

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

“Caracterização molecular e funcional de células-tronco de pluripotência induzida
(iPS)”

Isabela Gerdes Gyuricza

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Ribeirão Preto – SP

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

“Caracterização molecular e funcional de células-tronco de pluripotência induzida
(iPS)”

Isabela Gerdes Gyuricza

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Nome do orientador(a): Profa. Dra. Simone Kashima Haddad

Nome do co-orientador(a): Dra. Tathiane Maistro Malta

Ribeirão Preto – SP

2015

PARECER

O trabalho de Conclusão de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas que se intitula “Caracterização molecular e funcional de células-tronco de pluripotência induzida (iPS)”.

A aluna obteve a nota () com distinção e louvor.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 201__ .

Prof. Dr. _____

Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora **Profa. Dra. Simone Kashima Haddad**, agradeço pelo suporte e pela confiança que sempre depositou em mim.

À minha co-orientadora **Dra. Tathiane Maistro Malta**, por todo o apoio, amizade e aprendizado científico e profissional que me proporcionou.

Ao **Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas**, pela oportunidade de iniciar minha carreira científica no Hemocentro de Ribeirão Preto.

A todas as funcionárias do **Laboratório de Terapia Celular** e à **Dra. Maristela Delgado Orellana**, que se mostraram sempre dispostas a ajudar e possibilitaram o cultivo das células utilizadas neste trabalho.

À todas as funcionárias do **Laboratório de Citometria de Fluxo** e à **Patrícia V. Bonini de Palma**, que auxiliaram com os ensaios de imunofenotipagem.

Ao **Laboratório de Transferência Gênica**, principalmente ao **Lucas Eduardo Botelho de Souza** por estar sempre disposto a discutir e me auxiliar, principalmente na manipulação dos animais.

Ao **Laboratório de Estudos Experimentais em Animais (LEEA)**, principalmente à **Cleide Lúcia Araújo Silva**, por me receber no laboratório e sempre me orientar e auxiliar nos experimentos.

Ao **Laboratório de Biotecnologia**, principalmente à **Dra. Virginia Picanço e Castro** e à **Luiza Cunha Junqueira Reis**, por me orientar na manipulação das células e auxiliar nos experimentos de diferenciação.

À **Flávia Sacilotto Donaires**, do Laboratório de Hematologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pelo fornecimento do protocolo de diferenciação *in vitro* e por sua disponibilidade em ajudar sempre que preciso.

Ao **Laboratório de Imunofluorescência**, em especial a **Dra. Danielle Aparecida Rosa de Magalhães** e **Josiane Serrano**, pela disponibilidade a ajudar nos experimentos.

Ao **Laboratório de Patologia** do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, em especial ao **Prof. Dr. Luciano Neder**, pelo auxílio com as marcações e análises de imunohistoquímica.

Agradeço imensamente a todos os pesquisadores e funcionários do **Laboratório de Biologia Molecular**: Alexander R. Ferreira, Aline F. Ferreira, Aline Romagnoli, Daiane F. dos Santos, Evandra S. Rodrigues, Fernanda U. F. Melo, Katia K. Otaguiri, Lucas Catelli, Maurício C. R. Junior, Mariana T. Pinto, Mayra D. Macedo, Péricles N. M. da Costa, Suellen Salustiano, Svetoslav N. Slavov, Talitha B. Cuter e Virginia M. D. Wagatsuma. Obrigada por toda a amizade, carinho e por fazer dos meus dias de trabalho sempre divertidos. Obrigada, ainda, por estarem ao meu lado durante toda a iniciação científica, sempre dispostos a me ajudar e ensinar.

Agradeço, ainda, a todos os pesquisadores e funcionários do **Hemocentro de Ribeirão Preto**, pelo auxílio e serviços prestados que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

Agradeço à agência de fomento **FAPESP** (Processo 2013/06841-7) pela confiança e suporte financeiro durante estes dois anos e meio, tornando possível o meu crescimento científico e profissional durante a realização deste projeto.

Agradeço, principalmente, aos **meus pais**. Sem vocês nunca teria chegado até aqui! Obrigada por sempre acreditarem em mim, por apoiarem minhas decisões e por sempre estarem dispostos a me ajudar e a me orientar. Por estarem sempre ao meu lado, mesmo distante. Agradeço às **minhas irmãs**, por toda amizade e carinho, e até mesmo pelas brigas, que sempre acabam na risada. Vocês são as melhores irmãs que alguém pode ter! Agradeço a todos da **minha família**, sem exceção! Minhas tias, tios, primos, avós e cunhados, por sempre me apoiarem e torcerem por mim.

Agradeço, ainda, à minha **família por escolha**, meus amigos e amigas que fizeram dos meus anos de faculdade os melhores! Amigos que vou levar pelo resto da vida! Obrigada por tudo! Agradeço ainda, ao meu namorado **Rodrigo Hakime**, tenho tanto a agradecer que nem sei como. Simplesmente, obrigada por estar ao meu lado todos esses anos, fazendo aqueles momentos ruins tornarem-se bons! Obrigada por sempre me apoiar, me escutar e por me fazer feliz.

Gostaria ainda, de fazer um agradecimento especial à **Tathiane Maistro Malta**, dessa vez como amiga. Obrigada por todo o apoio e companheirismo. Obrigada por continuar presente mesmo quando a vida profissional nos afastou. Tenho orgulho de ser sua “cria” e, principalmente, sua amiga. Obrigada!

EPÍGRAFE

**“Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, é primitiva e infantil,
e, no entanto, é a coisa mais preciosa que temos”.**

Albert Einstein

RESUMO

Gyuricza, I.G. **Caracterização molecular e funcional de células-tronco de pluripotência induzida (iPS)**. 2015. Monografia. Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP – 2015.

A descrição das células-tronco de pluripotência induzida (iPS) representou um grande avanço na medicina regenerativa e terapia celular, apresentando-se como uma alternativa ao uso das células-tronco embrionárias humanas (hCTE). O objetivo deste trabalho foi caracterizar as linhagens de iPS geradas em nosso laboratório no período de janeiro de 2013 a julho de 2015. Destas linhagens, uma foi modificada com os genes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* e *c-MYC*, a qual recebeu o nome de iPS_BM_03, cujos clones estudados foram: Clone 03 (iPS_CI_03), Clone 04 (iPS_CI_04), Clone 08 (iPS_CI_08) e Clone 11 (iPS_CI_11). Outras duas linhagens foram modificadas com o gene *TCL1*: BJ_TCL1 e CCD_TCL1. As iPS_CI_11, BJ_TCL1 e CCD_TCL1 foram analisadas quanto à expressão dos genes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *KLF4* e *c-MYC* por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). As linhagens apresentaram alta expressão dos genes de pluripotência quando comparadas a células diferenciadas (fibroblastos). Foi realizada a imunofenotipagem das células iPS_CI_11, iPS_CI_08, BJ_TCL1 e CCD_TCL1 para marcadores de pluripotência intracelulares (como OCT4 e NANOG) e de superfície (SSEA-4). As células foram positivas para todos os marcadores intracelulares, com exceção das linhagens BJ_TCL1 e CCD_TCL1 que não apresentaram marcação de OCT4. Além disso, não houve marcação significativa de SSEA-4 para nenhuma das linhagens. Para a análise do potencial de diferenciação das linhagens em células dos três folhetos embrionários foi realizado o ensaio de formação de corpos embrioides (CE) com os clones iPS_CI_03 e iPS_CI_04. Ambas as linhagens avaliadas demonstraram formação de CE. Os CE da iPS_CI_03 foram analisados por imunofluorescência e demonstraram expressão de marcadores dos três folhetos embrionários. As células iPS_CI_08, iPS_CI_11, BJ_TCL1 e CCD_TCL1 foram submetidas ao ensaio de diferenciação *in vivo* (formação de teratoma). Neste ensaio, foram obtidos tumores apenas de BJ_TCL1, os quais foram extraídos, processados histologicamente, corados com hematoxilina-eosina (H&E) e analisados por imunohistoquímica. As análises evidenciaram características malignas. Com base nestes resultados foi possível verificar a heterogeneidade das

linhagens quanto às características moleculares e funcionais. Neste contexto, torna-se evidente a necessidade da completa caracterização das linhagens reprogramadas, por meio de diferentes metodologias, reforçando a importância da realização de ensaios *in vivo*.

Palavras-chave: Células-tronco embrionárias (CTE), células-tronco de pluripotência induzida (iPS), pluripotência, expressão gênica, imunofenotipagem, corpos embrioides, teratoma.

ABSTRACT

Gyuricza, I.G. **Molecular and functional characterization of induced pluripotent stem cells (iPS)**. 2015. Bachelor Thesis. Biology department of Ribeirão Preto College of Philosophy, Sciences and Literature, University of São Paulo, Ribeirão Preto – SP – 2015.

The description of induced pluripotent stem cells (iPS) represented a huge progress for regenerative medicine and cellular therapy, showing up as an alternative to human embryonic stem cells (hESC). The aim of this study was to characterize iPS lineages generated at our laboratory in the period of January 2013 until July 2015. Among these lineages, one was modified by transduction of *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC* genes (iPS_BM_03), whose clones studied were Clone 03 (iPS_Cl_03), Clone 04 (iPS_Cl_04), Clone 08 (iPS_Cl_08) and Clone 11 (iPS_Cl_11). Two lineages were modified by *TCL1* gene transduction: BJ_TCL1 and CCD_TCL1. The iPS_Cl_11 and BJ_TCL1 cells were analyzed for *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *KLF4* and *c-MYC* genes expression by real time quantitative PCR (qPCR). The cells showed high expression of pluripotent genes when compared to differentiated cells (fibroblasts). The lineages iPS_Cl_11, iPS_Cl_08, BJ_TCL1 and CCD_TCL1 cells were evaluated for pluripotency intracellular markers (as OCT4 and NANOG) and surface markers (SSEA-4) by flow cytometry. Cells were positive for all the intracellular markers, excepted BJ_TCL1 and CCD_TCL1 cells, which do not showed OCT4 expression. Moreover, none cells showed significant expression of SSEA-4. Embryoids bodies (EB) assay was performed for iPS_Cl_03 and iPS_Cl_04 to evaluate the differentiation potential into three embryonic layers. Both clones showed EB formation. EBs from iPS_Cl_03 were analyzed by immunofluorescence and were positive for all three embryonic layers markers. iPS_Cl_08, iPS_Cl_11, BJ_TCL1 and CCD_TCL1 cells were submitted to *in vivo* differentiation assay (teratoma formation). In this assay, only BJ_TCL1 tumors were observed, which were removed, processed and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for optical microscopy analysis. In addition, an immunohistochemistry were made. The analysis showed malignant characteristics. These results showed the heterogeneity of the cells types studied, at molecular and functional ambits. In this context, it is clear the need of a complete characterization of reprogrammed lineages by different methods, highlighting the value of *in vivo* assays.

Key-words: Embryonic stem cells (ESC), induced pluripotency stem cells (iPS), pluripotency, gene expression, immunophenotyping, embryoids bodies, teratoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de experimentos realizados e linhagens utilizadas.....	9
Figura 2 – Morfologia das linhagens estudadas.....	23
Figura 3 – Quantificação da expressão gênica por qPCR do clone iPS_Cl_11.....	26
Figura 4 – Quantificação da expressão gênica por qPCR das linhagens BJ_TCL1 e CCD_TCL1.....	25
Figura 5 – Imunofenotipagem por citometria de fluxo das linhagens BJ_TCL1, CCD_TCL1 e dos clones iPS_Cl_08 e iPS_Cl_11.....	28
Figura 6 – Esquema representando a atuação de NANOG na reprogramação.....	29
Figura 7 - Morfologia dos corpos embrioides obtidos dos clones iPS_Cl_03 e iPS_Cl_04.....	30
Figura 8 – Esquema representando a marcação por imunofluorescência da linhagem hCTE H1.....	31
Figura 9 – Imagens obtidas por microscopia confocal da marcação por imunofluorescência da linhagem hCTE H1.....	32
Figura 10 – Esquema representando a marcação por imunofluorescência do clone iPS_Cl_03.....	32
Figura 11 – Imagens obtidas por microscopia confocal da marcação por imunofluorescência do clone iPS_Cl_03.....	33
Figura 12 – Fotografias do camundongo que recebeu a injeção da linhagem BJ_TCL1.....	34
Figura 13 – Fotografia do camundongo que recebeu a injeção da linhagem hCTE H1.....	35
Figura 14 – Fotografias de cortes histológicos obtidos dos tumores BJ_TCL1 e hCTE H1.....	36
Figura 15 – Esquema representando a maquinaria molecular dos genes de pluripotência endógenos e exógenos.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μ = micro

BSA = do inglês, *bovine serum albumin* (albumina de soro bovino)

cDNA = DNA complementar

CE = corpos embrioides

Cm = centímetro

CO₂ = dióxido de carbono

Cq = do inglês, *quantification cycle* (ciclo de quantificação)

CTE = células-tronco embrionárias

DMEM = do inglês, *Dulbecco's modified eagle's médium*

DNA = do inglês, *desoxiribonucleic acid* (ácido desoxirribonucleico)

EDTA = ácido etilenodiaminoteracético

EUA = Estados Unidos da América

FLI = do inglês, *In vivo Fluorescence Imaging*

FSC = do inglês, *forward scatter*

FT = Fator de transcrição

GFP = do inglês, *green fluorescent protein* (proteína fluorescente verde)

H&E = coloração hematoxilina e eosina

hCTE = células-tronco embrionárias humanas

iPS = do inglês, *induced Pluripotent Stem Cells* (células-tronco de pluripotência induzida)

L = litro

m = mili

M = molar

NaCl = cloreto de sódio

Nm = nanômetro

PBS = do inglês, *fosfate buffered saline* (tampão salina fosfato tamponado)

qPCR = PCR quantitativo em tempo real

RNA = do inglês, *ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

SBF = soro fetal bovino

SSC = do inglês, *side scatter*

TA = temperatura ambiente

NOTA SOBRE A NOMENCLATURA DE GENES

Neste trabalho, os nomes dos genes foram mantidos em inglês, de acordo com a nomenclatura de *Human Genome Organization* (HUGO). Foram adotadas as regras para grafia como indicado por Splendore (2005). Gene humano: letras maiúsculas e em itálico (ex: *OCT4*). Proteína humana: grafada em letras maiúsculas (ex: OCT4). Gene murinho: grafados com a primeira letra maiúscula, apenas (ex: *Oct4*).

