LUCAS SIMÕES MACHADO

**Indução da pluripotência celular e diferenciação *in vitro* no
modelo suíno como modelo translacional**

São Paulo

2018

LUCAS SIMÕES MACHADO

**Indução da pluripotência celular e diferenciação *in vitro* no
modelo suíno como modelo translacional**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:
Cirurgia

Área de Concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:
Prof^a. Dr^a. Fabiana Fernandes Bressan

Co-orientador:
Prof^a. Dr^a. Kristine Freude

De acordo:
Orientador

São Paulo

2018

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3734
FMVZ

Machado, Lucas Simões
Indução da pluripotência celular e diferenciação *in vitro* no modelo suíno como modelo translacional / Lucas Simões Machado. – 2018.
79 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Dra. Fabiana Fernandes Bressan.

Coorientadora: Profa. Dra. Kristine Freude.

1. Suíno. 2. Reprogramação celular. 3. Células pluripotentes induzidas (iPSCs). 4. Células progenitoras neurais. I. Título.

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Fabiana Fernandes Bressan

Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres

Título do projeto: "Indução da pluripotência celular e diferenciação in vitro no modelo suíno como modelo translacional".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 000645)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, **ANALISOU** e **APROVOU** a Emenda (versão de 22/agosto/2018) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitamos a alteração da metodologia da presente proposta em relação às amostras utilizadas. Inicialmente foram propostas linhagens de fibroblastos originados de animais natimortos, e agora adicionamos o grupo de fibroblastos de origem embrionária suína, para efeito de comparação e aumento na eficiência do protocolo de geração de células-tronco in vitro. É importante ressaltar que todas as amostras (natimortos e embrionárias) já foram coletadas em projetos anteriormente analisados e aprovados por esta CEUA, sendo assim, nenhum experimento in vivo ou coleta de biopsias será realizado na presente. Encaminhamos projeto atualizado com alterações em realce, assim como carta de anuência do pesquisador responsável pelas amostras já existentes."

Comentários da CEUA: "Aprovado."

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: MACHADO, Lucas Simões

Título: Indução da pluripotência celular e diferenciação *in vitro* no modelo suíno como modelo translacional

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Para aqueles que foram minhas pernas
quando não conseguia mais andar
Para aqueles que foram meus olhos
quando não conseguia mais ver
Para os que foram minha boca
Quando não conseguia mais falar

Aos que foram alegria na minha tristeza
Aos que foram paz na minha guerra
Aos que foram fé na minha dúvida
Aos meus amigos, à minha família
e ao meu Deus, meu pai e melhor amigo

Lucas S. Machado

AGRADECIMENTOS

Me faltam palavras para descrever como foi esta jornada chamada mestrado. Assim como me faltam palavras para agradecer todos aqueles que tornaram tudo isso uma realidade.

O primeiro agradecimento precisa ser para **Fabiana Bressan**. Muito mais do que uma orientadora e professora. Há mais de 4 anos, junto com **Paulo Fantinato**, me incentivando a ser ambicioso e buscar mais. Confiando em mim, mais do que eu mesmo. Me oferecendo oportunidades que muitos sonhariam em ter. Nunca me deixando desanimar, e sempre pronta para me ajudar e ensinar. Além dos ocasionais “puxões de orelha” quando necessário. Até por eles sou grato (mas não tanto quanto o resto). À ambos, meu muito obrigado.

Aos meus companheiros, colegas e amigos do “grupo iPS”. Do começo ao fim juntos, nas partes boas e nas partes ruins (ou como diriam alguns, “dias de luta, dias de glória”). À minha companheira de aventuras em terras nórdicas, pelos muitos conselhos (mesmo que eu não concorde sempre) e sempre por tentar fazer eu sair da minha caixinha, **Naira Pieri**. Ao meu companheiro de conversas mais diversas possíveis, inclusive polêmicas, e piadas mais inusitadas, **Ramon Botigelli**. À minha companheira de cultivo celular noturnos e discussões filosóficas sobre comunicação com as células, dentre outros temas, **Raquel Castro**. À minha grande incentivadora de tentar coisas novas, na ciência e na vida, **Aline Souza**. À minha grande amiga que me acompanha desde os meus primeiros anos no laboratório com iniciação científica até o mestrado, **Laís Pessoa**. A todos vocês, meu muito obrigado.

À minha companheira de aventuras em terras canadenses. Irmã em Cristo, companheira nas dúvidas científicas, teológicas e sobre todas as outras coisas da vida, **Marina Amaro**. Que juntamente com **Alessandra Bridi**, formam minhas companheiras de almoços longos e, os mais frequentes, almoços corridos. Amigas que a graduação e o mestrado me deram e fizeram os dias ruins, bons, e os bons, melhores. Meu muito obrigado.

À minha família **Ziel Machado**, **Solange Machado**, **Thiago Machado** e **Sarah Machado** e o meu “grupo pequeno” “TBT”, que tem sido meu suporte espiritual, emocional, psicológico durante todos esses anos. E à minha melhor amiga e namorada, que esteve comigo nos piores momentos, tornando-os suportáveis e me incentivando, e nos melhores, **Gabriela Murizine**. Meu muito obrigado.

Todos foram essenciais, inigualáveis e insubstituíveis. Espero um dia poder ser para vocês o que foram para mim. Muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo # 2015/26818-5, CEUA nº3526250717. Também, processo # 2017/13973-8 e processo # 2017/02159-8).

RESUMO

MACHADO, L. S. **Indução da pluripotência celular e diferenciação *in vitro* no modelo suíno como modelo translacional.** [Induction of cell pluripotency and *in vitro* differentiation in swine as a translational model]. 79f. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Em 2006, Takahashi e colaboradores demonstraram ser possível a obtenção de células-tronco pluripotentes por indução gênica (*induced pluripotent stem cells* ou iPSCs). Desde o surgimento desta tecnologia diversos modelos animais foram gerados, ampliando as possibilidades de seu uso na pesquisa, como por exemplo, na criação de modelos para doenças genéticas humanas como esclerose lateral amiotrófica, autismo, esquizofrenia, doença de Parkinson e Alzheimer, além do aprimoramento de características relevantes para produção animal. O modelo suíno é considerado vantajoso sobre os outros modelos animais principalmente pela criação já bem estabelecida e similaridades fisiológicas com os humanos. O intuito deste projeto foi reprogramar fibroblastos embrionários suínos através do sistema integrativo à iPSCs, para então diferenciá-las em células progenitoras neurais (*neural progenitor cells*, NPCs). Para isso, os fibroblastos foram transduzidos com vetores contendo sequências humanas ou murinas dos genes *OCT4*, *SOX2*, *c-Myc* e *KLF4* (hOSKM ou mOSKM) para formação das iPSCs. Estas foram caracterizadas quanto a morfologia, presença de fosfatase alcalina, a expressão dos genes exógenos e endógenos (OSKM, *HS OCT4*, *OCT4*, *NANOG*) através de imunofluorescência e RT-qPCR e formação de corpos embrióides. Então foram submetidas durante 14 dias ao meio de indução neural sob matriz extracelular comercial, gerando células potencialmente similares às NPCs. Estas foram caracterizadas morfologicamente, por imunofluorescência das proteínas NESTINA, BETA TUBULINA III e VIMENTINA, além da expressão de *NESTINA* e *GFAP* por RT-qPCR. Foram produzidas com sucesso 3 linhagens de iPSC em diferentes estágios de reprogramação e células positivas para todos os marcadores neurais testados. Os resultados apresentados deverão contribuir para a utilização do modelo suíno em futuros estudos voltados à medicina regenerativa e translacional.

Palavras-chave: suíno, reprogramação celular, células pluripotentes induzidas (iPSCs), células progenitoras neurais.

ABSTRACT

MACHADO, L. S. **Induction of cell pluripotency and *in vitro* differentiation in swine as a translational model.** [Indução da pluripotência celular e diferenciação *in vitro* no modelo suíno como modelo translacional]. 79p. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

In 2006, Takahashi and collaborators reported the induction into pluripotency of somatic cells (induced pluripotent stem cells, iPSCs). Since then, this technique has much been developed; many animal models have been created opening a new series of opportunities in research. They enable the creation of models for human genetic diseases, for example, amyotrophic lateral sclerosis, autism, schizophrenia, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and the enhancement of relevant characteristics in agriculture. The swine model is considered to present many advantages over others, including the well-known production and maintenance and physiological similarities to humans. The aim of this project was to reprogram porcine embryonic fibroblasts (pEF) into iPSCs using the lentiviral integrative system, followed by its differentiation into neural progenitor cells (NPCs). The cells were reprogrammed using vector containing either the human sequences (hOSKM) or the mouse sequences (mOSKM) for the *OCT4*, *SOX2*, *c-Myc* and *KLF4* genes to form the iPSCs. They were characterized regarding the presence of the Alkaline Phosphatase enzyme, expression of exogenous and endogenous genes (OSKM, *HS OCT4*, *OCT4*, *NANOG*) through immunofluorescence and RT-qPCR, and embryoid body formation. Then, the cells were cultured with neural induction media for 14 days in commercial extracellular matrix, generating cells potentially like NPCs. Those were characterized regarding their morphology, immunofluorescence for NESTINA, BETA TUBULIN III and VIMENTINA and gene expression of *NESTINA* and *GFAP*. iPSCs were successfully reprogrammed, generating 3 cell lines at different stages of reprogramming and cells positive for all the neural markers tested were produced. The results shown will contribute to the use of the porcine model in future regenerative and translational medicine research.

