato de caso.

O objetivo deste trabalho é **ANÁLISE RETROSPECTIVA DOS PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA ATENDIDOS NUM SERVIÇO PRIVADO DE ONCOLOGIA DE BRASÍLIA, incluindo parâmetros clínicos, epidemiológicos e imunitários**. O(a) senhor(a) receberá todos os esclarecimentos necessários e lhe asseguramos que seu nome não aparecerá, sendo mantido o mais rigoroso sigilo pela omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

A sua participação se dará por meio de *autorização liberação de 1ml da amostra criopreservada das células tronco hematopoéticas que foram destinadas para doação, tal alíquota será destinada para verificação de identificação de viabilidade celular, análise de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio bem como potencial de diferenciação em malha de fibrina leucopaguetaria, além da revisão dos dados clínicos e bioquímicos contidos no seu registro médico*.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são a exposição acidental de sua identidade. Esse risco será minimizado ocultando sua identificação (seu nome e/ou iniciais não serão divulgados) e ocultando sua face ou cobrindo seus olhos nas imagens que serão divulgadas. Se o(a) senhor(a) aceitar participar, estará contribuindo para aumentar o conhecimento dos profissionais sobre o tema, o que poderá beneficiar outras pessoas que apresentarem casos semelhantes ao seu.

O(a) Senhor(a) pode recusar que seus dados de tratamento sejam utilizados sem nenhum prejuízo para o(a) senhor(a). Sua participação é voluntária, isto é, não há pagamento por sua colaboração.

Uma vez que o tratamento já está concluído, também não haverá gastos associados ao mesmo. Mas se houver gastos, esses são de nossa responsabilidade.

Caso haja algum dano direto ou indireto decorrente de sua participação no trabalho, o(a) senhor(a) deverá buscar ser indenizado, obedecendo-se as disposições legais vigentes no Brasil.

Os resultados do trabalho serão divulgados na *revista científica especializada* podendo ser publicados posteriormente. Os dados e materiais originais serão utilizados somente para esta pesquisa e ficarão sob a guarda do pesquisador por um período de cinco anos, após isso serão destruídos.

Se o(a) Senhor(a) tiver qualquer dúvida em relação ao trabalho, por favor telefone para: **DRA FLAVIA ZATTAR PIAZERA, na CLÍNICA CETTRO no telefone 61-992235559 OU EMAIL [fpiazera@terra.com.br](mailto:fpiazera@terra.com.br)**, disponível inclusive para ligação a cobrar.

Caso concorde em participar, pedimos que assine este documento que foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o(a) Senhor(a).

---

Nome e assinatura do Participante de Pesquisa

---

Nome e assinatura do Pesquisador Responsável

## The Cutaneous Involvement of Multiple Myeloma as an Indicator of Unfavorable Evolution: Series of Three Cases

Flavia Zattar Piazeria<sup>1\*</sup>, Rafael de Sa Vasconcelos<sup>2</sup>, Marcelo Jorge Carneiro<sup>2</sup>, Alexandre Nonino<sup>2</sup>, Jorge Vaz Pinto Neto<sup>2</sup>, Luiz Henrique Ramos Athaides<sup>2</sup> and Selma Kuckelhaus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Medicine, University of Brasilia (UNB), Brasilia, District Federal, Brazil

<sup>2</sup>CETTRO/Oncoclinics Center of Treatment of Cancer, Brasilia, District Federal, Brazil

### Abstract

Cutaneous myeloma, a rare clinical presentation of multiple myeloma, is usually associated with high burden of malignant cells and poor prognosis. Three cases who were diagnosed with multiple myeloma and exhibited cutaneous involvement with a wide range of clinical manifestations. We emphasize the morphologic and immunohistochemical patterns of this rare presentation. The use of new therapies associated double or triple regimens in the treatment of myeloma showed significant improvements in progression-free survival, but relapse with cutanea infiltration suggests a pattern of aggressiveness that is still unclear and generally refractory to conventional therapies. The pathophysiology and the findings and markers that might be associated with prognosis based on the review of recent literature.