SUMÁRIO

1. Introdução.....	2
1.2. Células-tronco embrionárias (CTE).....	2
1.3. Células-tronco pluripotentes induzida (iPS).....	3
1.4. Regulação molecular da pluripotência.....	4
1.5. Testes de pluripotência.....	5
2. Objetivos.....	7
2.1. Objetivo Geral.....	7
2.2. Objetivos Específicos.....	7
3. Material e Métodos.....	9
3.1. Casuística.....	9
3.2. Linhagens celulares.....	9
3.3. Cultivo e expansão das células.....	10
3.4. Análise da expressão gênica por qPCR Real Time.....	11
3.4.1. Extração do RNA total.....	12
3.4.2. Quantificação do RNA total.....	12
3.4.3. Integridade do RNA.....	13
3.4.4. Transcrição reversa.....	13
3.4.5. PCR quantitativo em Tempo Real.....	13
3.5. Imunofenotipagem.....	14
3.5.1. Preparo das células.....	14
3.5.2. Marcação das células.....	14
3.6. Ensaio de formação de corpos embrioides.....	16
3.6.1. Formação dos corpos embrioides.....	16
3.6.2. Plaqueamento dos corpos embrioides.....	16
3.6.3. Análise dos corpos embrioides por imunofluorescência.....	17
3.7. Ensaio de formação de teratoma.....	18
3.7.1. Tratamento dos animais.....	18
3.7.2. Preparo das células.....	19
3.7.3. Injeção das células.....	19
3.7.4. Manutenção e observação dos animais.....	20
3.7.5. Análise e processamento dos tumores.....	20

4. Resultado e Discussão.....	23
4.1. Cultivo e expansão das células.....	23
4.2. Análise da expressão gênica por qPCR Real Time.....	25
4.3. Imunofenotipagem.....	28
4.4. Ensaio de formação de corpos embrioides.....	29
4.4.1. Formação e adesão dos corpos embrioides.....	30
4.4.2. Análise dos corpos embrioides por imunofluorescência.....	31
4.5. Ensaio de formação de teratoma.....	33
4.5.1. Análise e extração do teratoma.....	33
6. Conclusão.....	40
7. Referências bibliográficas.....	42
8. Anexos.....	47

Introdução

1. Introdução

1.1. Células-tronco embrionárias

As células-tronco embrionárias (CTE) tem origem de embriões mamíferos em estágio de blastocisto. Retiradas da massa celular interna, tais células, ainda não diferenciadas, podem dar origem a todos os tecidos do indivíduo adulto, e assim, podem ser mantidas em cultura, estabelecendo uma linhagem de células pluripotentes (ZAGO & COVAS, 2006).

As células embrionárias apresentam características específicas que as caracterizam como células-tronco pluripotentes, tais como proliferação prolongada, capacidade de autorrenovação, capacidade de diferenciação clonal nas três linhagens germinativas (ectoderme, mesoderme e endoderme) e a presença de marcadores específicos associados ao estado altamente indiferenciado, como, por exemplo, OCT-4 e NANOG (IVANOVA et al., 2003).

As primeiras linhagens de CTE estudadas foram provenientes de camundongos, estabelecidas em 1981 por Martin e cols. (MARTIN et al., 1981). Após dezessete anos, Thomson e cols. (THOMSON et al., 1998) descreveram as primeiras CTE humanas (hCTE). O interesse nas CTE consiste em sua pluripotência, ou seja, na capacidade de originar todos os tipos de células somáticas e germinativas, diferentemente das células-tronco adultas da medula óssea e do cordão umbilical, por exemplo. Essa pluripotência pode ser usada como terapias para doenças crônico-degenerativas, como a Doença de Parkinson, lesões da coluna espinhal e diabetes, bem como no descobrimento de novas drogas. Este fato foi uma grande conquista para a terapia celular, inaugurando a possibilidade de substituir células deficientes de qualquer tecido adulto por células “novas”, originadas das CTE.

Há, porém, algumas barreiras que impedem a utilização das CTE na medicina, como a questão ética que envolve a retirada destas células de embriões humanos, com consequente destruição dos mesmos, a instabilidade cromossômica a que as células estão submetidas depois de um longo tempo em cultura (DRAPER et al., 2004; COWAN et al., 2004), a presença de contaminações derivadas de produtos de origem animal utilizados nos cultivos destas células (MARTIN et al., 2005), a ausência de um protocolo para diferenciação específica das células *in vitro* e o possível desenvolvimento de resposta imunológica do organismo tratado, acarretando rejeição das células.

1.2. Células-tronco de pluripotência induzida (iPS)

No ano de 2006, foi descrita a reprogramação de uma célula somática (fibroblasto) de camundongo à pluripotência através da introdução de quatro fatores de transcrição (OCT4, KLF4, SOX2 e c-MYC) veiculados por um retrovírus, a qual recebeu o nome de células-tronco pluripotentes induzidas (*induced Pluripotent Stem Cells*, ou *iPS*) (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006).

Esse método possibilitou a transposição de barreiras, pelas quais o uso das CTE humanas restringe-se, visto que ele consiste na geração de células pluripotentes sem a necessidade de um embrião ou de transferências nucleares de células somáticas, contornando questões éticas e evitando uma possível reação imunológica do organismo, no caso da utilização terapêutica (BELLIN et al., 2012).

As linhagens demonstraram características em comum com as CTE, como o fato de possuírem capacidade de autorrenovação; de diferenciação em qualquer tecido adulto; serem positivas para o teste da fosfatase alcalina; apresentarem os mesmos marcadores de membrana, como SSEA-4; possuírem expressão endógena do gene KLF4; entre outras (ZHAO & DAILEY, 2008).

Após a descrição do processo de reprogramação celular, muito grupos foram capazes de reproduzir a técnica com os mesmos fatores de transcrição, gerando uma variedade de linhagens de iPS (MAHERALI, SRIDHARAN et al., 2007; WERNIG, MEISSNER et al., 2007). Algum tempo depois, a mesma combinação de fatores de transcrição foi utilizada para a geração de células iPS a partir de fibroblastos humanos (TAKAHASHI et al., 2007; LOWRY et al., 2008). Ainda, foram surgindo ao longo do tempo diferentes estudos com o objetivo de descobrir novas combinações de fatores de transcrição que fossem capazes de gerar células iPS. No ano de 2007, foi descrita a eficiência da combinação *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* e *Lin28* na reprogramação de células somáticas (Yu et al., 2007). Atualmente, a reprogramação celular já foi realizada com células provenientes de diferentes espécies e também já foram estabelecidos diferentes protocolos, que utilizam diferentes formas de indução, tais como vírus não-integrativos a proteínas, de vetores episomais e microRNAs (GONZÁLEZ F, 2011).

Apesar dos avanços, existem vários desafios com relação a reprogramação de células somáticas à iPS que impedem sua utilização clínica, tais como: i) a baixa eficiência do processo (cerca de 0,1% utilizando-se retrovírus), ii) surgimento de

colônias que, apesar de morfológicamente semelhantes à CTE, não estão completamente reprogramadas, iii) manipulação de genes de pluripotência que também estão relacionados com a tumorigênese, podendo as células parcialmente reprogramadas terem maior inclinação à tumorigênese do que à própria pluripotência (MURARO & VERSCHURE, 2012).

Assim, torna-se essencial a geração de métodos mais eficientes na geração de células iPS, associados a protocolos de caracterização molecular e funcional com o intuito de validar a pluripotência das células geradas, garantindo a segurança do método e a possível aplicação terapêutica.

1.3. Regulação molecular da pluripotência

A capacidade da célula de se manter em um estado diferenciado ou indiferenciado baseia-se em uma rede de fatores genéticos e epigenéticos. Dentro os genes mais importantes para a manutenção do caráter pluripotente estão *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*. Estes genes mantem um mecanismo de autorregulação e são essenciais para a ativação de outros genes que induzem a pluripotência ou, até mesmo, a diferenciação (BOYER et al., 2006).

Inicialmente, uma grande quantidade de genes relacionados à fase embrionária foi testada pelo grupo do Prof. Yamanaka com o intuito de identificar aqueles essenciais para induzir a reprogramação celular. O *Tcl1*, testado nos experimentos iniciais do grupo, está entre os 88 genes cujos níveis de expressão se reduzem durante o desenvolvimento embrionário, correlacionando-se com a gradual diferenciação das células (SHAROV et al., 2003). Além disso, encontra-se hiperexpresso em CTE murinas, bem como o *Nanog*, associando-se então, com a regulação da proliferação destas células. (MITSUI et al., 2003, IVANOVA et al., 2006; MATOBA et al., 2006).

O controle da expressão da família *TCL1* é importante para a manutenção da homeostase do organismo. A baixa expressão de *TCL1* durante a fase embrionária pode causar efeitos significativos no desenvolvimento, enquanto que a alta expressão pode induzir o desenvolvimento de tumores. A expressão aberrante do gene tem sido correlacionada a leucemias de células T (NARDUCCI et al., 1997a), linfomas foliculares, linfoma de Burkitt, linfoma difuso de células B, leucemia linfocítica crônica de células B e tumores de células germinativas (TEITELL, 2005).

1.4. Testes de pluripotência

Após a geração de uma linhagem de células iPS, uma série de procedimentos é realizada para confirmar o caráter pluripotente das mesmas e diferenciá-las de outras linhagens de forma imparcial e objetiva, avaliando a eficiência do procedimento (MARTÍ et al., 2013).

1) Avaliação da expressão gênica:

As células reprogramadas podem ser avaliadas por meio do padrão de expressão dos genes de pluripotência, tais como *OCT4*, *NANOG*, *SOX2*, *C-MYC*, *KLF4*, entre outros. Esta avaliação pode ser feita por meio de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

2) Avaliação da presença de marcadores proteicos de pluripotência:

As células pluripotentes possuem uma série de marcadores de superfície, tais como SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-80 (BRIVANLOU et al., 2003; NICHOLS et al., 1998) e marcadores intracelulares tais como SOX2, OCT4 e NANOG. A avaliação destes marcadores pode ser feita por meio da imunofenotipagem por citometria de fluxo, que consiste em quantificar a expressão proteica dos marcadores por meio da reação antígeno-anticorpo.

3) Avaliação do potencial de diferenciação:

As células reprogramadas também são avaliadas de acordo com o seu potencial de diferenciação em células dos três tecidos embrionários (entoderme, mesoderme e endoderme). O ensaio pode ser realizado *in vitro*, também chamado de ensaio de formação de corpos embrioides (CE), que consiste na formação de conglomerados celulares resultantes da diferenciação espontânea do cultivo das células em suspensão. O ensaio pode ser, ainda, realizado *in vivo*, por meio da injeção das células em camundongos imunodeficientes com o intuito de se observar a formação de um tumor benigno composto dos tecidos dos três folhetos embrionários, denominado teratoma. A diferenciação celular obtida pela formação dos corpos embrioides pode ser avaliada por meio de marcação com anticorpos contra proteínas específicas de cada tecido, por exemplo, enquanto que o teratoma pode ser processado histologicamente e corado para análise morfológica das células.

Objetivos

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Caracterizar molecular e funcionalmente as iPS geradas no Hemocentro de Ribeirão Preto no período de 2013 a 2015.

2.2. Objetivos específicos

- Cultivar e expandir as linhas previamente geradas;
- Avaliar a expressão de genes de pluripotência;
- Avaliar a expressão de marcadores proteicos de pluripotência;
- Avaliar o potencial de diferenciação em células dos três folhetos embrionários.

Material e Métodos

3. Material e métodos

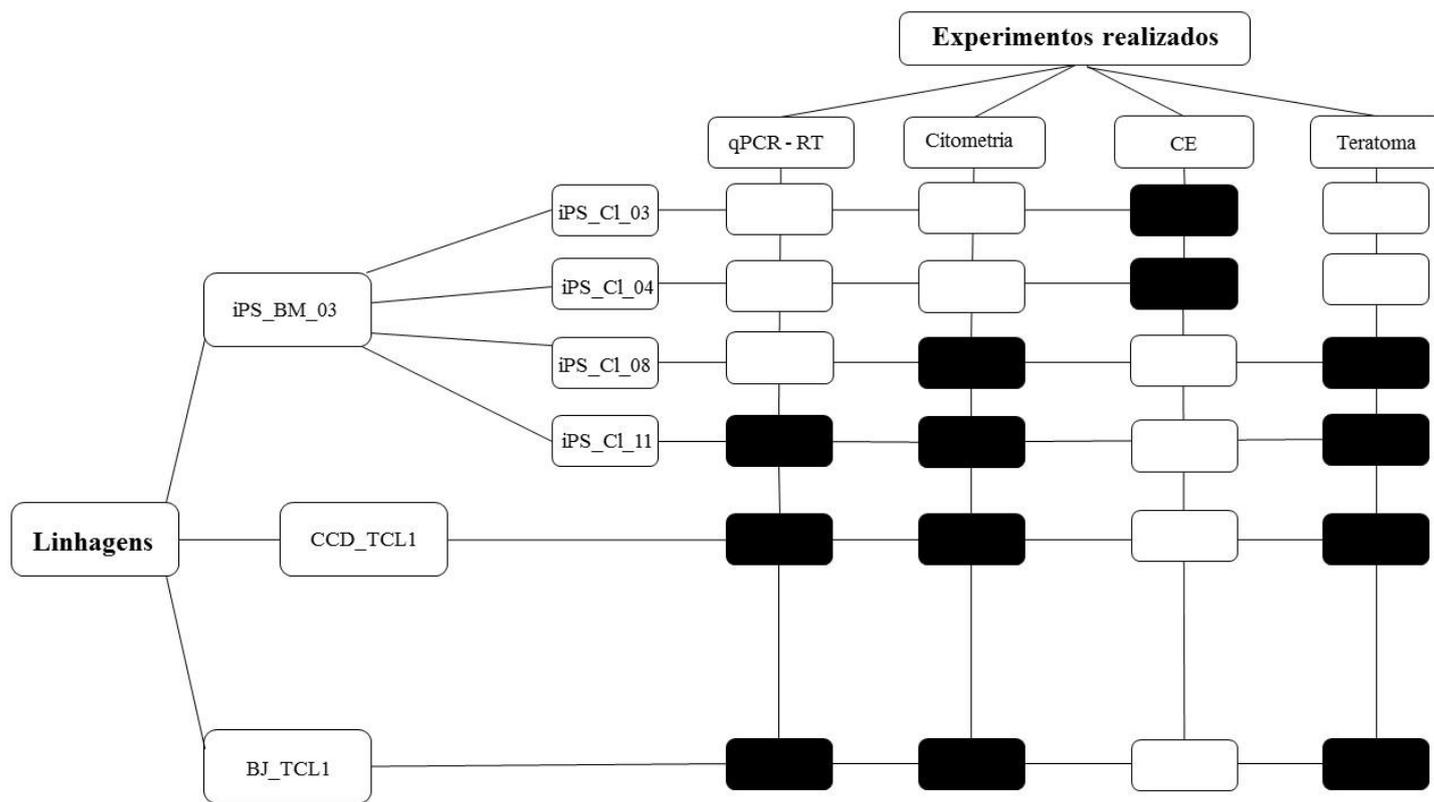


Figura 1. Esquema representando os experimentos realizados com cada tipo celular em avaliação.

□ = não realizado ■ = realizado

3.1. Casuística

As amostras utilizadas neste trabalho foram aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (Anexo 1). O presente projeto encontra-se aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do campus da USP de Ribeirão Preto (Anexo 2).

3.2. Linhas celulares

3.2.1. Linhas utilizadas como controles

Foram utilizadas como controles a) linhagem de fibroblasto humano fetal **CCD27-Sk** (ATCC, EUA), b) linhagem de fibroblasto humano de prepúcio **BJ** (Stemgent, EUA), e c) linhagem comercial **hCTE H1** (Wicell Research Institute, EUA).