Keywords: swine, porcine, cellular reprogramming, induced pluripotent stem cells (iPSCs), neural progenitor cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental	19
Figura 2 - Esquema representando o vetor lentiviral comercial STEMCCA.	22
Figura 3 - Mapas dos vetores auxiliares para produção lentiviral do vetor STEMCCA.	23
Figura 4 - Análise de fluorescência do plasmídeo FUGW por citometria de fluxo na pEF E1.	34
Figura 5 - Análise de fluorescência do plasmídeo FUGW por citometria de fluxo na pEF E2.	35
Figura 6 - Análise de fluorescência do plasmídeo FUGW por citometria de fluxo na pEF E3.	36
Figura 7 - Grupo controle FUGW GFP + em D4.	37
Figura 8 - Fibroblastos embrionários suínos	38
Figura 9 - Fibroblastos transduzidos com mOSKM e hOSKM em D4.	38
Figura 10 - Colônias observadas em D10.	39
Figura 11 - Teste de Fosfatase Alcalina em D11.	40
Figura 12 - Contagem e eficiência de geração de colônias encontradas nas diferentes placas P0 em gráfico	41
Figura 13 - Contagem das colônias encontradas no teste de FA em gráfico.	42
Figura 14 - Análise dos transcritos dos vetores exógenos humano (hOSKM) por RT-qPCR das linhagens em P8 e P11 ou P12.	44
Figura 15 - Análise dos transcritos do gene OCT4/POU5F1 endógeno por RT-PCR das linhagens em P8 e P11 ou P12.	44
Figura 16 - Análise dos transcritos do gene OCT4/POU5F1 endógeno por RT-PCR usando o valor de Δct de pEF como calibrador das linhagens em P8 e P11 ou P12.	45
Figura 17 - Análise dos transcritos dos genes NANOG suíno RT-qPCR das linhagens em P8 e P11 ou P12.	45
Figura 18- Análise dos transcritos do gene pNANOG endógeno por RT-PCR usando o valor de Δct de pEF como calibrador das linhagens em P8 e P11 ou P12.	46
Figura 19 - Caracterização por imunofluorescência da linhagem Col 1, Col 4 e Col 7 em P9.	50
Figura 20 - Caracterização por imunofluorescência da linhagem Col 1 em P11, Col 4 em P12 e Col 7 P11.	51
Figura 21 - Corpos embrióides formados de cada linhagem.	52
Figura 22 – NPCs e neurônios maduros derivadas de iPSCs humanas.	53
Figura 23 -Caracterização por imunofluorescência de neurônios maduros.	53
Figura 24 - Col 7 P12 e Col 4 P15, D0 da indução neuronal.	54
Figura 25 - Col 7 P12, D2 e D4 da indução neuronal.	55
Figura 26 - Col 4 P15, D2 e 6 da indução neuronal.	55
Figura 27 –Col 7 P12 e Col 4 P15 em D11.	56
Figura 28 - Morfologia da Col 7 em P14 em Matrigel em meio E8 e NIM em D4.	56
Figura 29 - NPC P1 proveniente da Col 4 P15, 1 dia após primeiro repique.	57
Figura 30 – NPC proveniente da Col 7 P12 em P2.	58
Figura 31– NPC proveniente da Col 4 P15 em P2.	58
Figura 32 - NPCs diferenciadas a partir de células de epiblasto suíno.	59
Figura 33 - Análise de expressão de pNESTINA nas amostras de NPCs.	60
Figura 34 - Análise de expressão de pNESTINA nas amostras de NPCs usando o valor de Δct de pEF como calibrador.	61
Figura 35 - Gel de agarose para produto de PCR, pNESTINA.	62
Figura 36 - Analise por RT-qPCR de pGFAP na NPCs.	63

Figura 37 -- Análise de expressão de pGFAP nas amostras de NPCs usando o valor de Δct de pEF como calibrador.....	64
Figura 38 - Caracterização por imunofluorescência da NPC P2 (C7P12).	65
Figura 39 - Análise da intensidade da imunofluorescência por citometria de fluxo. ..	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Sequência dos primers utilizados para caracterização das iPSCs.	31
Tabela 2 - Porcentagem de células positivas para fluorescência emitida pelas pEF GFP+.	36
Tabela 3 - Contagem e eficiência de geração de colônias encontradas nas diferentes placas P0.	40
Tabela 4 - Contagem das colônias encontradas no teste de FA.	41
Tabela 5 - Caracterização por imunofluorescência da linhagem Col 1, Col 4 e Col 7	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	HIPÓTESE	18
3	OBJETIVOS.....	18
3.1	Geral.....	18
3.2	Específicos	18
4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	19
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5.1	Amostras utilizadas	19
5.1.1	Coleta e cultivo de fibroblastos embrionários	20
5.2	Indução à pluripotência de fibroblastos suínos.....	21
5.2.1	Transfecção das células 293FT para produção lentiviral.....	21
5.2.2	Transdução lentiviral.....	24
5.2.3	Placas para cultivo.....	26
5.2.4	Repiques manual e com o reagente TrypLe Express	26
5.3	Caracterização das iPSCs suínas	27
5.3.1	Detecção da fosfatase alcalina.....	27
5.3.2	Detecção de proteínas OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1, TRA1-60, NESTINA, VIMENTINA e BETA III TUBULINA por imunofluorescência.....	28
5.3.3	Análise da expressão dos transcritos de relacionados a genes de pluripotência e de comprometimento neural	29
5.3.4	Formação de corpos embrióides	32
5.4	Diferenciação neuronal	32
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
6.1	Indução à pluripotência.....	33
6.1.1	Análise de eficiência da transdução	33
6.1.2	Análise da morfologia	37
6.1.3	Detecção da fosfatase alcalina.....	39
6.1.4	Manutenção em cultivo <i>in vitro</i>	43
6.1.5	Análise da expressão dos transcritos de relacionados a genes de pluripotência exógenos (OSKM) e endógenos (<i>pOCT4</i> , <i>NANOG</i>).....	43
6.1.6	Imunofluorescência	47
6.1.7	Formação de corpos embrióides	52
6.2	Diferenciação neuronal	52
6.2.1	Morfologia durante indução neural.	54
6.2.2	Expressão gênica de <i>NESTINA</i> e <i>GFAP</i> nas NPCS.	60
6.2.3	Marcação por imunofluorescência das proteínas NESTINA, BETA TUBULINA III e VIMENTINA.	64
7	CONCLUSÕES	67
8	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas com células-tronco têm sido desenvolvidas no decorrer dos anos por apresentarem um grande potencial em diversas áreas da saúde, sendo uma delas, a terapia celular. A obtenção de células pluripotentes foi por muito tempo dependente do isolamento destas a partir massa celular interna de embriões em estágio pré-implantacional. No entanto, seu uso apresenta grandes barreiras éticas e dificuldades imunológicas (rejeição) (PERA; REUBINOFF; TROUSON, 2000; WAKITANI et al., 2003; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

Em 2006, foi demonstrado ser possível a obtenção de células-tronco pluripotentes por indução gênica (*induced pluripotent stem cells* ou iPSC) a partir de fibroblastos de camundongos e de humanos adultos (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI et al., 2007). O surgimento desta técnica possibilitou novas estratégias de estudo e de tratamento de doenças. Tais células permitem a produção em larga escala de diferentes tipos celulares afetados provenientes de um paciente acometido por uma enfermidade específica, podendo, no futuro, possibilitar terapias baseadas em transplante celular (DIMOS et al., 2008), criação de linhagens celulares autólogas de pacientes, aumento na eficiência e na descoberta de novos fármacos e testes toxicológicos (ZAEHRES; SCHÖLER, 2007).

As células iPS foram geradas a partir de células diferenciadas que foram expostas a vetores retrovirais contendo genes os quais codificam um conjunto de fatores de transcrição para OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4 cuja expressão são responsáveis pela reprogramação. Em geral, após 30 dias sendo cultivadas em condições de cultivo similares às de células-tronco embrionárias, colônias de iPSCs foram isoladas e expandidas separadamente, sendo posteriormente observadas e comparadas com as células-tronco embrionárias via morfologia, expressão de marcadores específicos, expressão gênica e perfil epigenético (ZAEHRES; SCHÖLER; MARTIN, 2007; YU et al., 2007; LOWRY; PLATH, 2008; PICK et al., 2009; TROUNSON, 2009).