**Keywords:** Multiple myeloma • Cutaneous infiltration • Extra medullary myeloma

### Introduction

Multiple myeloma (MM) is a hematologic malignancy characterized by the uncontrolled proliferation of plasma cells in the bone marrow and the subsequent overabundance of monoclonal paraproteins. Extramedullary involvement in MM (EEMM) is an uncommon presentation, with an estimated incidence ranging from 6% to 7.5% in recent studies [1].

EEMM is defined as the infiltration of clonal plasmacytic cells at sites that are anatomically distant from the bone marrow and the adjacent soft tissues in patients with MM. Unlike the clonal plasmacytic infiltration observed in the local invasion of structures adjacent to the bone marrow, EEMM exhibits a more immature and plasmablastic cell profile, which underlies its aggressive clinical behavior and poorer prognosis [2-5].

Cutaneous involvement, which is a particularly rare manifestation of EEMM, occurs in 1% to 4% and usually presents as a late complication in patients treated with several therapeutic regimens. Cutaneous involvement is also observed as a late-stage presentation in patients with extensive tumor burden (bone marrow plasmacytosis > 60%), high International Staging System (ISS) scores, and poor prognosis at the time of diagnosis according to the cytogenetic evaluation [3]. The definitive diagnosis of cutaneous infiltration is based on the histopathological examination of skin lesions in patients with a previous diagnosis of MM [4-7].

Although significant advances and new therapeutic approaches have changed the outlook of MM, mainly due to the implementation of new therapies in this patients with cutaneous manifestations still experience

Proteasome inhibitors of first and second generation, monoclonal antibody and lenalidomide have represented a breakthrough in the treatment of MM, providing longer survival. Nevertheless, in our experience, the use of these new drugs has not translated into additional survival benefit, underscoring the role of skin involvement as a poor prognostic factor [6,8,10].

In this report, we present three cases of MM with cutaneous involvement which followed a fatal disease course despite the use of new therapies in the triple drugs protocols. To the best of our knowledge, this is the first case series of patients with MM who developed cutaneous involvement despite treatment with proteasome inhibitors and new treatment to the myeloma: anti-CD38, lenalidomide and thalidomide.

### Case Series

#### Case 1

SFO, a 55-year black male patient was diagnosed with symptomatic MM based on an serum immunoglobulin (Ig) G kappa chain protein level of 5.8 g/dL and had Durie-Salmon stage III A disease (lytic lesions on lumbosacral spine), cytogenetic with 13q deletion and an ISS score of 3 (albumin, 2.5 g/dL; B2-microglobulin, 4.7 g/dL) at presentation. Complete response (CR) according to the International Working Myeloma Foundation (IWMMF) was achieved with four cycles of treatment with cyclophosphamide, dexamethasone, and bortezomib. Subsequently, the patient underwent hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) with the infusion of 12



## Identification and Description Case Report of a New *HLA-A\*33* Allele by Next Generation Sequencing Technology in a Brazilian Bone Marrow Donor

Flavia Zaitter Piazzera<sup>1</sup>, Marcelo Mion<sup>2</sup>, Guilherme Augusto Costa Damasio<sup>2</sup>, Cynthia Ellen Toyoshima Greenfield<sup>2</sup>, Rafael de Sá Vasconcelos<sup>3</sup>, Jorge Vaz Pinto Neto<sup>3</sup> and Selma Aparecida Kuckelhaus<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Morphology, University of Brasilia (UnB)-Brasilia, Federal District, Brazil

<sup>2</sup>Xmol - Training and Support Center in Molecular Biology- Curitiba, Paraná, Brazil

<sup>3</sup>CETTRO/Oncoclinicas - Center Of Cancer of Brasilia- Brasilia- Federal District, Brazil

### Abstract

New A\*33 allele has the closest match with HLA-A\*33:03:01:01, except for a mismatch at position 270 in Exon 2. Instead of the expected T, an A was detected at this position. This information was included in the full Nomenclature report and contributed to the immunogenetic study.