3.2.2. Linhagens transduzidas

Foram estudados clones da linhagem iPS_BM_03, gerada a partir de fibroblastos primários transduzidos com os quatro fatores clássicos de Yamanaka (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* e *c-MYC*). Os clones foram: a) Clone 3 (**iPS_CI_03**), b) Clone 4 (**iPS_CI_04**), c) Clone 8 (**iPS_CI_08**) e d) Clone 11 (**iPS_CI_11**).

Foram estudadas também as seguintes linhagens de fibroblastos comerciais transduzidas com o gene *TCL1* e com o gene repórter GFP (*Green Fluorescent Protein*): a) fibroblastos CCD27-Sk transduzidos com o gene *TCL1* (**CCD_TCL1**) e b) fibroblastos BJ transduzidos com *TCL1* (**BJ_TCL1**).

3.3. Cultivo e expansão das células

Os fibroblastos CCD27-Sk e BJ foram cultivados aderidos em placas com meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) inativado pelo calor, L-glutamina (200 mM/mL), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). A expansão foi realizada por meio de métodos que utilizam a tripsina (Trypsin EDTA, Gibco, EUA), uma enzima proteolítica utilizada no repique de células aderentes. As células foram trispnizadas quando atingiram a confluência de 80-90%, para expansão das mesmas, ou quando foi necessário o plaqueamento para a realização dos experimentos. Para a tripsinização, o meio de cultivo das garrafas ou placas foi retirado e as células foram lavadas com PBS (NaCl 136,9 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,06 mM e KH₂PO₄ 1,47 mM). Em seguida, foi acrescentada a tripsina na concentração de 0,05%, incubado a 37°C por 4 minutos e na sequência, a tripsina foi inativada com meio DMEM 10% SBF (v/v). As células foram transferidas para um tubo de polipropileno e centrifugadas durante 10 minutos, a 200 x g a 4°C. A seguir, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento celular foi ressuscitado em meio DMEM para contagem e novo plaqueamento.

Todos os clones de iPS, CCD_TCL1, BJ_TCL1, bem como a linhagem hCTE H1 foram cultivados em placas de cultura revestidas com *Matrigel® hESC-qualified Matrix*

(Becton & Dickinson, EUA) e em meio mTeSR™1 (Stem Cell Technologies, EUA). Todas as células foram cultivadas em 5% de CO₂ a 37°C. Para o repique e expansão dos clones de iPS_BM_03 utilizou-se o EDTA (UltraPure™ 0.5M EDTA, pH 8.0, Life Technologies, EUA) diluído em PBS e suplementado com NaCl. Adicionou-se cerca de 2 mL de EDTA por poço (placa de 6 poços) de cada linhagem. Cerca de quatro minutos após a adição do EDTA, descartou-se o líquido e adicionou-se o meio de cultura, realizando a suspensão dos fragmentos. Os fragmentos de colônias foram diluídos para a densidade desejada e transferidos para uma nova placa para expansão ou para a realização de experimentos. O repique das linhagens CCD_TCL1 e BJ_TCL1 foi realizado mecanicamente, com o auxílio de uma ponteira estéril. As ressuspensões das colônias foram feitas em uma capela biológica de fluxo laminar horizontal contendo um microscópio invertido. Após a fragmentação, as colônias foram diluídas e transferidas para uma nova placa.

3.4. Análise da expressão gênica pelo método de qPCR Real Time

Foi realizada a análise da expressão gênica da iPS_C1_11. Como forma de comparação, foram avaliadas células em diferentes estágios de diferenciação.

Foram utilizados RNAs, previamente extraídos, de linhagens terminalmente diferenciadas, como: a) fibroblastos humanos isolados em nosso laboratório por meio de *punch* de pele de indivíduo normal (Fib_02) e b) fibroblastos BJ. Como controle de pluripotência, foi realizada a extração e avaliação da expressão gênica de hCTE H1.

Além disso, foram utilizados RNAs de células com menor estágio de diferenciação, previamente extraídos pela Dra. Maristela Delgado Orellana: hCTE H1 diferenciada em corpos embrioides contendo tecidos da ectoderme, mesoderme e endoderme (H1_EB) e hCTE H1 diferenciada em célula-tronco mesenquimal (H1_MSC). Neste ensaio, foi feita a quantificação da expressão gênica dos marcadores de pluripotência *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* e *NANOG*.

Foi realizada também, a análise da expressão gênica das linhagens CCD_TCL1 e BJ_TCL1 por meio de RNAs cedidos pela Dra. Tathiane Maistro Malta.

Com o intuito de se comparar a expressão gênica, foi avaliada também a expressão gênica das linhagens hCTE H1, BJ, CCD27Sk e iPS_BM_02 (uma das linhagens de iPS geradas em nosso laboratório, a partir do Fib_02, por meio de transdução lentiviral dos

quatro fatores de Yamanaka). Os RNAs dessas amostras já estavam extraídos e armazenados a -80°C . Neste ensaio, foi feita a quantificação da expressão gênica dos marcadores de pluripotência *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* e *NANOG*, bem como do gene *TCL1*.

3.4.1. Extração do RNA total

O RNA total das amostras hCTE H1 e iPS_CI_11 foi extraído por meio do protocolo do kit *All Prep® DNA/RNA/miRNA Universal Handbook* (Qiagen, Alemanha).

As células foram sedimentadas por meio de centrifugação e, então, adicionou-se 600 μL de tampão de lise RLT com 10 μL beta-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, EUA). O sedimento de células foi ressuscitado e homogeneizado com o auxílio de uma seringa de 2 mL estéril e de uma agulha de 0,9 mm de diâmetro (Becton & Dickinson, EUA) até que se obtivesse uma mistura viscosa, para a ruptura da membrana celular. Acrescentou-se 600 μL de etanol 70% e o volume total foi aplicado à coluna de sílica RNeasy® (Qiagen, EUA) e centrifugado a 8000 x g por 15 segundos. O filtrado foi desprezado e adicionou-se 700 μL de tampão RW1 à coluna, para uma segunda centrifugação a 8000xg por 15 segundos. O filtrado foi descartado e foi adicionado 70 μL de uma solução de tampão RDD com 10 μL de DNase I à coluna. A amostra foi incubada por 15 min em temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) Em seguida, foram adicionados 350 μL do tampão RW1 à coluna, e centrifugada a 8.000 x g durante 15 segundos. Logo após, a membrana da coluna foi lavada com 500 μL de tampão RPE e centrifugada a 8.000 x g por 15 segundos. Este passo foi realizado duas vezes. A coluna foi, então, transferida para um novo tubo coletor de 2,0 mL. Após a centrifugação em velocidade máxima por 1 minuto, a coluna foi cuidadosamente transferida para um tubo novo de 1,7 mL e adicionados 30 μL de água livre de RNase à membrana da coluna, que foi submetida a nova centrifugação a 8.000 x g, por 1 min para remoção do RNA ligado à membrana.

3.4.2. Quantificação de RNA total

Tanto os RNAs extraídos, quanto os RNAs de Fib_02, BJ, H1_EB, H1_MSC, CCD_TCL1 e BJ_TCL1 cedidos foram quantificados com o auxílio do espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific, EUA) nos comprimentos de onda (λ) de 260 a 280 nm. O grau de pureza foi avaliado considerando-se as amostras puras aquelas cujo valor da razão

de absorvância A260/A280 estivesse entre 1,8 e 2,0. As amostras de RNA total foram mantidas em freezer a -80°C até o uso.

3.4.3. Integridade do RNA

A integridade dos RNAs foi avaliada por eletroforese em gel 1% de agarose (Gibco, EUA). A cada amostra de RNA total (500 ng/ μ L) foi adicionado 1 μ L do corante GelRed™ 100x (Biotium, EUA) e 5 μ L de tampão [15% (m/v) de Ficoll PM400 (Sigma-Aldrich, EUA) e 0,0625% (m/v) xilenocianol para eletroforese (Merck Corporate, EUA)]. A eletroforese foi realizada com voltagem de 100 V (volts) por 40 minutos. A visualização das bandas foi realizada em fotodocumentador Imagequant 350 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Suécia).

3.3.4. Transcrição reversa

Após a confirmação da integridade dos RNAs, os mesmos foram utilizados de molde para a síntese do DNA complementar (cDNA) pela reação de transcrição reversa, a qual foi realizada pelo kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação foi preparada adicionando-se 2,5 μ L de tampão RT (10X); 1,0 μ L de mix de dNTP (100 mM); 2,5 μ L *random primers* (10X); 0,075 μ L de *Rnase out*; 1,25 μ L da enzima *MultiScribe® MuLV reverse transcriptase*, volume específico para obtenção de 1000 ng de RNA e água livre de RNase para um volume final de 25 μ L. Em seguida, a reação foi colocada no termociclador e incubada seguindo as condições: 25°C durante 10 minutos e 37°C durante 120 minutos. O cDNA foi diluído 1:10 em água deionizada estéril para a utilização nas reações de quantificação por PCR em tempo real.

3.3.5. PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Para a realização da quantificação da expressão gênica por qPCR foi utilizada a metodologia de TaqMan® (Applied Biosystems, EUA), que consiste na utilização de *primers* específicos para o gene de interesse, bem como uma sonda de hidrólise, que se

liga com especificidade ao fragmento amplificado. A cada ciclo de reação, a sonda liga-se ao fragmento a ser amplificado, e é degradada devido a atividade 5'→3' exonuclease da enzima *Taq* polimerase. Com isso, o *quencher*, que absorve a fluorescência, é liberado, tornando possível a emissão de fluorescência pelo fluorocromo FAM® (comprimento de onda de 520 nm) que é captada pelo filtro, do aparelho *ABI Prism 7500 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, EUA). A intensidade de fluorescência é proporcional ao número de fragmentos amplificados. Utilizou-se para cada amostra 5,0 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)*; 0,5 µL de sonda gene-específica (20X); 2,0 µL de cDNA diluído 1:10 (v/v) e água livre de RNase para um volume final de 10 µL. Os resultados da qPCR foram analisados pelo software *Sequence Detection System V2.0.1* (Applied Biosystems, EUA).

O nível da expressão dos transcritos foi calculado com base nos Cq (*quantification cycle*) obtidos e a normalização da reação foi feita pela média geométrica de genes endógenos (VANDESOMPELE et al., 2002).

Para as células Fib_02, BJ, iPS_Cl_11, H1_EB e H1_MSC foram utilizadas sondas para os genes *OCT4* (nome comercial *POU5F1*, Hs01895061_u1), *SOX2* (Hs01053049_s1), *KLF4* (Hs00358836_m1), *c-MYC* (Hs00905030_m1) e *NANOG* (Hs02387400_g1). Já, como endógenos, foram utilizadas sondas para os genes *RNF7* (Hs02621493_s1) e *HPRT1* (Hs01003267_m1) e o cálculo da expressão gênica foi feito pelo método da URE (unidade relativa de expressão) (ALBESIANO et al., 2003).

Enquanto que para as linhagens CCD_TCL1 e BJ_TCL1 foram utilizadas sondas para os genes *TCL1* (Hs00172040_m1), *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC* e *NANOG*. Como genes endógenos foram utilizadas sondas para *RPL13A* (sonda *in house*) e *B2M* (Hs99999907_m1). O cálculo das expressões gênicas foi feito utilizando o método de cálculo do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (PFAFFL, 2001) utilizando a mediana dos fibroblastos CCD27Sk e BJ como calibrador.

Os gráficos ilustrando as expressões gênicas foram obtidos pelo software Prism 4 (GraphPad Software Inc., EUA).

3.5. Imunofenotipagem

A análise dos marcadores de pluripotência foi realizada com as células iPS_Cl_08, iPS_Cl_11, BJ_TCL1 e CCD_TCL1 para os marcadores intracelulares NANOG e

OCT3/4 e para o marcador de superfície SSEA-4. Todas as análises foram feitas por citometria de fluxo.

3.5.1. Preparo das células

Os poços das placas de cultura foram lavados com PBS e posteriormente a enzima tripsina foi utilizada para a desagregação das células. Cada linhagem foi transferida para um tubo de prolipropileno identificado e foi adicionado meio de cultura sem soro bovino fetal para que a tripsina fosse diluída. Os tubos foram centrifugados e, posteriormente, os sobrenadantes descartados. As células foram ressuspensas em meio DMEM/F12 (Life Technologies, EUA).

3.5.2. Marcação das células

Para a marcação, foram utilizados os anticorpos monoclonais, anti-NANOG humano, anti-OCT3/4 humano e anti-SSEA-4 humano (Becton & Dickinson, EUA). Foi incluído também, um tubo com isotipos controle tanto para as marcações de moléculas de superfície celular quanto para as marcações intracelulares.

Foram utilizadas 1×10^5 células/marcador. Para a marcação de moléculas de superfície celular (SSEA-4) adicionou-se 5 μL de anticorpo e incubou-se durante 20 minutos, em temperatura ambiente (TA), ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para a retirada de anticorpos excedentes e ressuspensas em 200 μL de PBS para a leitura em citômetro de fluxo.

Para a marcação de moléculas intracelulares (OCT3/4 e NANOG), as células foram fixadas adicionando ao sedimento celular 1 mL do tampão BD FACS Lysing Solution (Becton & Dickinson, EUA) e incubadas durante 10 minutos, em TA. As células foram centrifugadas, o sobrenadante descartado e adicionou-se 300 μL do tampão de permeabilização BD FACS Permeabilizing 2 (Becton & Dickinson, EUA) com 10 minutos de incubação em TA. Após nova lavagem com PBS, foi adicionado 5 μL de anticorpo e incubou-se durante 20 minutos, em TA, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas, novamente, com PBS para a retirada de anticorpos excedentes e ressuspensas em 200 μL de PBS para a leitura em citômetro de fluxo.

No total, foram adquiridos 10.000 eventos e plotados em função de *Forward Scatter* (FSC) e de *Side Scatter* (SSC), onde selecionou-se a população celular de baixo e médio tamanho (FSC) e baixa complexidade interna (SSC), correspondente à população de interesse, denominada região 1 (R1). A seguir quantificou-se, dentro da região R1, as células que eram positivas para os marcadores analisados. A análise foi feita utilizando-se o citômetro FACSCalibur (Becton & Dickinson, EUA) e o software utilizado foi o Cell Quest Pro (Becton & Dickinson, EUA). Os gráficos foram obtidos utilizando-se o software FlowJo (Treestar Inc., EUA).

3.6. Ensaio de formação de corpos embrioides

O ensaio de diferenciação espontânea *in vitro*, ou formação de corpos embrioides, foi realizado com as células iPS_C1_03, iPS_C1_04 e, como controle positivo, com a linhagem hCTE H1.

3.6.1. Formação dos corpos embrioides

Precedente a suspensão das colônias, as células foram tratadas por uma hora com 10 μM ROCK Inhibitor (Y-27632 dihydrochloride, Sigma-Aldrich®, USA) diluído no meio de cultura mTeSR.