Dimos e colaboradores reportaram em 2008 a produção de células diferentes tipos celulares a partir de iPSCs de pacientes, as quais retinham o genoma de seu doador de origem, inclusive o polimorfismo referente à doença em questão (DIMOS et al., 2008). Tal tecnologia nos permite gerar tipos celulares relevantes que possibilitam

a formação ou o reparo de tecido danificado e a geração de novos modelos *in vitro* de síndromes ou doenças (KARUMBAYARAM et al., 2009). Por exemplo, estudos de enfermidades como Síndrome de Hutchinson-Gilford, síndrome do envelhecimento precoce ou Progeria têm sido beneficiados pelo modelo estabelecido com as iPSCs por se tratarem de doenças raras, e esta técnica permite uma maior reprodução laboratorial, assim como outras enfermidades (ZHANG et al., 2011, 2017; LI et al., 2016a; POON et al., 2016; TUBSUWAN et al., 2016).

Desde o surgimento das iPSCs avanços notáveis na área de indução à pluripotência já foram reportados. Diversos modelos animais foram gerados, ampliando ainda mais as possibilidades na pesquisa. Esses permitem a criação de modelos para doenças genéticas humanas, a manipulação genética de precisão com objetivos terapêuticos como transplantes e o aprimoramento de características relevantes para produção animal (WU et al., 2009). Como mencionado anteriormente, o modelo para camundongo e humano foi rapidamente estabelecido em 2006 e 2007. Em 2008, iPSCs foram obtidas de fibroblastos de orelha de macacos Rhesus (*Macaca Mulatta*) (LIU et al., 2008). Nos anos subsequentes modelos para outras espécies foram relatados: rato (LIAO et al., 2009), suíno (EZASHI et al., 2009; WU et al., 2009), suíno miniatura tibetano (ESTEBAN et al., 2009), sagui (WU et al., 2010), canino (SHIMADA et al., 2010), coelho (HONDA et al., 2010), ovino (BAO et al., 2011), equino (NAGY et al., 2011), bovino (Sumer et al., 2011), rinoceronte (BEN-NUN et al., 2011), búfalo (DENG et al., 2012), codorna (LU et al., 2012) e outros vertebrados não mamíferos e invertebrados (ROSSELLÓ et al., 2013).

O modelo suíno é considerado vantajoso sobre os outros modelos animais disponíveis e tem se tornado um dos modelos mais importantes e utilizados na pesquisa biomédica (DU et al., 2015; EZASHI; YUAN; ROBERTS, 2016). Ratos e camundongos são comumente utilizados como modelos animais pela facilidade de criação e manutenção em biotérios, porém, é sabido que a fisiologia destes animais difere mais da humana quando comparados a animais de maior porte. Ainda, pela sua curta vida é difícil obter conclusões sobre a segurança do uso das células iPS na prática. Primatas seriam a alternativa mais similar ao humano, porém, empecilhos como a difícil criação e manutenção em locais controlados tornam a utilização do modelo menos frequente (Esteban et al., 2009). O modelo suíno possibilita a realização de modificações gênicas complexas e precisas com intuito de estudar a terapia celular aplicada em animal de porte maior visando benefícios à biomedicina e

agropecuária (WEST et al., 2010). A fisiologia, morfologia e sistema imune semelhante ao do humano, inclusive no tamanho dos órgãos permitindo a extrapolação dos dados adquiridos, torna-o um modelo mais interessante biologicamente (EZASHI et al., 2009; WU et al., 2009; WEST et al., 2010; CONG et al., 2013; EZASHI; YUAN; ROBERTS, 2016; KIM et al., 2019). Além de ser um animal comum na produção animal tendo sua criação e manuseio já rotineiros e padronizados quando comparada a outros modelos animais, atualmente, já é utilizado na biomedicina. Por exemplo, sua insulina é usada no tratamento de diabetes humana, sua pele e válvulas em xenoenxertos, e há o interesse em xenotransplante. O suíno é considerado então um excelente modelo visando aplicações na agropecuária e biomedicina, importante para terapia regenerativa e o modelo ótimo para ensaios pré-clínicos com células iPS (ESTEBAN et al., 2009; CONG et al., 2013; LIAO et al., 2014; EZASHI; YUAN; ROBERTS, 2016).

Como demonstrado na revisão por Ezashi e colaboradores em 2016, até então foram publicados pelo menos 33 artigos sobre a geração de iPSCs a partir de suínos. Há divergências na metodologia utilizada como, por exemplo, a suplementação do meio (FGF2, LIF ou a mistura dos dois como suplemento principal). No entanto, mais de 80% dos artigos realizaram a reprogramação através de um vetor viral, sendo a maioria suplementado com FGF2. (EZASHI; YUAN; ROBERTS, 2016). O silenciamento dos genes exógenos geralmente resultou na perda da pluripotência. Não obstante, iPSCs suínas já foram diferenciadas em alguns tipos celulares como cardiomiócitos (LI et al., 2013), hepatócitos (ARAVALLI; CRESSMAN; STEER, 2012), fotorreceptores (ZHOU et al., 2011) e células neurais (WEST et al., 2013; KIM et al., 2019).

Uma das áreas que muito se beneficia com a tecnologia das iPSCs é a neurociência. O estudo dos mecanismos de enfermidades como Alzheimer e Parkinson é limitado, dentre outras dificuldades, pela pequena acessibilidade a tecidos afetados e à inabilidade de cultivar linhagens relevantes por longos períodos de tempo (VERMA; VERMA, 2011). Grande parte dos estudos em enfermidades como a esquizofrenia foi realizado com tecido cerebral post-mortem, geralmente não tão bem preservado e somente representativo do estágio final da doença. Com o advento das iPSCs, tornou-se possível o estudo da neurogênese e das mudanças fenotípicas em um estado mais inicial da mesma (PAULSEN et al., 2012). Em diversas enfermidades há a perda de neurônios motores, como na esclerose lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal e lesões na medula espinhal. Assim os maiores objetivos no uso das

iPSCs compreendem não somente a possibilidade de substituição dessas células, mas principalmente na criação de modelos *in vitro* de inúmeras enfermidades (KARUMBAYARAM et al., 2009). iPSCs diferenciadas em células neurais permitem a comparação de vias moleculares relevantes de doenças entre pacientes e indivíduos saudáveis (FALK et al., 2012). Como já tem sido feito, por exemplo, no estudo sobre a síndrome de Alzheimer (ISRAEL et al., 2012; LI et al., 2016b, 2016a; MUNGENAST; SIEGERT; TSAI, 2016; TUBSUWAN et al., 2016). Então, estudos utilizando iPSCs suínas na neurociência se tornaram de grande significância devido à grande similaridade, como por exemplo, de seu girencéfalo com ao dos humanos, tanto em tamanho quanto em composição (LIND et al., 2007; WEST et al., 2013; KIM et al., 2019).

O uso dessa ferramenta aplicada a análise de patogenias moleculares de síndromes neurológicas em neurônios e células da glia derivadas a partir de iPSCs criaram a demanda por protocolos que permitam a reprodutibilidade e cultivo em maior escala de células neurais (FALK et al., 2012). Células progenitoras neurais (*neural precursor cells*, NPCs), são células multipotentes capazes de auto replicação e de se diferenciarem em células como neurônios, células da glia, astrócitos e oligodendrócitos (PINCUS et al., 1998). Estas células são uma ferramenta especialmente adequada para modelos de doenças neurodegenerativas e estudos sobre a neurobiologia devido sua alta reprodutibilidade, facilidade de manejo no cultivo celular, grande expansibilidade e comparabilidade (FALK et al., 2012). Sua importância e aplicações no estudo de enfermidades como a doença de Parkinson, tumores cerebrais e outras desordens já foram evidenciadas (BENEDETTI et al., 2000; LE GRAND et al., 2015; WALTER; NICKELS; SCHWAMBORN, 2017).

Reconhecendo as vantagens que o modelo suíno traz à pesquisa nas diferentes áreas da biomedicina e agropecuária, e a importância e necessidade de mais estudos na reprogramação de células pluripotentes induzidas, este projeto tem como objetivo a realizar a reprogramação de fibroblastos embrionários suínos em iPSCs pelo uso de vetores lentivirais e a subsequente diferenciação neuronal em NPCs. Tal feito permitirá o uso das mesmas no estudo de aplicações agrônômicas e/ou biomédicas.

2 HIPÓTESE

A indução e manutenção *in vitro* de fibroblastos embrionários suínos (*porcine embryonic fibroblasts*, pEFs) à pluripotência é possível e estas células são capazes de serem diferenciadas em células progenitoras neurais (*neural precursor cells*, NPCs)

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Gerar células pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de pEFs e as diferenciar em NPCs.