**Keywords:** HLA-A\*33 • New allele • Next-Generation Sequencing (NGS) technology

### Introduction

HLA genes encode surface proteins that recognize an individual's own antigens and distinguish them from antigens coming from foreign sources. HLA system is located on the short arm of chromosome 6, more specifically at 6p21 [1]. HLA genes are highly polymorphic, which explains the high specificity of the immune system. Development of new methodologies in molecular biology field allowed better identification of HLA polymorphism, resulting in great resolution for HLA typing. This has brought many improvements in therapeutic protocols and donor selection for patients candidates for a solid organ or Hematopoietic Stem Cells transplantation [2]. The implantation of NGS techniques along with bioinformatics tools provided an increase genotyping accuracy and reading length for obtaining complete sequences of HLA haplotypes [1,3].

### Objective

Here we describe a novel HLA-A allele identified in a male donor of African ancestry common in Brazilian Mestizo population.

### Results and Follow up

Initially, genomic DNA was isolated from peripheral blood using

BIOPUR kit and HLA typing was performed using LABType® SSOP Kits (One Lambda, Canoga Park, CA). The donor genotype assignment was no match HLA-A; HLA-B\*08 HLA-B\*44 and HLA-DRB1\*1, HLA-DRB1\*13. In order to corroborate the results and to obtain a higher resolution in HLA genotyping, we first performed new genomic DNA isolation by salting-out method and the same result was achieved. The results were sequencing by NGS using AllType™ NGS Assay Kit (One Lambda - Thermo Fisher, Canoga Park, CA) on Ion platform (Ion Chef and Ion S5) at Xmol laboratory - Training and Support Center in Molecular Biology (Paraná, Brazil). The results were sequencing by software TypeStream Visual (TSV), version 1.1, catalog ALL-111X\_002\_03, as well as document showing details of the analysis (Figure 1). NGS Custom Report presents the typing for 11 analyzed loci: HLA-A\*02:01:01, A\*33 (possible new); HLA-B\*08:01:01, B\*44:02:01; HLA-C\*07:01:01, C\*07:04:01; HLA-DRB1\*01:01:01, DRB1\*13:01:01; HLA-DRB3\*01:01:02; HLA-DQA1\*01:01, DQA1\*01:03:01; HLA-DQB1\*05:01, DQB1\*06:03:01; HLA-DPA1\*01:03:01, DPA1\*01:03:01; HLA-DPB1\*03:01:01, DPB1\*04:01:01. The identification of a new allele HLA-A\*33 shows a mutation in Exon 2 (codon 66.3), thus being at the recognition site. The allele that most resembles is A\*33:03:01:01, but instead of the expected T the consensus was an A. There was an amino acid change as well from Asparagine (Asn) to Lysine (Lys) (Figure 2). IMGT/HLA Database reference sequence confirms a mismatch in HLA-A\*33:03:01:01 by a substitution of a T for an A at Exon 2 (Figure 2). The nucleotide sequence is available at GenBank accession number MK643128, IPD-IMGT/HLA Database submission HWS10054309 and the name A\*33:183 has been officially assigned by World Health Organization (WHO) Nomenclature Committee in March 2019. This follows the agreed policy that, subject to the conditions stated in the most recent nomenclature report, names will be assigned to new sequences as they are identified. Lists of the new allele names were published in the following WHO nomenclature report [4].

\*Address for Correspondence: Flavia Zaitter Piazzera, Department of Morphology, University of Brasilia (UnB)-Brasilia, Federal District, Brazil, E-mail: [piazzera@tema.com.br](mailto:piazzera@tema.com.br)

Copyright: © 2023 Piazzera FZ, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Received: 24 February, 2023; Manuscript No. jmgm-23-90084; Editor Assigned: 25 February, 2023; PreQC No. P-90084; Reviewed: 10 March, 2023; QC No. Q-90084; Revised: 15 March, 2023; Manuscript No. R-90084; Published: 22 March, 2023; DOI: [10.37421/1747-0862.2023.17.597](https://doi.org/10.37421/1747-0862.2023.17.597)