O meio de cultura foi retirado após esse período e a suspensão das colônias foi realizada com EDTA. Adicionou-se 2 mL por poço de cada linhagem. Após seis minutos, o EDTA foi descartado e adicionou-se ácido polivinílico (PVA) diluído no meio de cultura mTeSR (4mg/mL), lavando os poços para que os fragmentos de colônias soltassem. Os fragmentos foram transferidos para uma placa de baixa aderência de seis poços, com conteúdo final de 4 mL de meio de cultura por poço. No dia seguinte, adicionou-se mais 1,5 mL de meio mTeSR + PVA por poço.

Dois dias após a transferência dos fragmentos de colônias, trocou-se o meio de cultura para o meio de diferenciação espontânea DMEM suplementado com 15% de SBF inativado pelo calor, L-glutamina (200 mM/mL), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os corpos embrioides foram cultivados por mais seis dias e o meio de cultura foi trocado a cada dois dias.

3.6.2. Plaqueamento dos corpos embrioides

Após sete dias de cultivo, o conteúdo das placas foi recolhido e transferido para um filtro de 70µm, onde os corpos embrioides ficaram retidos. Este filtro foi revertido em uma placa de baixa aderência e lavado com o meio de cultura para que os corpos soltassem. Os corpos embrioides foram, então, transferidos para uma placa de 24 poços com lamínulas revestidas de gelatina 2% para que os corpos aderissem e se diferenciarem. Foram transferidos cerca de quatro corpos embrioides para cada poço da placa. Os corpos embrioides foram cultivados por mais sete dias, trocando-se o meio de cultura a cada dois.

3.6.3. Análise dos corpos embrioides por imunofluorescência

Após sete dias em cultura, os corpos embrioides que aderiram e diferenciaram foram fixados para marcação por imunofluorescência. Os poços foram lavados uma vez com PBS para completa retirada do meio de cultura e os corpos embrioides foram fixados com adição de paraformaldeído 2% por 10 minutos a 37°C. O paraformaldeído foi retirado e os poços novamente lavados duas vezes com PBS.

Adicionou-se glicina 0,1M nos poços, deixando agir por mais 30 minutos. Após a glicina, foram realizadas novas lavagens com PBS e adicionou-se TritonX-100 a 0,3% nos poços para permitir a entrada dos anticorpos primários nas células. Novas lavagens com PBS foram feitas e incubou-se os poços por uma hora em solução de bloqueio (PBS – BSA) para evitar ligação inespecífica dos anticorpos.

Foram escolhidos os anticorpos primários anti-*nestina* 1 mg/mL produzido em *mouse* (Merck Millipore Corporation, Alemanha) para marcação dos tecidos da ectoderme, anti-*desmina* 0,5 mg/mL produzido em camundongo (BD Biosciences, EUA) ou anti-*alfa-SMA* 0,05 mg/mL produzido em camundongo (Sigma-Aldrich®, EUA) para marcação dos tecidos da mesoderme e *alfa-fetoproteína* 2,6 mg/mL produzido em coelho (Dako, Dinamarca) para marcação dos tecidos da endoderme.

Para a linhagem hCTE H1 foi feita a co-marcação de *alfa-fetoproteína* e *desmina*, enquanto que para iPS foi feita a co-marcação de *alfa-fetoproteína* e *alfa-SMA*. As co-marcações foram possíveis devido a origem animal distinta dos anticorpos.

As lamínulas foram retiradas dos poços da placa de 24 poços para adição dos anticorpos primários diluídos, os quais foram incubados em câmara úmida e escura por

uma hora. Os poços foram, então, lavados com PBS e os anticorpos secundários foram adicionados e mantidos incubados por uma hora em câmara úmida e escura. Os anticorpos secundários utilizados foram Alexa Fluor® 488, produzido em camundongo para a linhagem hCTE H1 e produzido em coelho para iPS e Alexa Fluor®546, produzido em coelho para hCTE H1 e produzido em camundongo para iPS (Life Technologie^s, EUA).

Os poços foram lavados, novamente, cinco vezes com PBS. Para marcação do núcleo foi realizada a coração com DAPI (dihidroclorato de 4,6 diamino-2-fenilindol) por 15 minutos. Foi feita uma nova lavagem com PBS. As lamínulas foram retiradas dos poços, lavadas com água destilada e montadas sobre lâminas de vidro com solução de montagem *Fluoromount-G™ Slide Mounting Medium* (Electron Microscopy Sciences, EUA). As lâminas foram observadas em microscópio confocal Carl Zeiss modelo LSM 710 (Carl Zeiss, Alemanha) e as imagens obtidas e processadas com o software Zen 2008 *version 2.5* (Carl Zeiss, Alemanha).

3.7. Ensaio de formação de teratoma

O ensaio de diferenciação espontânea *in vivo*, ou ensaio de formação de teratoma, foi realizado com as células iPS_C1_08, iPS_C1_11, BJ_TCL1 e CCD_TCL1, utilizando como controles negativos os fibroblastos CCD27Sk e BJ e como controle positivo a linhagem hCTE H1.

3.7.1. Tratamento dos animais

Foram utilizados camundongos imunodeficientes do tipo Balb/c Nude (CAnN.Cg-Foxn1nu/Crl, Charles River, USA) com idade entre 4 a 8 semanas. Os camundongos foram mantidos em caixas de polipropileno com filtros na tampa, que criam um microambiente mais quente do que o macroambiente, e tiveram maravalha de pinho como substrato. Foram mantidos de três a quatro animais por caixa. Água autoclavada foi fornecida todo o tempo. A ração, rica em proteína, foi colocada em um recipiente em uma grade em cima da gaiola, juntamente com a garrafa d'água.

A caixa, a garrafa, a ração e a maravalha são esterelizados por autoclavação e substituídas de uma a duas vezes por semana. O manuseio dos animais, assim como da

água e da ração, é realizado dentro de uma capela de fluxo laminar devidamente limpa e estéril.

3.7.2. Preparo das células

Para todas as células utilizou-se cerca de $5,0 \times 10^6$ células. Primeiramente, as linhagens foram repicadas e desagregadas da placa de cultura. Para as linhagens de fibroblastos, CCD27Sk e BJ, os poços das placas foram lavados com PBS e, posteriormente, adicionou-se tripsina. Cada linhagem foi transferida para um tubo de polipropileno identificado e foi adicionado meio de cultura sem soro bovino fetal para inativação da tripsina. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a $200 \times g$ e, posteriormente, os sobrenadantes descartados.

No caso de iPS_CI_08, iPS_CI_11, BJ_TCL1 e CCD_TCL1, a ressuspensão das colônias foi feita por meio da passagem do rodo de cultura sobre os poços. Os fragmentos de colônias foram, então, recolhidos e transferidos para um tubo de polipropileno. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a $200 \times g$ e os sobrenadantes descartados.

Todos os sedimentos celulares foram ressuspensos em um meio de injeção composto de 30% Matrigel *Matrix Basement Membrane* (BD Biosciences, Reino Unido) e 70% de PBS e cerca de 350 μ L de volume final de injeção foi utilizado. As células em seu meio de injeção foram transferidas para um novo tubo de polipropileno e armazenadas no gelo até o momento da injeção.

3.7.3. Injeção das células

Para a realização da injeção, os camundongos foram imobilizados dentro do fluxo laminar, sendo segurados pela cauda e pelo dorso. A injeção foi realizada na região dorsal do camundongo, por via subcutânea, próximo a nuca por meio de uma seringa de insulina de volume de 1 mL com agulha estéril de 21 G.

A linhagem CCD_TCL1 foi injetada em apenas um camundongo Balb/c Nude, em decorrência da ausência de grande concentração celular. Já, a injeção de BJ_TCL1, iPS_CI_08 e iPS_CI_11 foi feita em réplicas, utilizando três camundongos. Os controles

negativos, BJ e CCD27Sk, bem como o controle positivo hCTE H1 foram injetadas em apenas um camundongo Balb/c Nude cada.

3.7.4. Manutenção e observação dos animais

Os camundongos que receberam as injeções foram mantidos por cerca de 60 dias para que fosse observada a formação dos tumores.

3.7.5. Análise e processamento dos tumores

Precedente a extração, os tumores formados pela injeção da linhagem BJ_TCL1 foram analisados pela presença de GFP pelo método *In vivo Fluorescence Imaging* (FLI), utilizando o equipamento *Lumina In Vivo Imaging System* (IVIS Lumina, Perkin Elmer, USA). Primeiramente, os camundongos foram anestesiados por inalação de 2,5% de isoflurano. Então, foram alocados dentro do equipamento expostos continuamente a 1.5% de isoflurano para a captação das imagens. Os animais foram fotografados utilizando dois comprimentos de onda: 460 nm, para detecção do GFP e 430 nm, para localização de sinais inespecíficos referentes ao filtro de emissão de GFP (*background*). As imagens fluorescentes corrigidas foram obtidas pela subtração dos sinais inespecíficos pelo software Living Image 3.0. Depois da confirmação da origem da fluorescência do tumor, os camundongos foram sacrificados por asfixia por inalação de CO₂ para a extração dos tumores.

O camundongo que recebeu a injeção de hCTE H1 também foi sacrificado por asfixia por inalação de CO₂ e seu tumor foi imediatamente extraído.

Todos os tumores passaram por processamento histológico. Os fragmentos dos tumores foram imersos em tubos de polipropileno contendo paraformoldeído 2%, onde ficaram durante 24 a 48 horas. Posteriormente, os fragmentos foram submetidos a desidratação através da imersão em álcoois 70%, 80%, 90% e 100%.

Então, foi realizada a clarificação pela imersão dos fragmentos em solução 50% álcool e 50% xilol, xilol I e xilol II. Os fragmentos foram, então, imersos em parafina I, II e III e, posteriormente, inclusos em parafina utilizando a Central de Inclusão. Os

fragmentos foram cortados no micrótomo, a 5µm, e os cortes distendidos por água a 50°C, em banho-maria.

Posteriormente, os cortes foram fixados na lâmina, clarificados e desidratados, novamente, para a coloração com hematoxilina e eosina (H&E) que permite a observação da morfologia das células que compõem o tumor. Os tumores das linhagens CCD_TCL1 e BJ_TCL1 foram, ainda, submetidos a imunohistoquímica utilizando-se anticorpos monoclonais para as proteínas Ki-67 (clone anti-humano MIB, DAKO, USA) e vimentina (clone anti-humano V9, DAKO, USA).

Por último, os cortes foram submetidos à uma nova desidratação e clarificação e as lamínulas foram montadas sobre a lâmina com o gel adesivo Entellan® (Merck Milligore, Alemanha). As lâminas foram armazenadas para análise no microscópio óptico.

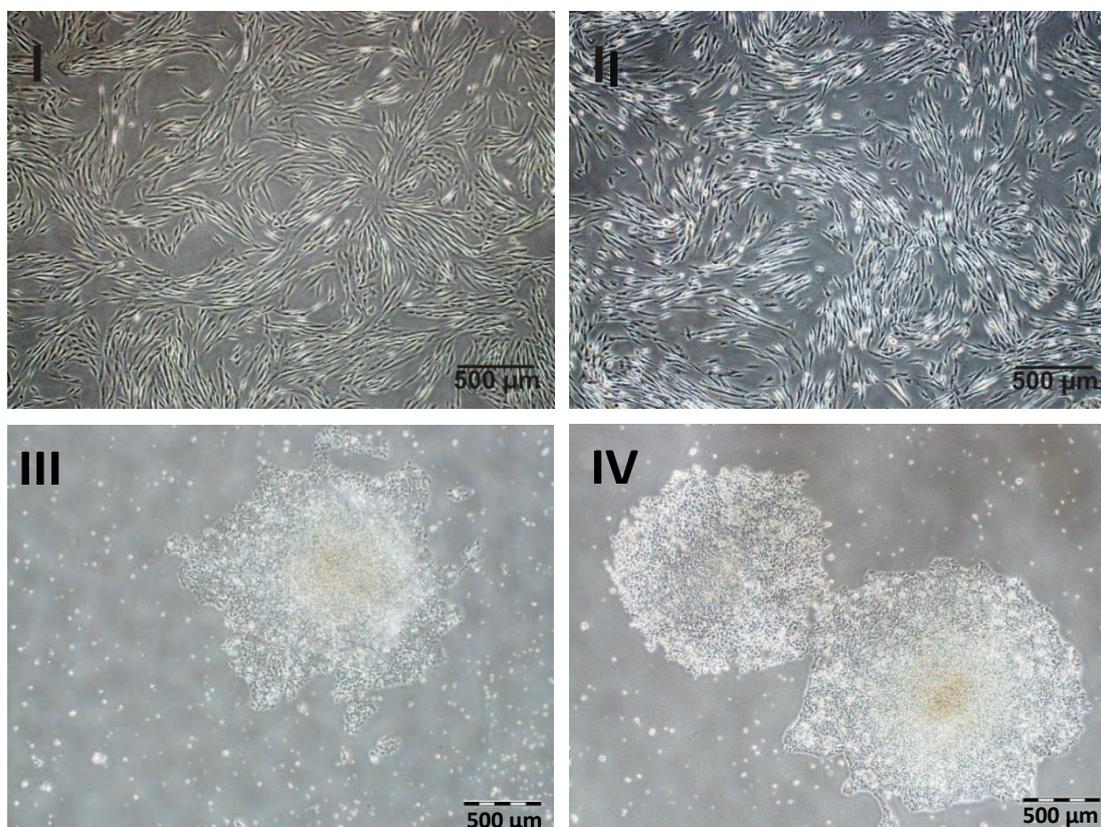
Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão

4.1. Cultivo e expansão das células

Tendo em vista o cultivo laborioso das células pluripotentes, bem como as etapas de congelamento e descongelamento, não foi possível realizar todas as etapas de caracterização molecular e funcional para todos os clones. Os experimentos foram realizados de acordo com os clones que estavam em cultivo e disponíveis durante o desenvolvimento deste projeto.

Os clones cultivados da linhagem iPS_BM_03, bem como as CCD_TCL1 e BJ_TCL1 apresentaram características semelhantes a hCTE H1 durante todo o cultivo. Diferentemente das linhagens de fibroblastos controle, CCD27Sk e BJ, que apresentam crescimento celular individualizado e formato fibroblastoide, as células transduzidas possuem crescimento em forma de colônias homogêneas com bordas bem definidas e bem agregadas. Além disso, em comparação com os fibroblastos, o tamanho celular é bastante reduzido, o núcleo aumentado e o citoplasma pouco abundante (Figura 2).