3.2 Específicos

- Gerar iPSCs suínas através do mecanismo integrativo e avaliar sua eficiência de geração e manutenção das iPSCs
- Caracterizar as iPSCs geradas em relação à pluripotência (morfologia, detecção de fosfatase alcalina, imunofluorescência de OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1, TRA-1-60, expressão de genes de pluripotência OSKM, *OCT4* exógeno e endógeno, *NANOG* e a formação de corpos embrióides.
- Realizar a diferenciação das iPSCs geradas em NPCs *in vitro* e sua caracterização pela morfologia, imunofluorescência e expressão gênica dos marcadores NESTINA, BETA TUBULINA III, GFAP e VIMENTINA.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Figura 1 - Delineamento experimental

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Ilustração demonstrando delineamento experimental onde foram utilizadas 2x10⁴ pEFs, estas induzidas à pluripotência por via de vetor viral tendo o vetor FUGW como controle da integração. Além disso, indica duração e o meio para o cultivo utilizado nos diferentes momentos do processo, assim como onde as células foram cultivadas *mouse embryonic fibroblasts* (MEFs) ou Matrigel. Sendo caracterizadas em estado de iPSCs e células semelhantes a NPCs (NPCs-like).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Amostras utilizadas

Os fibroblastos utilizados no projeto foram provenientes de 3 embriões coletados provenientes de experimentos em colaboração com a Dra. Naira Caroline Godoy Pieri. Estes procedimentos foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (CEUA nº 5130110517).

5.1.1 Coleta e cultivo de fibroblastos embrionários

Foram coletados 3 embriões de fêmeas prenhes de suínos domésticos (*Sus scrofa*), linhagem comercial híbrida DB-90 (DB Genética Suína, Patos de Minas-MG) alojadas nas dependências do Núcleo de Pesquisa em Suínos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (NPS-FMVZ/USP) - Campus da USP "Fernando Costa", Pirassununga. Respeitando as exigências determinadas pelo o NRC (1998), as fêmeas utilizadas eram alimentadas 2 vezes por dia com ração peletizada comercial Agroceres Multimix® e o acesso água por bebedouros do tipo chupeta, *ad libitum*. Somente as que apresentaram três ou mais ciclos estrais, com idade de aproximadamente 220 dias e peso corporal de ± 130 kg foram submetidas à inseminação artificial, e após o período da gestação citados abaixo foram eutanasiadas.

Para a coleta do material, foram preparadas soluções de tampão fosfato-salino (do inglês, *phosphate buffer saline*, PBS) adicionadas de 2% de penicilina/estreptomicina (cat. # 15140-122, Gibco) e a solução de collagenase (0,0040g/ml, Sigma-Aldrich). O PBS foi composto por fosfato de sódio dibásico monobásico (Na_2HPO_4) -PM:141,96 e cloreto de sódio (NaCl) -PM: 58,44, pH 7.2. As concentrações utilizadas foram: 10 mM de Na_2HPO_4 , 137 mM de NaCl , 2.7 mM de KCl , 1.8 mM de KH_2PO_4 . A collagenase (cat. # C2674-1G, Sigma Aldrich) foi diluída (0,040g/mL) em meio IMDM (cat. # 12200-036, Gibco), sem soro fetal bovino. Os embriões foram coletados no período gestacional de 24 dias. Eles tiveram a cabeça, órgãos e membros removidos. O material coletado de cada animal foi individualmente lavado com tampão fosfato salino, picado com o auxílio de lâminas de bisturi, para então, ser imerso em 5 ml por 3h a 38,5°C em solução de collagenase. Após incubação, as soluções foram centrifugadas por 5 minutos à 300 g e ressuspensas em meio Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; cat. # 12200-036, Gibco) suplementado com 20% Soro Fetal Bovino (FBS; cat. # 10099, Gibco) e 1% de antibiótico descrito anteriormente. Foi realizado mais um passo de lavagem, ao centrifugar e ressuspender essas soluções mais uma vez, para então serem plaqueadas em garrafas de cultivo de 25 cm² (T25, cat. # 431463, Corning) e incubadas a 38,5 °C com 5% de CO₂. Cada embrião coletado deu origem a uma linhagem de fibroblas embrionários suíno (*porcine embryonic fibroblasts*, pEFs), estas foram nomeadas pEF E1, pEF E2 e pEF E3. Elas foram cultivadas até atingirem 80%

de confluência e então replaqueadas em uma garrafa de cultivo maior (T75, cat. # 431464U, Corning).

Os fibroblastos fetais murinos (*mouse embryonic fibroblasts*, mEFs) utilizados neste projeto foram coletados de maneira semelhante à forma descrita. No entanto, eles foram isolados anteriormente e armazenado a -80°C até seu uso posterior.

Tanto o cultivo dos fibroblastos fetais suínos (*porcine embryonic fibroblasts*, pEFs) quanto de camundongos foi realizado em garrafas de cultivo de 75 cm² (T75, cat. # 431464U, Corning). O meio utilizado era composto por IMDM (cat. # 12200-036, Gibco) suplementado com 10% soro fetal bovino (cat. # 12657-029, Gibco), 1% aminoácidos não essenciais (cat. # 11140-050, Gibco) e 1% de antibiótico (cat. # 15140-122, Gibco). As trocas de meio foram realizadas com 1 dia de intervalo entre elas.

As pEFs foram utilizadas na reprogramação celular à pluripotência. Interessantemente, pEF E3 apresentou uma velocidade menor em relação às outras para que atingisse a confluência de 80% no cultivo, sendo necessária mais tempo e passagens para que número de células necessário fosse alcançado para a transdução. Já as mEFs, após incubadas com mitomicina por 2:30 horas, foram usadas no revestimento de placas de 6 poços (cat. # 3516, Costar) juntamente com gelatina (cat. # G1393, Sigma Aldrich), ambos procedimentos descritos em detalhes nos tópicos seguintes.

5.2 Indução à pluripotência de fibroblastos suínos

5.2.1 Transfecção das células 293FT para produção lentiviral

A transfecção se refere à inserção dos plasmídeos de interesse e seus auxiliares em células para, neste caso, que ocorra a formação de lentivírus a partir da expressão do plasmídeo, o qual será responsável pela indução dos fibroblastos ao estado de pluripotência. Os vetores utilizados foram vetores lentivirais poliestrônicos excisáveis STEMCCA (Stem Cells Cassette, Sommer et al., 2009) contendo os fatores de transcrição OCT4, SOX2, c-MYC e KLF4 murino (mOSKM) ou humano (hOSKM). Os plasmídeos auxiliares consistiram nas construções contendo as sequências TAT, REV, HGPM2 e VSVG2 (BRESSAN, 2013).

Figura 2 - Esquema representando o vetor lentiviral comercial STEMCCA.

Fonte: <https://www.bio-connect.nl/stemcca-lentivirus-reprogramming-kits/cnt/page/4648>. Acessado dia 12 de novembro às 23:25.

Legenda: Esquema representando construção do vetor policitrônico STEMCCA. Imagem obtida do site da Bio Connect faz referência a construção do STEMCCA, sendo que a construção possui também sítios loxp para excisão mediada pela enzima Cre.

Figura 3 - Mapas dos vetores auxiliares para produção lentiviral do vetor STEMCCA.

Fonte: Tese de mestrado (BORGES C.M., 2016).

Legenda: Esquemas dos vetores auxiliares para produção lentiviral do STEMCCA. **A:** VSVG. **B:** REV. **C:** TAT. **D:** GAG/POL (Hgpm2).

As partículas lentivirais foram produzidas por meio da lipofecção de células renais embrionárias humanas (293 FT) (cat. # R70007, Invitrogen) com o reagente Lipofectamina 3000 (cat. # L3000-015, Invitrogen). No processo de transfecção foram utilizados 36µL de Lipofectamina 3000, juntamente com 36uL do reagente p3000 e os DNAs do mSTEMCCA ou hSTEMCCA, além dos vetores auxiliares REV, TAT, HGPM2, VSVG2 nas respectivas quantidades: 12;1,2; 1,2; 1,2; 2,4 µg/10ml de produção viral final. Tais soluções de Lipofectamina e DNAs foram feitas em 1,5 ml de meio IMDM desprovido de soro e antibiótico separadamente e misturadas após 5

minutos de incubação em temperatura ambiente. Após a mistura, a solução resultante foi incubada por mais 15 min. Por fim, 3 ml desta foram transferidos para garrafas T75 contendo 7 ml de meio IMDM (com soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina a 1%) e 5×10^6 células 293 FT, plaqueadas 24 horas antes de modo a apresentar 90% de confluência no momento da transfecção, sendo nas quais o lentivírus é montado usando o maquinário de transcrição celular.

Após 24, 48 e 72h o meio foi trocado e o sobrenadante contendo o vírus, coletado e filtrado (filtro 0.45mm, cat. # SLHV033RS, Millipore). Em seguida, foi centrifugado a 4°C em uma ultracentrífuga (Beckman Coulter) por 1h30min a 48960 G no rotor SW28. Uma vez terminada a centrifugação, os tubos foram incubados na geladeira por 1 hora. Em seguida, pelo pellet formado não ser visível, o meio foi cuidadosamente descartado, para então o pellet ser ressuspensionado no resquício de meio remanescente no tubo. Para garantir a homogeneização e a ressuspensão, foram cuidadosamente repetidos 100 vezes o movimento de homogeneização com a pipeta. Os tubos com os mesmos vetores, mas coletados em horários diferentes foram misturados em uma única solução, homogeneizados, aliquotados na quantidade de 50µL e armazenados no freezer a -80 °C.