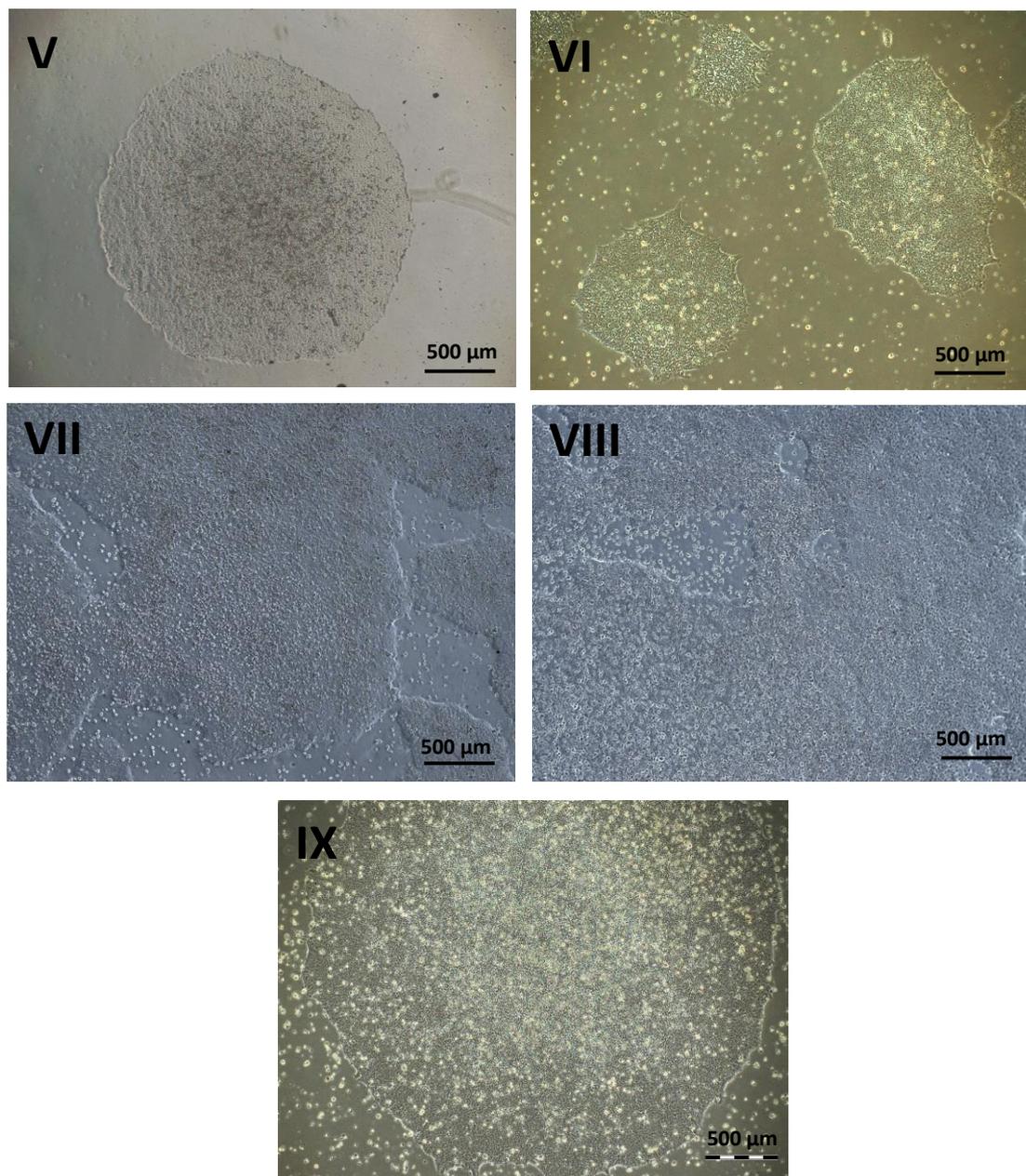


Figura 2. Morfologia das células pluripotentes obtida em microscópio óptico com contraste de fase. I: Morfologia da linhagem de fibroblasto BJ. II: Morfologia da linhagem de fibroblasto CCD27Sk. III: Morfologia da linhagem BJ_TCL1. IV: Morfologia da linhagem CCD_TCL1. V: Morfologia do clone iPS_C1_08. VI: Morfologia do clone iPS_C1_11. VII: Morfologia do clone iPS_C1_03. VIII. Morfologia do clone iPS_C1_04. IX. Morfologia da linhagem hCTE H1. Fotos tiradas sob aumento de 40 vezes.

4.2. Análise da expressão gênica por qPCR - Real Time

Foi avaliada a expressão de genes de pluripotência *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *KLF4* e *c-MYC* nas células iPS_C1_11, comparando a expressão com células em diferentes estágios de diferenciação, como H1_MSC e H1_EB (Figura 3).

A caracterização molecular das células mostrou que iPS_C1_11 estudada apresenta caráter pluripotente, visto que, houve detecção da expressão dos genes de pluripotência comparáveis aos níveis do controle positivo hCTE H1.

Como o esperado, a expressão do gene *OCT4* na iPS_C1_11, assim como no controle hCTE H1, foi cerca de 5x maior do que nas células com maior estágio de diferenciação (H1_EB e H1_MSC). Enquanto que, em células terminalmente diferenciadas, como os fibroblastos (Fib_02 e BJ), não houve expressão. Com relação ao gene *SOX2*, a expressão nas células iPS_C1_11 foi cerca de 2,5x maior em comparação às linhagens hCTE H1, H1_EB e H1_MSC. Contudo, a expressão na linhagem H1_EB foi maior que nas células pluripotentes, resultado não esperado, visto que as células possuem um maior grau de diferenciação. A expressão de *NANOG* foi maior na iPS_C1_11 do que nas linhagens hCTE H1 e H1_MSC, porém, inesperadamente, a expressão de H1_EB foi quase 2x maior que na iPS. Quanto ao gene *KLF4*, ele mostrou-se cerca de 2500x mais expresso em iPS_C1_11 do que no controle positivo hCTE H1, enquanto que, em comparação com o controle BJ, foi apenas 2x maior. A expressão do gene *c-MYC* também não foi observada como o esperado, pois foi 6x maior no controle BJ quando comparada a iPS_C1_11 e hCTE H1. As linhagens H1_EB e H1_MSC também apresentam maior expressão que iPS e hCTE H1. Isto ocorre porque estes dois genes, apesar de serem importantes para o processo de reprogramação celular, não são genes específicos da fase de pluripotência da célula. O gene *KLF4* também é expresso em uma grande variedade de células somáticas e o *cMYC* constitui um oncogene altamente expresso em diversos tipos de tumores e células somáticas. A utilização destes dois genes durante a geração de iPS parece estar ligada a indução da proliferação celular, o que facilita o processo de reprogramação.

Os gráficos a seguir representam os resultados encontrados e calculados numericamente pelo método da URE (Unidade Relativa de Expressão).

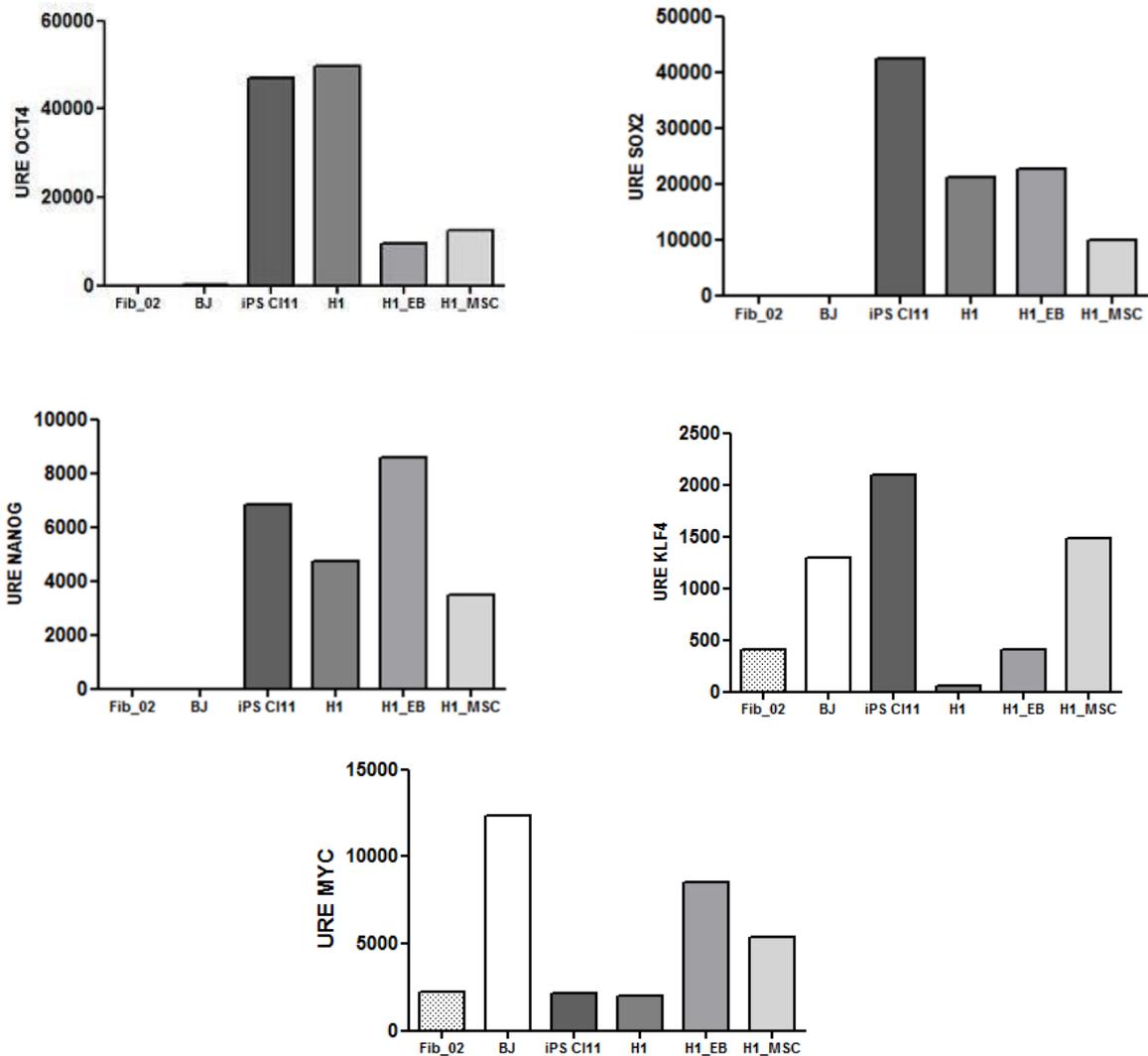


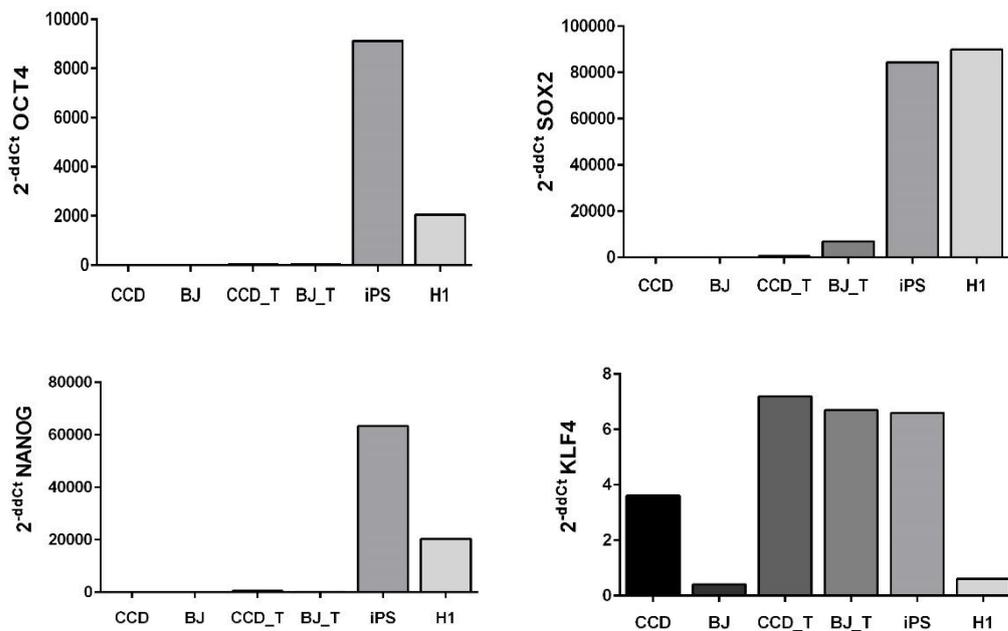
Figura 3. Gráficos ilustrando a quantificação da expressão gênica obtida por meio da URE, dos genes de pluripotência *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *NANOG* e *MYC* nas células estudadas, Fib_02, BJ, iPS_CI_11, H1, H1_EB e H1_MSC.

Foi avaliada a expressão de genes de pluripotência *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *KLF4*, *c-MYC* e *TCL1* nas células CCD_TCL1 e BJ_TCL1, comparando a expressão com células terminalmente diferenciadas, como os fibroblastos CCD27Sk e BJ, e com células pluripotentes controles, como hCTE H1 e iPS_BM_02 (Figura 4).

As análises demonstraram baixa expressão de genes de pluripotência nas linhagens BJ_TCL1 e CCD_TCL1 em comparação com as linhagens pluripotentes, porém, um aumento significativo em relação aos fibroblastos. Quanto ao gene *OCT4*, foi possível observar um aumento na expressão de cerca de 30x nas linhagens CCD_TCL1 e

BJ_TCL1 em comparação aos fibroblastos, porém, as linhagens iPS e hCTE H1 tiveram uma expressão maior (10000x e 2000x, respectivamente). O gene *SOX2* também teve expressão aumentada nas linhagens transduzidas com TCL1 em comparação aos fibroblastos e a linhagem BJ_TCL1 expressou cerca de 14x mais que a linhagem CCD_TCL1. Pode-se observar um aumento de expressão também para o gene *NANOG* (cerca de 560x para a linhagem CCD_TCL1 e 250x para a linhagem BJ_TCL1, em relação aos fibroblastos), enquanto que as linhagens iPS e hCTE H1 demonstraram, respectivamente, 60.000x e 20.000x mais expressão que os fibroblastos. O gene *KLF4* demonstrou expressão variável, porém baixa, em todas as amostras. O gene demonstrou-se, aproximadamente, 6x mais expresso nas linhagens iPS, CCD_TCL1 e BJ_TCL1 do que hCTE H1 e BJ. O *c-MYC* também demonstrou expressão variável e baixa entre as amostras, porém as linhagens CCD_TCL1 e BJ_TCL1 apresentaram maior expressão que os fibroblastos, sendo cerca de 2x mais expresso em BJ_TCL1 do que em CCD_TCL1. As linhagens CCD27Sk, BJ, iPS e hCTE H1, como o esperado, não apresentaram expressão do gene *TCL1*, enquanto que nas linhagens CCD_TCL1 e BJ_TCL1 demonstrou-se altamente expresso (cerca de 70.000x e 400.000x, respectivamente).

Os gráficos a seguir representam os resultados encontrados e calculados numericamente pelo método de 2^{-ddCt} .



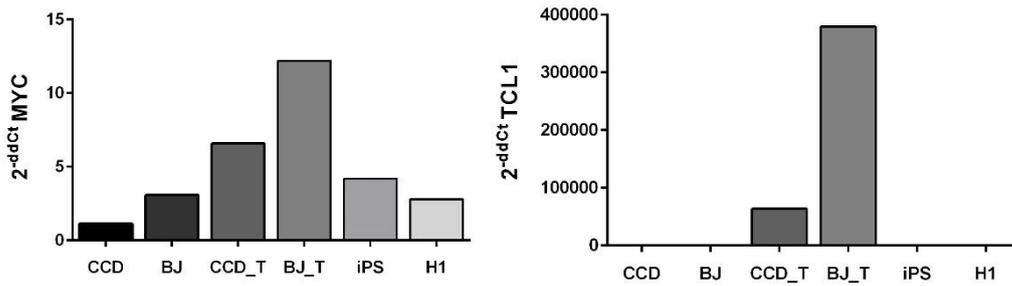


Figura 4. Gráficos ilustrando a quantificação da expressão gênica obtida por meio de 2^{-ddCt} , dos genes de pluripotência *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *NANOG*, *MYC* e *TCL1* nas linhagens CCD (CCD27Sk), BJ, CCD_TCL1 (CCD_T), BJ_TCL1 (BJ_T), iPS_BM_02 (iPS) e hCTE H1.

4.3. Imunofenotipagem

A análise dos marcadores de pluripotência foi realizada com as células iPS_Cl_08, iPS_Cl_11, BJ_TCL1 e CCD_TCL1 para os marcadores intracelulares NANOG, OCT3/4 e para o marcador de superfície SSEA-4.

Pode-se observar que todas as células foram positivas para NANOG, sendo que a linhagem BJ_TCL1 apresentou a maior expressão (89%) quando comparada as outras. Quanto ao marcador OCT4 e SSEA-4, apenas iPS_Cl_08 e iPS_Cl_11 foram positivas (Figura 5).

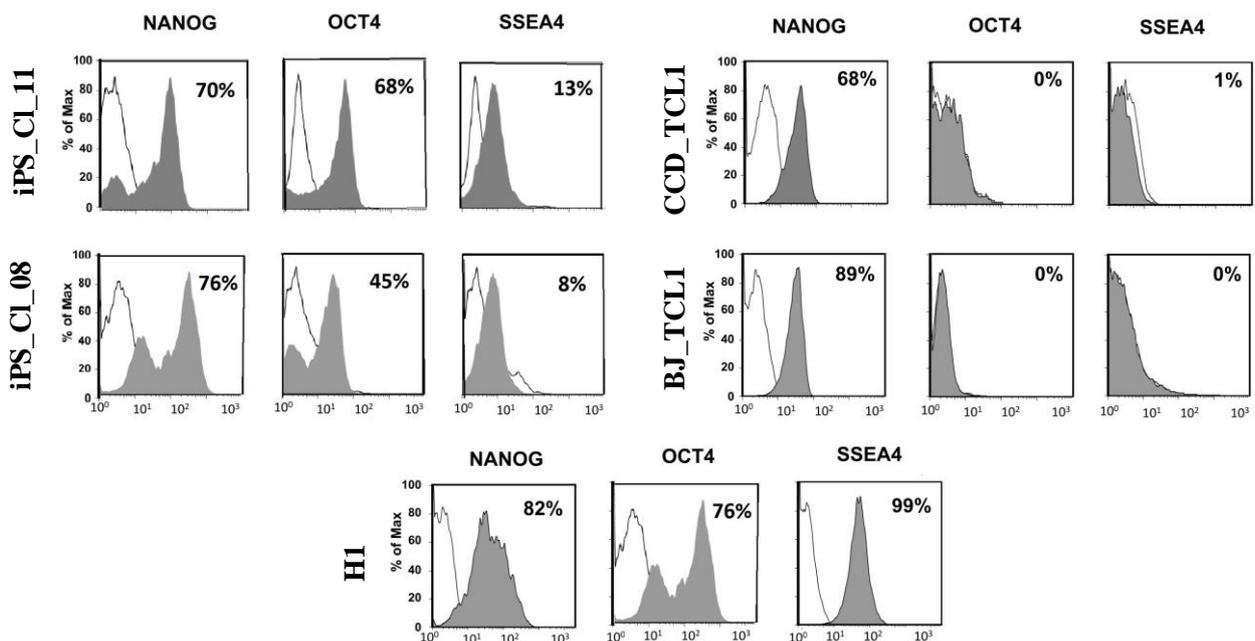


Figura 5. Imunofenotipagem das células iPS_C1_08, iPS_C1_11, CCD_TCL1, BJ_TCL1 e hCTE H1. Os histogramas mostram a porcentagem de células positivas para os marcadores NANOG, OCT4 e SSEA-4. Histogramas gerados com o software FlowJo.

As linhagens BJ_TCL1 e CCD_TCL1 apesar de não apresentarem expressão de OCT4, apresentam alta expressão de NANOG, o que indica a ativação de uma via de reprogramação.

Já é descrita a modulação gênica exercida pela proteína NANOG durante o processo de reprogramação (WANG et al., 2006; ORKIN et al., 2008). No momento da indução de pluripotência por meio da transdução dos quatro fatores de Yamanaka, a célula entra em um estado de pré-reprogramação e ela só será completamente reprogramada, quando houver a ativação da expressão endógena do gene *NANOG*. A proteína NANOG interage com os fatores de transcrição exógenos, formando um complexo proteico. Esse complexo é responsável por ativar outros genes de pluripotência endógenos por remodelação epigenética, inclusive o próprio gene *NANOG*, estabelecendo um mecanismo de autorregulação. Sendo assim, o aumento da expressão de NANOG é um importante fator para avaliar a ativação de uma das vias de reprogramação pela transdução do gene *TCL1* em fibroblastos.

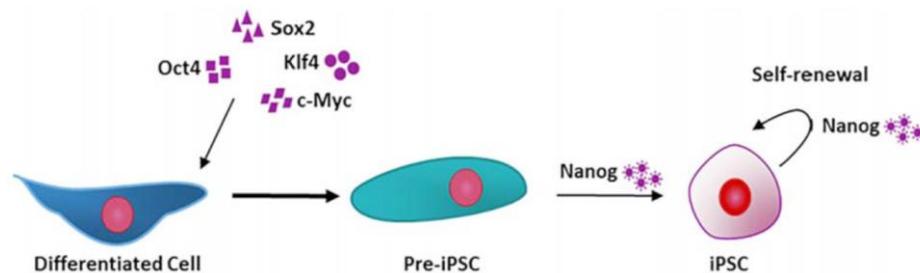


Figura 6. Esquema representando a atuação do gene NANOG durante o processo de reprogramação (ALLOUBA et al., 2015).

4.4. Ensaio de formação de corpos embrioides

O ensaio de diferenciação espontânea *in vitro*, ou formação de corpos embrioides, foi realizado com iPS_C1_03, iPS_C1_04 e, como controle positivo, com a hCTE H1.

4.4.1. Formação e adesão dos corpos embrioides

No dia seguinte ao repique das colônias e transferência para a placa de baixa aderência, pode ser observada a formação dos corpos embrioides nas placas de iPS_C1_03 e hCTE H1 (Figuras 7I e 7II). Dois dias após a transferência dos fragmentos de colônias, trocou-se o meio de cultura para o meio de diferenciação espontânea DMEM suplementado com 10% de SBF. Os fragmentos de iPS_C1_04 não formaram corpos embrioides e foram descartados.

Os corpos embrioides de iPS_C1_03 foram cultivados por mais seis dias e o meio de cultura foi trocado a cada dois dias por meio de centrifugação em tubo de polipropileno. Após sete dias cultivados em placa de baixa aderência, os corpos embrioides de iPS_C1_03 e hCTE H1 foram transferidos para placas de 24 poços e plaqueados sobre lamínulas estéreis de vidro revestidas com gelatina 2%. Foi adicionado meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SBF. No dia seguinte ao plaqueamento, os corpos embrioides já estavam aderidos. Cerca de três dias após o plaqueamento foi possível observar a diferenciação dos corpos embrioides sobre a lamínula (Figuras 7III e 7IV). Eles foram mantidos durante sete dias em cultura e o meio de cultura foi trocado a cada três dias.

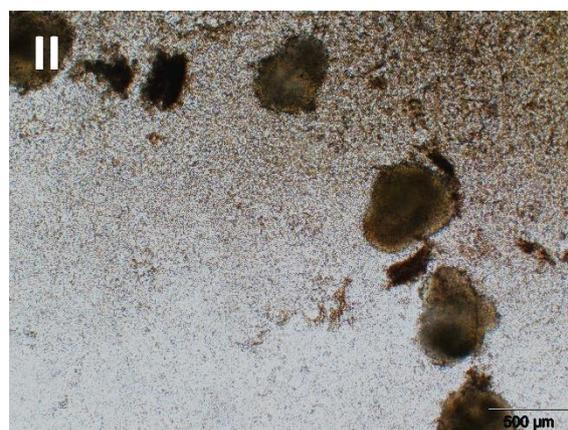
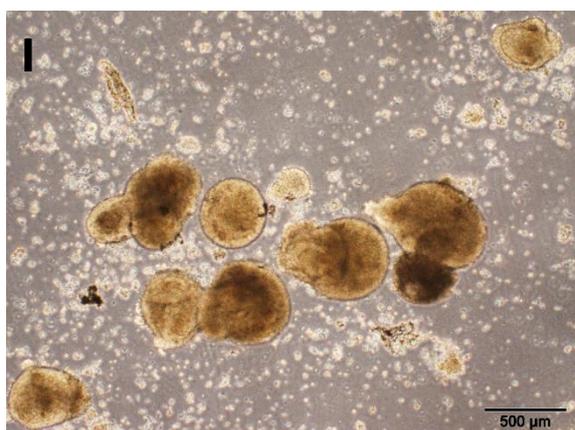


Figura 7. Morfologia dos corpos embrioides obtidos em microscópio óptico com contraste de fase. I: Morfologia dos corpos embrioides em suspensão de hCTE H1. II: Morfologia dos corpos embrioides em suspensão de iPS_Cl_03. III: Morfologia das células aderidas e diferenciadas de hCTE H1. IV: Morfologia das células aderidas e diferenciadas de iPS_Cl_03. Fotos tiradas sob o aumento de 40x.

4.4.2. Análise dos corpos embrioides por imunofluorescência

Os anticorpos escolhidos para marcação dos corpos embrioides da linhagem hCTE H1 foram anti-desmina para marcar células da mesoderme, anti-alfa-fetoproteína para marcar células da endoderme e anti-nestina para marcar células da ectoderme (Figura 8). Já, para a marcação dos corpos embrioides de iPS_Cl_03 foram escolhidos anti-alfa-SMA para marcar células da mesoderme, anti-alfa-fetoproteína para marcar células da endoderme e anti-nestina para marcar células da ectoderme (Figura 10).

As lâminas foram analisadas por microscopia confocal e a marcação de todos os anticorpos mostrou-se positiva para ambos os tipos celulares, demonstrando que a iPS_Cl_03 foi capaz de se diferenciar nos três folhetos embrionários *in vitro*. Sendo que, na hCTE H1 a desmina mostrou-se menos intensa e a nestina mais intensa (Figura 9). Já, para iPS_Cl_03 todas as marcações mostraram-se de alta intensidade (Figura 11).

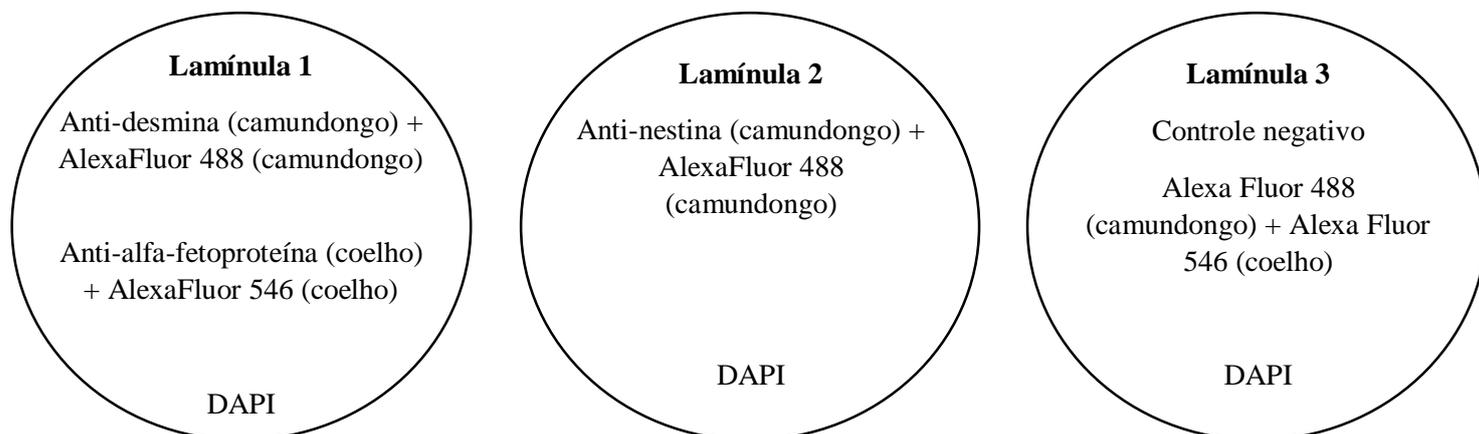


Figura 8. Esquema descrevendo a marcação por imunofluorescência dos corpos embrioides da linhagem controle CTE H1. Na primeira lamínula foi feita uma co-marcação do anticorpo produzidos em camundongo anti-desmina (mesoderme) e do anticorpo produzido em coelho anti-alfa-fetoproteína (endoderme) com conjugação dos anticorpos secundários AlexaFluor 488 (camundongo) e AlexaFluor 546 (coelho), respectivamente. Na segunda lamínula foi feita uma única marcação do anticorpo produzido em camundongo anti-nestina (ectoderme) conjugado com o anticorpo secundário AlexaFluor 488 (camundongo). A terceira lamínula foi utilizada como

controle negativo e foram utilizados apenas os anticorpos secundários AlexaFluor 488 (camundongo) e AlexaFluor 546 (coelho) para que fosse descontada a fluorescência inespecífica. Em todas as lâminulas foi utilizado o corante DAPI para marcação do núcleo das células.