Como controle da transfecção, este protocolo também foi realizado simultaneamente em células das mesmas linhagens que não foram transfectadas com o vetor OSKM, mas sim com o plasmídeo FUGW (plasmid # 14883, Addgene). Assim, foi possível a averiguação da emissão de fluorescência verde por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo. O vetor lentiviral FUGW foi produzido segundo o protocolo do kit comercial Virapower Lentiviral kit da Invitrogen/ Thermo, https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/virapower_lentiviral_system_man.pdf) após adaptações. Foram utilizados o vetor FUGW e os vetores auxiliares pLP1, pLP2, pLP/VSVG nas respectivas quantidades: 5; 1,2; 1,2; 2,4 µg/10ml de produção viral final.

5.2.2 Transdução lentiviral

Esta etapa consiste na incubação dos fibroblastos embrionários suínos (*porcine embryonic fibroblastos*, pEFs) com as partículas virais formadas na transfecção. Foram utilizados vírus de duas produções virais diferentes, uma produzida previamente a este projeto (já utilizada com sucesso na produção de iPSCs no

laboratório) e uma produzida durante o decorrer deste projeto. As linhagens pEF E1 e E2 foram transduzidas na quarta passagem (P4) com o concentrado viral da primeira produção, e a E3 na nona passagem (P9, devido sua velocidade mais lenta de crescimento mencionado anteriormente) com da segunda. Com a impossibilidade das 3 linhagens de pEF serem transduzidas com vírus da mesma produção, o controle com o plasmídeo FUGW foi realizado em todas as 3 com o vírus da segunda produção viral, demonstrando a integração e capacidade de expressão do vetor exógeno em cada uma delas em uma mesma condição, com o concentrado viral não testado até então.

Para transdução, foram plaqueados 2×10^4 fibroblastos em passagem 4 em placas de 6 poços (cat. # 3516, Costar) em meio utilizado para pEFs (descrito anteriormente), o suficiente para que em atinssem aproximadamente 50% de confluência no dia seguinte. Neste, foram adicionados em cada poço 8ng/ml de polibreno (cat. # brometo de hexadimetrina, Sigma Aldrich-Aldrich Corp.). Assim, em cada poço da placa foi adicionado 50µL do concentrado viral, e os fibroblastos foram expostos ao vírus por aproximadamente 3:30 horas (no caso da E1 e E2, tempo otimizado de pesquisas prévias com este concentrado) ou 14 horas (no caso da E3, sendo *overnight* o tempo padrão para este protocolo). Após este período, o meio foi devidamente descartado e novo meio desprovido de vírus foi repostado. O dia no qual os fibroblastos foram expostos ao vírus foi considerado D0.

Entre D5 e 7 (dias pós-transdução), as células foram submetidas à dissociação pelo reagente TrypLE Express (cat. # 12604-021, Gibco), sendo repicadas mais cedo (D5) quando apresentassem uma confluência maior do que 80%. Mais especificamente, E1 em D5 enquanto E2 e E3 em D7. 500 µl a 1ml de TrypLE Express foi adicionada em cada poço. Estes foram incubados a 38,5°C por 5 minutos na incubadora, em seguida lavados com a própria TrypLE, centrifugadas por 5 minutos a 300g e então contadas através de uma câmara de Neubauer. 2×10^4 células foram transferidas para placas novas onde os poços foram previamente revestidos com uma camada de 0.1% de gelatina (cat. # G1393, Sigma Aldrich) e plaqueados com 1×10^5 de mEFs mitoticamente inativadas. As células transferidas a esta nova placa foram classificadas como passagem 0 (P0). Elas foram cultivadas em meio composto por KnockOut DMEM/F-12 (cat. # 12660-012, Gibco) suplementado com 20% de substituto de soro knockout (*knockout serum replacement*, KSR, cat. # 10828-028, Gibco), 0,1mM aminoácidos não essenciais (cat. # 11140-050, Gibco), 1mM

glutamina (cat. # 25030-081, Gibco), 0,1mM B-mercaptoetanol (cat. # 21985-023, Gibco), 10ng/ml de fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) (cat. # 100-18B, Peprotech) e 1% de penicilina/estreptomicina (cat. # 15140-122, Gibco). Com 1 dia de intervalo, o meio foi trocado até que surgissem colônias e fosse realizado o repique manual para uma nova placa revestida de mEF em gelatina.

5.2.3 Placas para cultivo

As placas utilizadas foram cobertas com gelatina e plaqueadas com fibroblastos fetais de camundongos (*mouse embryonic fibroblasts*, mEFs) mitoticamente inativadas.

A gelatina (cat. # G1393, Sigma Aldrich) foi aquecida a 37°C, diluída a concentração de 0,1%, autoclavada e mantida a 4°C. Quando necessário a geração de novas placas, os poços da mesma foram incubados com 1ml ou 250µL de gelatina a 0,1% por 20 por minutos na estufa (37°C e 5% de CO₂) em poços de uma placa de 6 poços ou 24 poços, respectivamente. Então, a gelatina foi removida e 500µL foi adicionado na placa de 24 poços ou 2ml, na de 6 poços de meio para fibroblastos.

Para inativar o processo mitótico nos fibroblastos estes, repicados no dia anterior, foram incubados com Mitomicina C (cat. # M4287-2MG, Sigma Aldrich Aldrich) na concentração de 0,5 mg/ml, por 2:30 horas em uma T75 com 10 ml de meio mEF. Após a incubação, as células foram dissociadas enzimaticamente, contadas e plaqueadas de acordo com o tamanho do poço em questão; 1×10^5 em cada poço de uma placa de 6 poços e $1,6 \times 10^4$ em poços de placas com 24 poços.

5.2.4 Repiques manual e com o reagente TrypLe Express

A reprogramação celular ocorre de maneira não homogenia nas células, podendo estas se encontrarem em diferentes estágios. O repique manual permite isolar colônias em novos poços distintos assegurando que todas as colônias que ali surgirem sejam derivadas de uma só colônia, logo, geneticamente similares umas às outras e em mesmo estágio de reprogramação, formando linhagens de iPS clonais.

Com o surgimento de colônias em P0, essas foram manualmente transferidas no fluxo laminar, em um microscópico de luz invertida, com auxílio de agulhas de

insulina para corte e fixação das colônias em novos poços individuais, sendo assim consideradas em P1. Após o primeiro repique, as células foram transferidas para uma nova placa toda vez que apresentassem características morfológicas de colônias pluripotentes e ocupassem maior parte do campo na objetiva de 10x no microscópio, no entanto, ainda antes de se tornarem grandes o suficiente para entrar em contato com outras colônias.

Pelo menos 6 colônias de cada grupo foram escolhidas em P0, as quais eram individualmente transferidas e fixadas para que ela fosse a única presente no novo poço P1. Dependendo de seu tamanho, a colônia muitas vezes foi segmentada em fragmentos menores. Em seguida, cada poço P1 foi nomeado e enumerado como “Colônia” de 1 (Col 1) a até o número de colônias repicadas. Os repiques subsequentes foram realizados através da dissociação com TrypLE Express (cat. # 12604-021, Gibco) a nomeação foi mantida, porém no número da passagem era acrescido de 1, como por exemplo, “Col 1 P2”.

Para os repiques dissociativos, de 500 µl de TrypLE Express foi adicionado em cada poço. Após 3 minutos de incubação no fluxo laminar, os poços eram lavados com a própria solução e, em seguida, centrifugados por 5 minutos a 300g. Somente 10% do volume era replaqueado para novos poços previamente revestidos com gelatina e mEFs.

5.3 Caracterização das iPSCs suínas

A caracterização das células pluripotentes induzidas suínas (piPSCs) consistiu nas análises de morfologia, detecção da fosfatase alcalina, imunofluorescência, análise de expressão gênica por RT-qPCR e diferenciação in vitro por formação de corpos embrióides.

5.3.1 Detecção da fosfatase alcalina

Para confirmar a expressão da fosfatase alcalina nas piPSCs foi utilizado o kit comercial *Leukocyte Alkaline Phosphatase kit* (cat. # 86R, Sigma Aldrich). Esta enzima não está presente na maioria dos tecidos em um indivíduo adulto, no entanto, sua presença é clara em tecidos pluripotentes sendo este um dos primeiros testes

padrões para avaliação da aquisição de pluripotência. O kit consiste em passos de fixação e lavagens com dH₂O para depois a adição de Naphtol AS-BI indicando a presença e atividade da enzima fosfatase alcalina com a formação de precipitados vermelhos, visualizados no microscópio. O fixador é composto de 0,5 ml de solução de citrato, 1,3 ml de acetona e 0,16 ml de formaldeído 37% (2 ml totais sendo usado 1 ml por poço de placa de seis poços). Incubou-se o fixador no poço por 30 minutos à temperatura ambiente e em seguida o poço foi lavado com dH₂O por 45 segundos. Em um microtubo foram misturados por inversão 44,4µl de NaNO₃ e 44,4µl de solução de FRV-alcalina deixando-os equilibrar por 2 minutos para em seguida serem adicionados 2 ml de dH₂O e, no escuro, 44,4µl de Naphtol AS-BI. A solução, após aplicada nas células, deve ser protegida da luz e durante sua incubação de 15 minutos à temperatura ambiente para, então, ser analisada via microscopia.