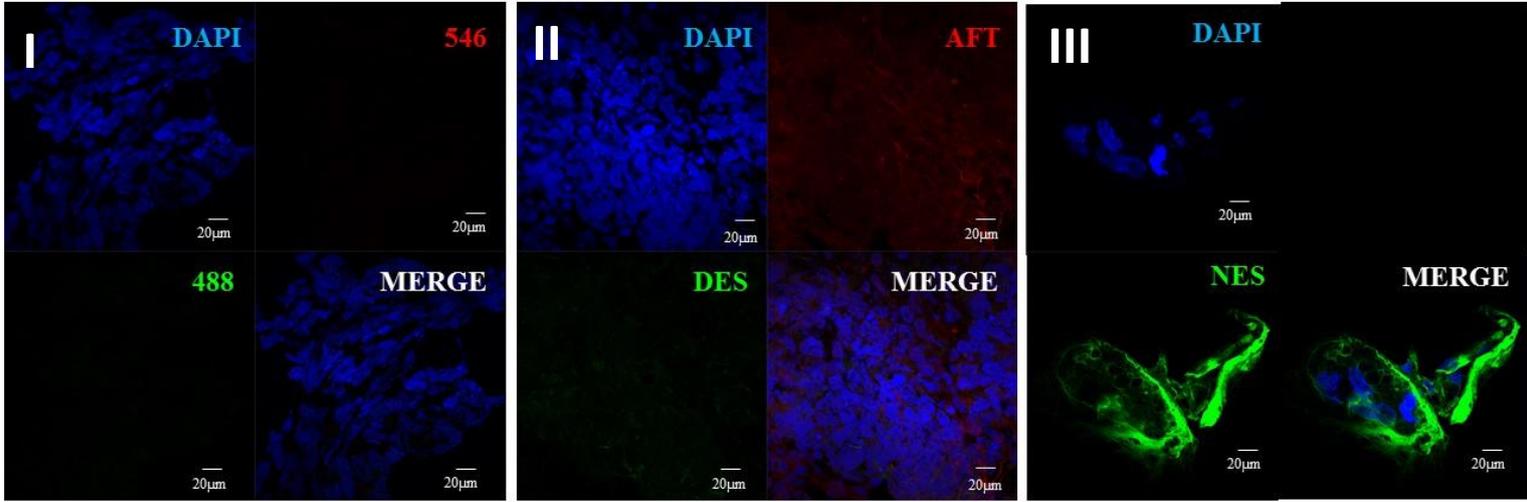


Figura 9. Imagens de microscopia confocal da marcação por imunofluorescência dos corpos embrioides da CTE H1. As imagens foram obtidas pelo software Zen 2008. I: Imagem obtida da lâmina do controle negativo com o corante DAPI (azul) ressaltando os núcleos das células e as fluorescências setadas em zero para o AlexaFluor 488 e 546. **II:** Imagem obtida da lâmina da co-marcação de alfa-fetoproteína (AFT) com AlexaFluor 546 e desmina (DES) com AlexaFluor 488. Em *MERGE*, a sobreposição de AFT, DES e DAPI. **III:** Imagem obtida da lâmina da marcação para nestina (NES) com AlexaFluor 488. Em *MERGE*, a sobreposição de NES e DAPI.

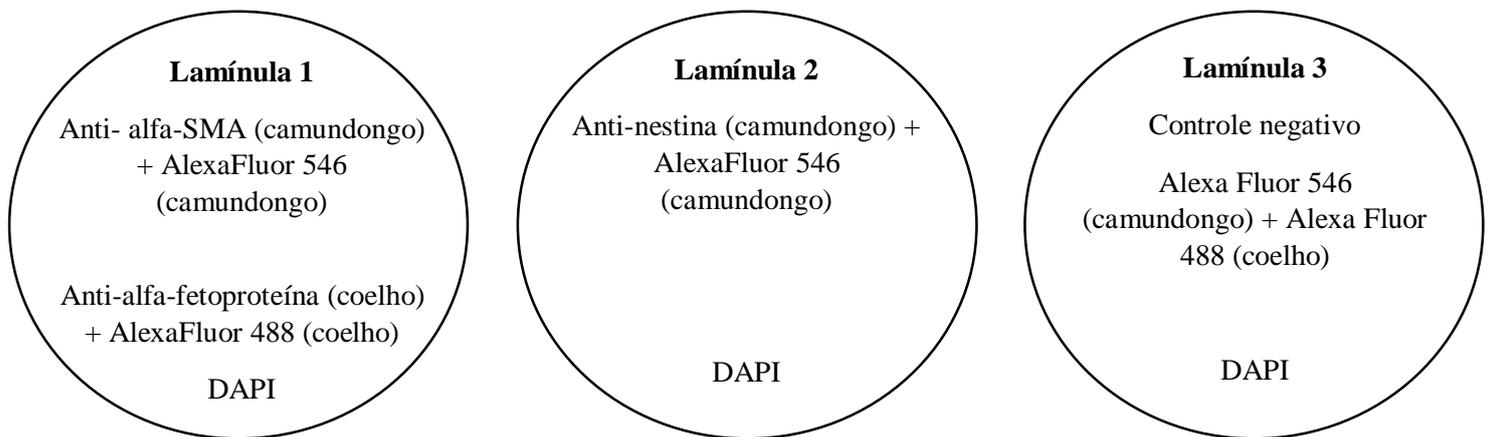


Figura 10. Esquema descrevendo a marcação por imunofluorescência dos corpos embrioides do clone iPS_CI_03. Na primeira lamínula foi feita uma co-marcação do anticorpo produzido em camundongo anti-alfa-SMA (mesoderme) e do anticorpo produzido em coelho anti-alfa-fetoproteína (endoderme) com conjugação dos anticorpos secundários AlexaFluor 546 (camundongo) e AlexaFluor 488 (coelho), respectivamente. Na segunda lamínula foi feita uma única marcação do anticorpo produzido em camundongo anti-nestina (ectoderme) conjugado com o anticorpo secundário AlexaFluor 546 (camundongo). A terceira lamínula foi utilizada como

controle negativo e foram utilizados apenas os anticorpos secundários AlexaFluor 546 (camundongo) e AlexaFluor 488 (coelho) para que fosse descontada a fluorescência inespecífica. Em todas as lâminas foi utilizado o corante DAPI para marcação do núcleo das células.

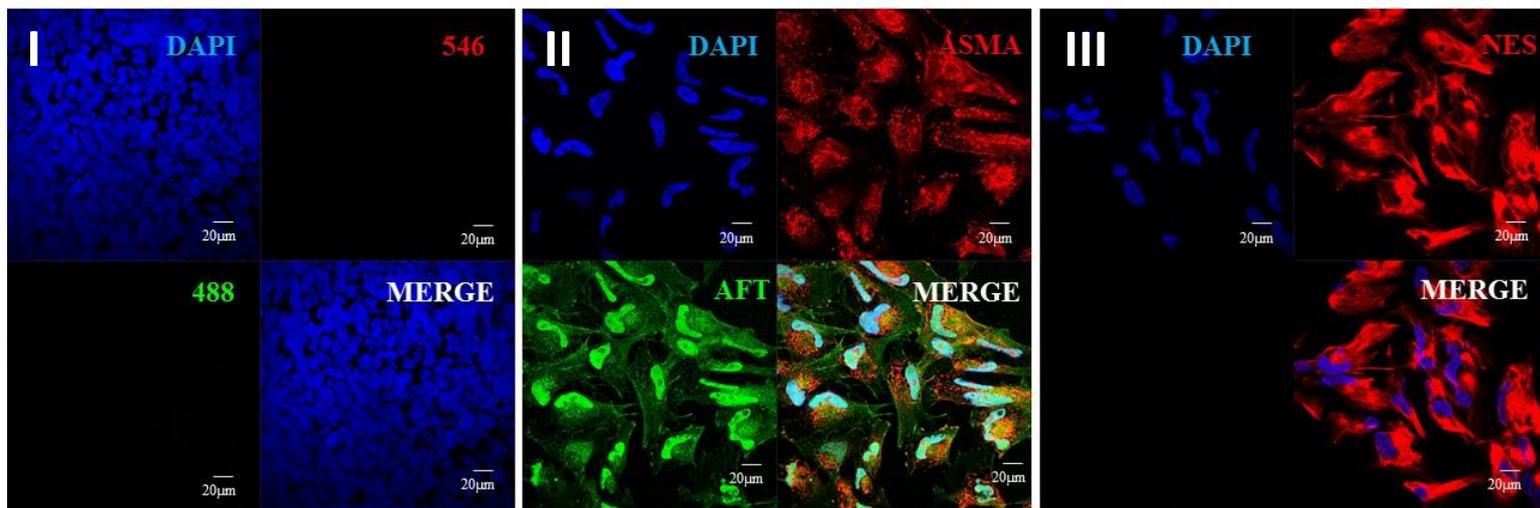


Figura 11. Imagens de microscopia confocal da marcação por imunofluorescência dos corpos embrioides da iPS_C1_03. As imagens foram obtidas pelo software Zen 2008. I: Imagem obtida da lâmina do controle negativo com o corante DAPI (azul) ressaltando os núcleos das células e as fluorescências setadas em zero para o AlexaFluor 546 e 488. II: Imagem obtida da lâmina da co-marcação de alfa-SMA (ASMA) com AlexaFluor 546 e alfa-fetoproteína (AFT) com AlexaFluor 488. Em *MERGE*, a sobreposição de ASMA, AFT e DAPI. III: Imagem obtida da lâmina da marcação para nestina (NES) com AlexaFluor 546. Em *MERGE*, a sobreposição de NES e DAPI.

4.5. Ensaio de formação de teratoma

O ensaio foi realizado pela injeção dos tipos celulares iPS_C1_08, iPS_C1_11, CCD_TCL1 e BJ_TCL1, utilizando como controle positivo a hCTE H1 e como controle negativo os fibroblastos CCD27Sk e BJ.

4.5.1. Análise e extração do teratoma

Os camundongos foram observados quanto à formação de tumor. Por volta de 20 dias após a injeção, foi possível observar formação de tumor nos três camundongos que receberam a linhagem BJ_TCL1. Os camundongos que receberam as injeções da linhagem CCD_TCL1, CCD27Sk, iPS_C1_08 e iPS_C1_11 foram mantidos por mais 45 dias e, após não ter sido observada formação de tumor, foram sacrificados. A formação

do tumor referente a injeção do controle positivo hCTE H1 pode ser observada após 42 dias da injeção.

Cerca de 20 dias após a detecção, período no qual o tumor já havia se desenvolvido em cerca de 1cm, os camundongos que receberam a linhagem BJ_TCL1 e seu respectivo controle negativo BJ foram submetidos a análise do GFP. A fluorescência foi detectada em todas as réplicas de tumores. (Figura 11).

Após 35 dias da detecção, quando o tumor da linhagem hCTE H1 já havia se desenvolvido em cerca de 1cm, o camundongo foi sacrificado e o tumor extraído para análise (Figura 12).

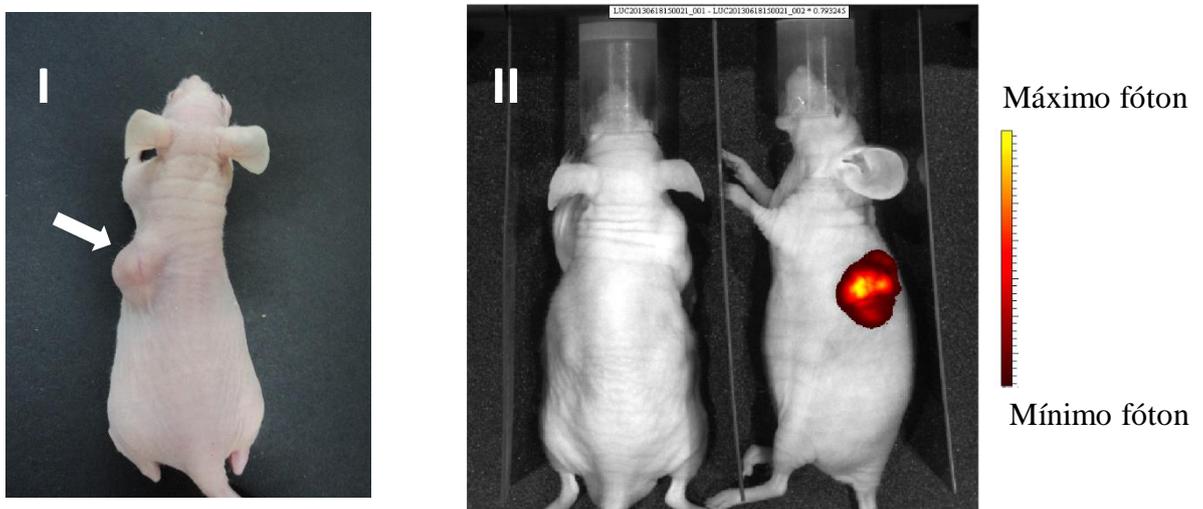


Figura 12. Imagens obtidas do camundongo número 2 no 40º dia após a injeção da linhagem BJ_TCL1. I: Fotografia do camundongo 9 momentos antes de ser submetido ao equipamento IVIS, evidenciando o tamanho do tumor formado (seta). II. Fotografia obtida pelo Software Living Image 3.0 detectando a fluorescência da expressão de GFP.

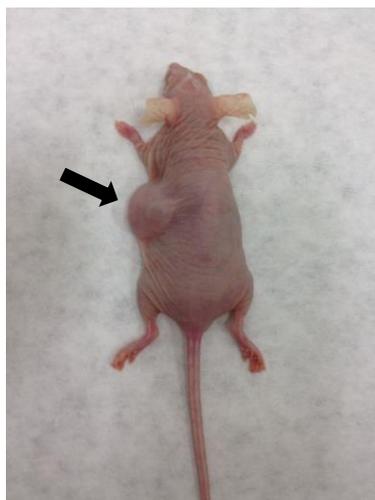


Figura 13. Fotografia do camundongo, evidenciando o tamanho do tumor (seta) 42 dias após a injeção da linhagem hCTE H1.

Os camundongos foram sacrificados e os tumores extraídos. Após o processamento histológico, os tumores referentes as duas linhagens foram corados com H&E para evidenciar a morfologia das células. Além disso, os tumores de BJ_TCL1 foram ainda submetidos a marcação de anticorpos por imunohistoquímica.

Pela análise histológica por microscopia óptica foi possível verificar que o tumor formado pela linhagem BJ_TCL1 não originou um teratoma formado dos três tecidos embrionários, como ocorreu com a injeção de hCTE H1 (Figura 13 V e VI). A injeção das células BJ_TCL1 resultou em um tumor maligno em todos os 3 animais testados. O tumor apresentou alta proporção de células indiferenciadas, alta relação do tamanho núcleo/citoplasma e alta taxa mitótica. Ainda, a análise por imunohistoquímica evidenciou alta taxa de proliferação (marcação positiva para K1-67) e estroma abundante (marcação positiva para vimentina) (Figura 13 I – IV).