5.3.2 Detecção de proteínas OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-1, TRA1-60, NESTINA, VIMENTINA e BETA III TUBULINA por imunofluorescência.

Os protocolos foram baseados nos descritos por Souza em 2018 (DE SOUZA et al., 2018) . Os cultivos foram fixados em PFA 4% por 10 minutos e mantidos a 4°C em tampão fosfato salino (PBS) pH 7.4. As células foram permeabilizadas com 0,5% Triton X por 20 minutos e foram incubados em solução de bloqueio com 1% albumina do soro bovino (BSA, cat. # A2153, Sigma Aldrich) e 0,05% de Tween-20 diluídos em PBS por 1h em temperatura ambiente. Então, foram incubadas com anticorpo primário OCT4 (1:100; cat. # SC8628, Santa Cruz biotechnology), SOX2, NANOG (1:100, 1:200, cat. # ab97959; cat. # ab77095, abcam), TRA1-60 (1:500, cat. # MAB4360, Millipore), SSEA1 (1:50, cat. # MAB4301, Millipore), NESTINA (1:500, cat. # ABD69 Millipore), VIMENTINA (1:250, cat. # ab8069, abcam) e BETA III TUBULINA (1:500, cat. # ab7751, abcam) por 16 horas a 4°C. Posteriormente, lavadas com PBS e 0,05% Tween-20 e incubadas com os anticorpos secundários goat anti-rabbit 488, donkey anti-goat 488, goat anti-mouse 594 (1:500, cat. # A11008, cat. # A11055, cat. # A21044, Invitrogen) por 1 h em temperatura ambiente. Por fim, as células coradas com Hoechst (1:1000) e lavadas com PBS e analisadas por microscopia de fluorescência utilizando um microscópio de epifluorescência (ECLIPSE 80i, Nikon). Como controle negativo foram realizadas omissões do anticorpo primário e a utilização

da amostra pEF E1 na marcação para as proteínas relacionadas à pluripotência, sendo estes negativos como esperado.

5.3.3 Análise da expressão dos transcritos de relacionados a genes de pluripotência e de comprometimento neural

A análise de expressão gênica foi baseada no protocolo descrito por Souza (DE SOUZA et al., 2018) para a caracterização de iPSCs. Portanto, as células suínas antes (controles) e após o período de reprogramação *in vitro* foram submetidas a análise de expressão gênica dos genes alvos de grande importância na reprogramação, pluripotência (*hsOCT4*, *pOCT4*, *NANOG*) e comprometimento com diferenciação neuronal (*NESTINA* e *GFAP*).

As sequências de primers utilizados permitem a distinção entre os genes de pluripotência presentes no vetor exógeno (como o *OCT4* presente no vetor humano, sendo este referido como *HS OCT4*) e a versão própria da célula transduzida do mesmo gene, a versão endógena (*porcine OCT4*, *pOCT4*). Assim, é possível analisar qual, quanto e quando cada um dos genes está sendo expresso durante a reprogramação celular.

5.3.3.1 Extração de RNA

A extração de RNA se iniciou com a formação do pellet das células em cultivo. Foram utilizados um pellet de cada amostra seguinte: fibroblastos embrionários suínos em P4 (E1 e E2) e P9 (E3), fibroblastos embrionários murinos em P27, as células pluripotentes induzidas linhagens Col 1 (P8 e P11), Col 4 (P8, P12 e P17), Col 7 (P8, P11 e P14) e células similares a precursoras neurais (P0 e P1). Para formação do pellet, todas foram centrifugadas a 700g por 5 minutos, ressuspensas em dPBS e centrifugadas novamente. Em seguida, todo o sobrenadante era descartado e o pellet congelado em nitrogênio líquido instantaneamente. Estes, então, eram armazenados a -150°C até a realização do protocolo de extração.

O RNA total das amostras foi isolado usando o reagente Trizol (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. A cada pellet de amostra foi adicionado 900 µl de Trizol, 10 µl de acrilamida linear e 90 µl de água milli-q. Essa mistura foi incubada por 2 minutos em temperatura ambiente para então ser nela

adicionada 100 µl de gDNA Eliminator Solution. A solução foi homogeneizada vigorosamente por 15 segundos. 180 µl de clorofórmio foram inseridos à solução e novamente, esta foi homogeneizada como no passo anterior e incubada por mais 2 minutos. Em seguida, a mistura foi submetida à centrifugação à 12.000g por 15 minutos, 4°C. Com a separação de fases da amostra em aquosa (aquela que retém o RNA), intermediária e rósea e orgânica, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de centrifugação. 500 µl de álcool isopropílico 100% refrigerado foi adicionado ao novo tubo, homogeneizado, seguido de uma incubação de 10 minutos em temperatura ambiente e 2 horas em -80°C. Após a remoção das amostras do freezer e seu descongelamento em temperatura ambiente, elas foram centrifugadas à 12.000 G por 10 minutos, 4°C. O sobrenadante foi removido e 1 ml de álcool 75% foi adicionado. A mistura foi homogeneizada vigorosamente e centrifugada a 7.500g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet ressuspendido em 15 µl de água sem RNase.

A concentração e pureza do material coletado foi obtido pela análise no espectrofotômetro Nanodrop (Nanodrop ND-1000, Nanodrop Technologies, Inc.) com a finalidade de normalizar as reações de síntese de cDNA. Esta foi realizada com o kit HighCapacity (cat. # 4368814, Life Technologies), sendo preparada uma solução composta por 0,25 µl de Rnase out (cat. # 10777019, Life Technologies), 1 µl de DNase e 1 µl de Buffer provenientes do kit, 1000 ng de RNA da amostra mais a quantidade suficiente de água totalizando 10 µl. Esta foi incubada por 15 minutos à 25°C. Então, 1 µl de EDTA foi adicionado à solução e submetida uma nova incubação de 10 minutos à 65°C. Na etapa subsequente, foi adicionada à amostra 10 µl de uma mistura composta por 2 µl de Buffer, 2 µl DNTP mix, 3.2 µl de água ultrapura, 1 µl de Rnase out, 1 µl Multiscript e 2 µl de RT Random primers. Totalizando 21 µl, a solução contendo a amostra foi submetida à reação contendo os seguintes parâmetros: 10 minutos à 25°C, 120 minutos à 37°C, 5 minutos à 85°C e um passo final de 4°C para preservação do produto da reação. O material foi então armazenado à -20°C.

5.3.3.2 Reação polimerase em cadeia em Tempo Real (RT-qPCR)

Para as análises de RT-qPCR, primeiramente foi realizada a validação dos primers conforme Souza (DE SOUZA et al., 2018). A sequência de primers *pOCT3/4*, *NANOG*, *MS-OCT3/4* e *HS-OCT3/4* (Tabela 1) foram desenhados utilizando o

programa *Primer 3 plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) (Tabela 1). Após a validação prosseguiu-se com as análises de qPCR usando SYBR Green Master Mix (Cat# 4367659, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA). As reações foram realizadas no instrumento 7500 Fast Real-time PCR system (Applied Biosystems) sob as condições de fase pré-ciclo foi mantida a de 95°C por 10 minutos, sendo 40 ciclos: desnaturação, aumento de temperatura e separação da fita dupla (95°C, 15 minutos), seguido do anelamento dos primers na região homologa no cDNA (60°C por 1 minuto) e por fim a curva de dissociação 72°C, por 45 segundos). Como controle negativo das reações foram realizados dois controles, um com a mesma reação sem a adição da amostra de cDNA, e um segundo com a utilização do cDNA de fibroblastos suínos na passagem 4. Todas as reações foram realizadas em duplicata. Para a confirmação da especificidade dos primers foram realizados os sequenciamentos pela empresa Helixxa Serviços Genômicos.

Tabela 1– Sequência dos primers utilizados para caracterização das iPSCs.