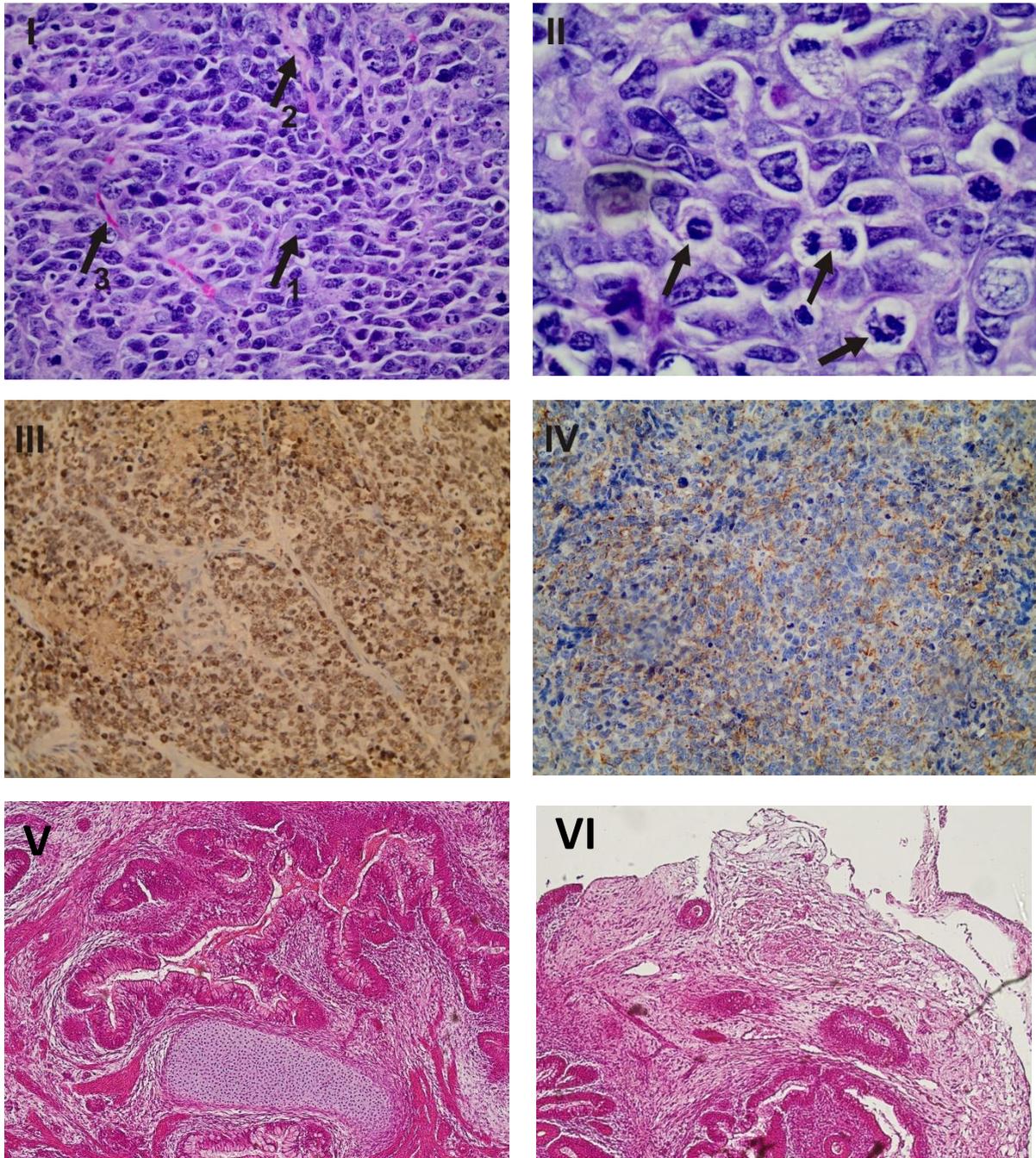


Figura 14. Fotografias referentes a análise histológica do tumor da linhagem BJ_TCL1. I: Cortes histológicos evidenciando a morfologia celular e a alta proporção núcleo/citoplasma (seta 1), infiltração estromal (seta 2) e a presença de capilares (seta 3). Coloração: H&E. Aumento = 400x. II: Cortes histológicos evidenciando a morfologia celular e a alta taxa mitótica (setas). Coloração: H&E. Aumento = 1000x (óleo de imersão). III: Imunohistoquímica evidenciando células positivas para o anticorpo KI-67. Aumento = 200x. IV: Imunohistoquímica evidenciando células positivas para o anticorpo vimentina. Aumento = 200x. V e VI: Cortes histológicas evidenciando a morfologia celular do teratoma formado pela injeção da hCTE H1, referente a diferenciação nos folhetos embrionários. Os ensaios de diferenciação são importantes para analisar a eficiência no processo de reprogramação celular, pois avaliam o potencial pluripotente das células por meio de sua função, ou seja, por meio da capacidade de diferenciação em

células dos três tecidos embrionários. Apesar das análises moleculares, as linhagens celulares podem ter comportamentos discordantes quando analisadas funcionalmente. O ensaio de diferenciação *in vitro* das células iPS_C1_03 e iPS_C1_04 demonstrou que a última apresenta capacidade de se diferenciar em tecidos dos três folhetos embrionários, o que confirma o caráter pluripotente da linhagem *in vitro*. Porém, quando a linhagem foi avaliada *in vivo* (iPS_C1_08 e iPS_C1_11) não foi possível observar a formação de teratoma. Tal fato demonstra a importância da realização de experimentos *in vivo*, visto que, em algumas vezes, as células injetadas em um organismo vivo, não apresentam o mesmo comportamento observado na cultura.

O ensaio de formação de teratoma, por tratar-se do “padrão ouro” na avaliação da pluripotência (GROPP et al., 2012), quando não efetivo revela variações na geração de iPS. Os genes exógenos de pluripotência, quando são carregados a uma célula somática, induzem a expressão de genes de pluripotência endógenos. As proteínas e os genes endógenos de pluripotência relacionam-se entre si, estabelecendo um mecanismo de autorregulação e, neste momento, a expressão exógena é silenciada (JAENISCH & YOUNG, 2008). As células reprogramadas, então, mantem seu caráter pluripotente até que receba algum estímulo para que reduza a expressão de genes de pluripotência e aumente a expressão de genes de diferenciação. Como não observamos a formação de teratoma com a injeção das células iPS_C1_08 e iPS_C1_11 mesmo com o estímulo do microambiente *in vivo*, é provável que os genes exógenos se mantiveram ativos, impossibilitando que as células se diferenciassem.

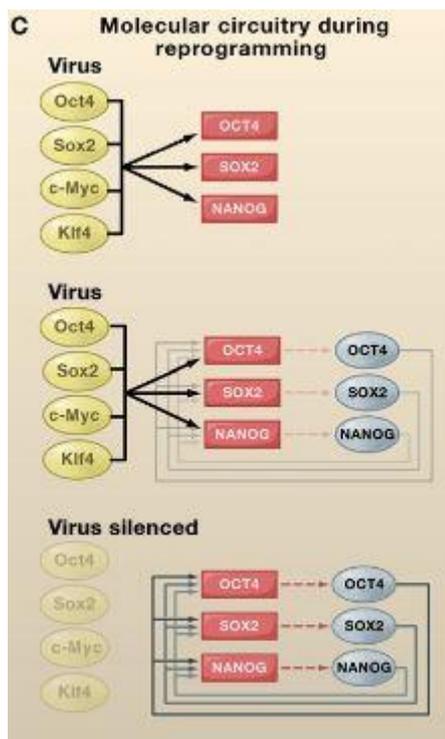


Figura 15. Esquema representando a maquinaria molecular exercida pelos genes de pluripotência exógenos e endógenos durante o processo de reprogramação (JAENISCH et al., 2008).

Desde maio deste ano, novas iPS foram geradas em nosso laboratório com a utilização de vetores que não integram ao genoma celular, aumentando a segurança do processo de reprogramação e facilitando a diferenciação das células no tecido de interesse.

No caso da linhagem BJ_TCL1, o tumor originado teve caráter maligno. Além do teratoma, já foi descrito que as ESC são capazes de formar tumores malignos, embora menos frequente (KNOEPFLER, 2009). Este fato relaciona-se com a similaridade das características funcionais entre CTE e células tumorais, como a alta capacidade proliferativa e de autorrenovação. Muitos dos genes reguladores das propriedades das CTE, e que são utilizados na reprogramação somática, também atuam nas células tumorais, evidenciando a relação estreita existente entre pluripotência e tumorigênese. Já é descrito a possível participação do gene *TCL1* no desenvolvimento de câncer de células B, pois quando não ocorre a redução de seu nível de expressão durante a diferenciação celular, ele atua na sobrevivência de células transformadas (KURAI SHY et al., 2007). Ao mesmo tempo, este gene pode estar envolvido na manutenção da pluripotência, mantendo as células em proliferação e indiferenciadas.

Conclusão



5. Conclusão

Tendo em vista o potencial terapêutico das células iPS, bem como a heterogeneidade da população celular resultante do processo de reprogramação, torna-se fundamental o conhecimento completo de suas características. Sendo assim, os testes moleculares e funcionais de pluripotência são essenciais para aumentar a confiabilidade e a eficiência destas células, tornando-as viáveis para futuros ensaios em terapia celular.

Referências bibliográficas



6. Referências bibliográficas

ALBESIANO, E. et al. Activation-induced cytidine deaminase in chronic lymphocytic leukemia B cells: expression as multiple forms in a dynamic, variably sized fraction of the clone, **Blood**, 2003.

BELLIN, M. et al. Induced pluripotent stem cell: the new patient? *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, v. 13, p. 713-726, 2012.

BOYER, L. A. et al. Molecular control of pluripotency. **Curr Opin Genet Dev** [S.I.], v. 16, n. 5, p. 455-62, 2006.

BRIVANLOU, A.H et al. Stem cells: setting standards for human embryonic stem cells. **Science**, v. 300, p. 913-916, 2003.

COWAN, C.A. et al. Derivation of Embryonic Stem-Cell Lines from Human Blastocysts. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, p. 1353-1356, 2004.

DRAPER, S.J et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultures human embryonic stem cells. **National Biotech**, v. 22, p. 53-54, 2004.

GONZÁLEZ F, B. S. & BELMONTE, J.C.I. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. **Nature Reviews Genetics** [S.I.], v. 12, n. 4, p. 231–242, 2011.

GROPP, M. et al. Standardization of the Teratoma Assay for Analysis of Pluripotency of Humans ES Cells and Biosafety of their Differentiated Progeny. **Plos One**, v. 7, p. 01-10, 2012.

IVANOVA, N. et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. **Nature** [S.I.], v. 442, n. 7102, p. 533-8, 2006.

JAENISCH, R. & YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell** [S.I.], v. 132, n. 4, p. 567-82, 2008.

KNOEPFLER, P. S. Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. **Stem Cells** [S.I.], v. 27, n. 5, p. 1050-6, 2009.

KURASHIY, A. I. et al. TORC2 regulates germinal center repression of the TCL1 oncoprotein to promote B cell development and inhibit transformation. **Proc Natl Acad Sci U S A** [S.I.], v. 104, n. 24, p. 10175-80, 2007.

LOWRY, W. E. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. **Proc Natl Acad Sci U S A** [S.I.], v. 105, n. 8, p. 2883-8, 2008.

MAHERALI, N. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. **Cell Stem Cell** [S.I.], v. 1, n. 1, p. 55-70, 2007.

MARTÍ, M. et al. Characterization of pluripotent stem cells. **Nature Protocols**, v. 8, p. 223-253, 2013.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v.78, p.7634-7638, 1981.

MARTIN, M.J. et al. A Human embryonic stem cells express and immunogenic nonhuman sialic acid. **Nature Medicine**, v. 11, p. 228-232, 2005.

MATOBA, R. et al. Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. **PLoS One** [S.I.], v. 1, p. e26, 2006.

MITSUI, K. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell** [S.I.], v. 113, n. 5, p. 631-42, 2003.

MURARO MJ, K. H. & VERSCHURE PJ. The Dynamics of Induced Pluripotency and its Behavior Captured in Gene Network Motifs. **Stem Cells** [S.I.], 2012.

NARDUCCI, M. G. et al. TCL1 is overexpressed in patients affected by adult T-cell leukemias. **Cancer Res** [S.I.], v. 57, n. 24, p. 5452-6, 1997a.

NICHOLS, J. et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, p. 379-391, 1998.

ORKIN, SH. et al. The transcriptional network controlling pluripotency in ES cells. **In Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 73, p. 195–202, 2008.

PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. **Nucleic Acids Res** [S.I.], v. 29, n. 9, p. e45, 2001.

SHAROV, A. A. et al. Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. **PLoS Biol** [S.I.], v. 1, n. 3, p. E74, 2003.

TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**. v.126, p.663-676, 2006.

TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell** [S.I.], v. 131, n. 5, p. 861-72, 2007.

TEITELL, M. A. The TCL1 family of oncoproteins: co-activators of transformation. **Nat Rev Cancer** [S.I.], v. 5, n. 8, p. 640-8, 2005.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**. v.282, p.1145-1147, 1998.

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

WANG, J. et al. A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem cells. **Nature**. V. 444, n. 7117, p. 364–68, 2006.

WERNIG, M. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature** [S.I.], v. 448, n. 7151, p. 318-24, 2007.

YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science** [S.I.], v. 318, n. 5858, p. 1917-20, 2007.

ZAGO, M.A. & COVAS, D.T. Células-Tronco: a nova fronteira da medicina. Ed. Atheneu, p. 03-34, 2006.

ZHAO, R. & DALEY, G. Q. From fibroblast to iPS: Induced Pluripotency by Defined Factors. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, p. 949-955, 2008.

Anexos



Anexo 1



Mem. nº 722/2010
GS-3/SMFK

Ribeirão Preto, 11 de junho de 2010

Prezado Senhor
PROF. DR. DIMAS TADEU COVAS
Fundação Hemocentro

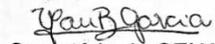
Senhor Professor,

Atendendo solicitação da Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa, Drª. Marcia Guimarães Villanova, encaminho a Vossa Senhoria Parecer CONEP nº 250/2010, referente ao Projeto de Pesquisa intitulado **“GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (IPS) HUMANAS UTILIZANDO VETORES LENTIVIRAIS E ADENOVIRAIS”**, de acordo com o Processo HCRP nº 1986/2009.

O parecer informa que seu projeto encontra-se **APROVADO** na CONEP.
Atenciosamente.


SUSI MARA FURIAMA KATO
Diretora do Serviço de Comunicações Administrativas
R.F. nº 7882

Anexo 2

	<p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus de Ribeirão Preto <i>Comissão de Ética no Uso de Animais</i></p>
<p>CERTIFICADO</p>	
<p>Certificamos que o trabalho (Protocolo 13.1.394.53.4), intitulado "Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) humanas", de autoria de Simone Kashima Haddad, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do <i>Campus</i> de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 04/11/2013.</p>	
<p>Colaboradores: Aline Fernanda Ferreira, Cleide Lúcia Araújo Silva, Dimas Tadeu Covas, Isabela Gerdes Gyuricza, Lucas Eduardo Botelho, Thatiane Maistro Malta Pereira e Virgínia Picança Castro.</p>	
<p>This is to certify that the work (Protocol number 13.1.394.53.4), entitled: "Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPS) humanas", by Simone Kashima Haddad is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in an ordinary meeting of CEUA, November, 4 2013.</p>	
<p>Ribeirão Preto, 18 de novembro de 2013.</p>	
 <p>Presidente da CEUA Profa. Dra. Cláudia Maria Padovan</p>	
 <p>Secretária da CEUA Vanessa Bombonato Garcia</p>	
<hr/> <p>Av. Bandeirantes, 3900 – CEP 14040-900 – Ribeirão Preto – São Paulo Fone: (16) 3602 3526 – Fax: (16) 3602 3526</p>	