Genes	Sequência de Primer Forward	Sequência de Primer Reverse	Produto de pcr (pb)	Anelamento (°C) Forw/Rev
pGAPDH	GTCGGTTGTGGATCTGACCT	ACCAGGAAATGAGCTTGACGA	221	59,39 / 59,65
pB-ACTIN	GAAGATCAAGATCATCGCGCCT	GTGGAATGCAACTAACAGTCCG	177	60,87 / 59,84
hOSKM	AAGAGGACTTGTTGCGGAAA	GGCATTAAAGCAGCGTATCC	182	57,66 / 57,31
pOCT4	GGGTTCTCTTTGGGAAGGTGT	CTCCAGGTTGCCTCTCACTC	244	59,85 / 59,75
pNANOG	TCCTTCCTCCATGGATCTGCT	GGGTCTGCGAGAACACAGTT	155	60,34 / 60,25
pNESTINA	GGAGAAACAGGGCCTACAGA	GCTCCAACCTTAGGGTCCAAGA	191	58,72 / 59,37
pNESTINA	GGCTTCTCTCAGCATCTTGG	AAGGCTGGCATAGGTGTGTC	150	58,33 / 60,04
pGFAP	TGCAGATCCGAGAAACCAGC	GGAACGCGAGTCTGGGAAAA	244	60,39 / 60,60
pGFAP	TTGACCTGCGACGTGGAGTC	AGGTGGCGATCTCGATGTCC	223	62,42 / 61,74

O método empregado para a análise foi a normalização utilizando a média geométrica da expressão do controle endógeno *GADPH* e *Beta ACTIN* empregando a metodologia de $2^{-\Delta Ct}$, também empregando para a duplicata da amostra do gene em questão, para então dividir $2^{-\Delta Ct}$ da amostra pelo dos genes endógenos (PFAFFL, 2001).

5.3.4 Formação de corpos embrióides

Placas de cultivo de 24 poços foram tratadas previamente com 0,6% de agarose autoclavada. Após a solidificação, as células piPSCs foram repicadas e cultivadas em meio DMEM/F12 knockout suplementado com 20% KSR e 0,1mM aminoácidos não essenciais (NEAA, Invitrogen), 1mM L-glutamina, 0,1mM b-mercaptoetanol e 1% penicilina/estreptomicina sem a adição bFGF, com troca de meio a cada 2 dias (Baird et al., 2015). Com 24 horas, foi observado a formação de corpos embrioides de menor tamanho, no entanto, estes foram cultivados por mais 6 dias para expansão dos mesmos. Então as células foram dissociadas com TrypLE Express, divididas em 3 poços de uma placa de 6 poços, onde foram cultivadas com meio Modified Dulbecco's Medium (IMDM; cat. # 12200-036, Gibco) suplementado com 20% Soro Fetal Bovino (FBS; cat. # 10099, Gibco) e 1% de antibiótico descrito anteriormente.

5.4 Diferenciação neuronal

Esse protocolo de diferenciação foi baseado nos protocolos desenvolvidos e aperfeiçoados por Shi e colaboradores, e Rasmussen e colaboradores (SHI; KIRWAN; LIVESEY, 2012; RASMUSSEN et al., 2014). De 3 a 5×10^6 células foram repicados (sendo repicado a maior quantidade sempre que possível) para cada poço de uma placa de 6 poços previamente cobertos por uma camada de matriz extracelular comercial, Matrigel (cat. # 354277, Corning), em meio E8 (cat. # A15169-01, Gibco) adicionado de seu suplemento e 5ml de penicilina/estreptomicina (cat. # 15140-122, Gibco).

No dia seguinte, o meio foi substituído por meio de indução neural, o qual consiste de DMEM/F12 mais Neurobasal medium, N2 e B-27 sem vitamina A (todas da Life Technologies), 1mM Glutamax e de penicilina/estreptomicina adicionados também dos inibidores SMAD LDN193189 (0.2 μ M, Sigma-Aldrich) e SB431542 (10 μ M, Stemgent). As células foram passadas (1:3) pelo uso da StemPro Accutase (cat. # A11105-01, Gibco), após 14 dias, para uma placa coberta com Matrigel e cultivada com o meio mencionado anteriormente, no entanto, desprovido de ambos inibidores e adicionado 20ng/ml de EGF (cat. # E9644-2MG, Sigma) e 20 ng/ml bFGF (cat. # 100-18B, Peprotech). Em seguida, o RNA das mesmas foi coletado e parte das células

foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% para caracterização por imunofluorescência.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Indução à pluripotência

6.1.1 Análise de eficiência da transdução

Três linhagens de fibroblastos embrionários (pEF, *porcine embryonic fibroblastos*) foram utilizados para a realização dos experimentos, estas foram nomeadas como pEF E1, pEF E2 e pEF E3. E1 e E2 encontravam-se na quarta passagem (P4) e E3, na nona (P9, devido sua velocidade mais lenta de crescimento mencionado anteriormente). Os pEFs foram submetidos ao protocolo de transdução com plasmídeos lentivirais policistrônicos STEMCCA contendo os fatores de transcrição humanos (hOSKM) ou murinos (mOSKM). Simultaneamente como controle do processo, células das mesmas amostras foram transduzidas com o plasmídeo FUGW que contém em sua composição o gene da proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*, GFP).

Após a inserção dos plasmídeos nos fibroblastos (D0), as células foram cultivadas de acordo como o descrito no item Material e Métodos. Após 2 dias da transdução (D2), foi possível detectar a fluorescência verde pelas células por citometria de fluxo (BD FACSAria, Beckton-Dickinson) (Figuras 4, 5 e 6). A expressão da GFP permitiu a confirmação do sucesso do protocolo de transdução, demonstrando integração e expressão de um vetor exógeno. Os gráficos à direita (**A** e **C**) distinguem as células por tamanho e complexidade, permitindo-nos delimitar duas populações celulares. A população de menor tamanho e complexidade presente no espaço inferior esquerdo do gráfico em sua maioria representa células mortas e debris celulares. Os gráficos à esquerda (**B** e **D**) nos permitem avaliar o grau de emissão de fluorescência emitida nas células não transduzidas (controle) e transduzidas com FUGW. Assim, podemos observar que nas três linhagens as células emitem uma fluorescência maior que em seu controle (Figuras 4, 5 e 6), indicando alta presença de GFP (Tabela 2).

Figura 4 - Análise de fluorescência do plasmídeo FUGW por citometria de fluxo na pEF E1.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Análise por citometria de fluxo do grupo controle e FUGW+ de pEF E1. **A.** Gráfico (*dotplot*) do tamanho (FSC, eixo x) *versus* complexidade (SSC, eixo Y) da população celular no grupo controle (pEF E1 não transduzido). **B.** Intensidade da fluorescência no grupo controle. **C.** Gráfico (*dotplot*) do tamanho (FSC, eixo x) *versus* complexidade (SSC, eixo Y) da população celular em pEF E1 transduzido com plasmídeo FUGW. **D.** A intensidade da fluorescência indicada neste gráfico, indica que mais de 95% das células são GFP+ em relação ao controle.

Figura 5 - Análise de fluorescência do plasmídeo FUGW por citometria de fluxo na pEF E2.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Análise por citometria de fluxo do grupo controle e FUGW+ de pEF E1. **A.** Gráfico (*dotplot*) do tamanho (FSC, eixo x) *versus* complexidade (SSC, eixo Y) da população celular no grupo controle (pEF E2 não transduzido). **B.** Intensidade da fluorescência no grupo controle. **C.** Gráfico (*dotplot*) do tamanho (FSC, eixo x) *versus* complexidade (SSC, eixo Y) da população celular em pEF E2 transduzido com plasmídeo FUGW. **D.** A intensidade da fluorescência indicada neste gráfico, indica que mais de 90% das células são GFP+ em relação ao controle.

Figura 6 - Análise de fluorescência do plasmídeo FUGW por citometria de fluxo na pEF E3.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Análise por citometria de fluxo do grupo controle e FUGW+ de pEF E1. **A.** Gráfico (*dotplot*) do tamanho (FSC, eixo x) versus complexidade (SSC, eixo Y) da população celular no grupo controle (pEF E3 não transduzido). **B.** Intensidade da fluorescência no grupo controle. **C.** Gráfico (*dotplot*) do tamanho (FSC, eixo x) versus complexidade (SSC, eixo Y) da população celular em pEF E3 transduzido com plasmídeo FUGW. **D.** A intensidade da fluorescência indicada neste gráfico, indica que mais de 93% das células são GFP+ em relação ao controle.

Tabela 2 - Porcentagem de células positivas para fluorescência emitida pelas pEF GFP+.

Linhagem celular	% GFP +
pEF E1	95.2
pEF E2	90.8
pEF E3	93.2

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Porcentagem de células positivas para GFP analisadas por citometria obtida pela análise no software BD FACSDIVA 8.1.

A alta emissão, logo, presença da GFP nas células também analisadas por microscopia e fluorescência, em D4, (Figura 7) nos permite inferir sobre a eficiência

da produção viral. Estes dados nos permitem identificar que o protocolo de inserção às células e expressão do plasmídeo foi bem-sucedida.

Figura 7 - Grupo controle FUGW GFP + em D4.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Fotos em D4 do grupo controle da transdução, transduzido com o vetor FUGW. **A.** Fibroblastos embrionários suínos em campo claro. **B.** Fibroblastos GFP+, demonstrando integração e expressão do vetor exógeno. Fotos foram tiradas no aumento de 10x e barras representam 400 μm .

6.1.2 Análise da morfologia

Também em D4, observou-se células apresentando diferenças em sua morfologia quando comparadas à sua morfologia original, não mais apresentavam formato fusiforme (Figura 8) e sim um formato mais arredondado (Figura 9). Em D5 (pEF E1) ou D7 (pEF E2 e E3), 2×10^4 células de cada grupo, fatores humanos (HS) e murinos (MS), foram plaqueadas em 6 poços de uma placa de 6 poços, P0. A partir desta primeira transferência, os repiques seguintes foram realizados de acordo com a velocidade de formação e crescimento das colônias de cada poço individual.

Figura 8 - Fibroblastos embrionários suínos

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Fibroblastos embrionários suínos de morfologia normal, fusiforme. Foto obtida no aumento de 10x e barra representa 400 µm.

Figura 9 - Fibroblastos transduzidos com mOSKM e hOSKM em D4.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: **A.** Aglomerados de fibroblastos transduzidos com mOSKM. **B.** Aglomerados de fibroblastos transduzidos com hOSKM. Ambos os grupos apresentando alteração de morfologia, com formato arredondado possivelmente indicando início da reprogramação. Fotos obtidas no aumento de 10x e barras representam 400 µm.

Após 10 dias da transdução, maiores agrupamentos celulares planos, compactos, de bordas claras e bem definidas (colônias) composto por células com formato arredondado foram identificados (Figura 10). Os fibroblastos transduzidos formaram colônias planas, compactas, de bordas claras e bem definidas, como alta relação núcleo/citoplasma. Estas são características morfológicas de colônias de

células tronco humanas, compartilhadas com a espécie suína (TELUGU; EZASHI; ROBERTS, 2010; OKITA et al., 2011; RUAN et al., 2011). Sendo então o primeiro indício de uma reprogramação bem-sucedida.

Figura 10 - Colônias observadas em D10.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Fotos das colônias observadas em D10. **A.** Colônias observadas no grupo hOSKM. **B.** Colônias observadas no grupo mOSKM, possivelmente indicando reprogramação. Fotos obtidas no aumento de 10x e barras representam 400 μm .

6.1.3 Detecção da fosfatase alcalina

Com o intuito de averiguar se as colônias em questão apresentavam outro indício de reprogramação, foi realizado o teste de fosfatase alcalina (FA). Sabe-se que a presença e atividade da enzima fosfatase alcalina é um dos marcadores de pluripotência em células pluripotentes (presente em poucos tecidos diferenciados), sendo o decréscimo da mesma associada com a diferenciação (NARISAWA; FRÖHLANDER; MILLÁN, 1997; LOH et al., 2006; O'CONNOR et al., 2008; ŠTEFKOVÁ; PROCHÁZKOVÁ; PACHERNÍK, 2015; LIU et al., 2017).

O teste foi realizado em D11, em um dos poços contendo formações ainda em P0. As células ali presentes se mostraram positivas em relação a presença da enzima fosfatase alcalina (Figura 11). Estas foram contadas no microscópio invertido e classificadas como positivas (aquelas que apresentassem coloração inteiramente rósea), parciais (parcialmente rósea) ou negativas (desprovidas de coloração rósea). A quantidade de colônias observada é descrita na Tabela 3, e na Tabela 4 sua classificação quanto ao teste de FA. Para uma melhor visualização e comparação,

foram feitas as Figuras 12 e 13 a partir das tabelas 3 e 4, respectivamente. No entanto, a alta confluência no poço pEF E1 transduzido com o vetor murino inviabilizou que fosse visualmente possível distinguir as delimitações de várias colônias presentes. Em muitos casos, diferentes colônias se fundiram. Quando uma dessas fusões de colônias, de delimitações não distinguíveis, era encontrada durante a contagem ela foi contabilizada com o valor de 1 única colônia. Assim, um valor menor de “colônias geradas” foi obtido neste grupo do que realmente existia no poço.

Figura 11 - Teste de Fosfatase Alcalina em D11.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: **A.** Foto de colônias do grupo hOSKM. **B.** Foto de colônias do grupo mOSKM. Ambas após o teste de Fosfatase Alcalina em D11, P0. Nelas, pode-se observar colônias positivas e parcialmente positivas, outro indício de pluripotência. Fotos tiradas no aumento de 10x e barras representam 400 µm.

Tabela 3 - Contagem e eficiência de geração de colônias encontradas nas diferentes placas P0.

Linhagem celular	Vetor	Células plaqueadas	Colônias formadas	% da eficiência de geração de colônias
pEF E1	hOSKM	20.000	2.524	12,62
	mOSKM*	20.000	1.911	9,55
pEF E2	hOSKM	20.000	2.029	10,14
	mOSKM	20.000	2.261	11,30
pEF E3	hOSKM	20.000	258	1,29
	mOSKM	20.000	843	4,21

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Número de colônias geradas e eficiência por linhagem e vetor. * - A alta confluência na placa resultou na fusão de diversas colônias e inviabilizou que fosse visualmente possível distinguir as delimitações de diferentes colônias, formando colônias maiores. Essa fusão de colônias foi contabilizada com o valor de 1, gerando um valor menor do que as colônias realmente formadas.

Figura 12 - Contagem e eficiência de geração de colônias encontradas nas diferentes placas P0 em gráfico

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico demonstrando a eficiência da geração de colônias em porcentagem de cada linhagem e cada vetor utilizado na transdução. Gráfico gerado para melhor visualização da Tabela 3, de mesmo nome.

Tabela 4 - Contagem das colônias encontradas no teste de FA.

Linhagem celular	Vetor	Colônias positivas	Colônias parciais	Colônias negativas	% de positivas	% de parciais	% de negativas
pEF E1	hOSKM	1.507	1.004	13	59,70	39,77	0,51
	mOSKM*	1.037	874	0	54,26	45,73	0
pEF E2	hOSKM	1.405	620	4	69,24	30,55	0,19
	mOSKM	1.816	443	2	80,31	19,59	0,09
pEF E3	hOSKM	50	113	95	19,37	43,79	36,82
	mOSKM	158	601	84	18,74	71,29	9,96

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Tabela indicando o número de colônias FA positivas, parcialmente positivas (“parciais”) e negativas nas 3 linhagens transduzidas com vetores hOSKM ou mOSKM. * - A alta confluência na placa resultou na fusão de diversas colônias e inviabilizou que fosse visualmente possível distinguir as delimitações de diferentes colônias, formando colônias maiores. Essa fusão de colônias foi contabilizada com o valor de 1, gerando um valor menor do que as colônias realmente formadas.

Figura 13 - Contagem das colônias encontradas no teste de FA em gráfico.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico em pizza representando em porcentagem as colônias classificadas como positivas, parciais e negativas para o teste de FA nas 3 linhagens de pEF transduzidas com vetor OSKM humano e murino.

Assim, percebe-se que nas 3 linhagens há indício de reprogramação devida a presença e grande número de colônias positivas. Nota-se uma grande discrepância entre os valores obtidos pelas linhagens E1 e E2 em relação à E3. Este fato provavelmente é decorrido do uso de 2 lotes diferentes de alíquotas virais. Enquanto as linhagens E1 e E2 foram transduzidos por alíquotas virais provenientes do mesmo lote, E3 difere. Ao utilizar alíquotas diferentes, é razoável assumir que a quantidade de vírus ali presente possa diferir, podendo resultar em uma geração de colônias maior ou menor. Além disso, é sabido que diferentes linhagens celulares, até mesmo colônias clones da mesma linhagem, podem apresentar diferentes taxas de eficiência

à reprogramação, sendo este outro fator que pode influenciar na diferença entre as linhagens.

6.1.4 Manutenção em cultivo *in vitro*

Nas semanas subsequentes cada poço foi avaliado individualmente. O meio trocado a cada 2 dias. Os poços eram submetidos por um novo repique à medida que as colônias crescessem e pudessem ocupar um campo 10x no microscópio e/ou se tornassem grandes o suficiente para entrar em contato umas com as outras.

De cada linhagem foram repicados manualmente 6 colônias de cada vetor, no mínimo. Quando uma quantidade maior de colônias de cada linhagem foi obtida, elas foram destinadas ao congelamento para a formação de um estoque criopreservado, para caracterização por imunofluorescência e também análise de expressão gênica.

Da linhagem pEF E1 foram repicadas 7 colônias transduzidas com hOSKM (HS) e 6 com mOSKM (MS). De todas, foi possível estabelecer 3 linhagens com sucesso: Colônia 1 (Col 1), Colônia 4 (Col 4) e Colônia 7 (Col 7). As 3 provêm do grupo HS e estão em cultivo por mais de 15 semanas. As outras colônias repicadas em P0 não formaram novas colônias nos repiques subsequentes.

Da linhagem pEF E2 foram repicadas 6 colônias de cada grupo. Após o primeiro repique enzimático somente 2 do grupo MS formaram colônias (MS Col 1 e MS Col 4). As outras foram cultivadas normalmente por 14 dias e então descartadas ao não formarem novas colônias. Col 1 e Col 4 estão há mais de 9 semanas em cultivo.

Da linhagem pEF E3, até o momento foram repicadas manualmente 6 colônias de cada grupo.

Tendo em vista o maior número de células GFP+ no controle, de colônias geradas e alto número de colônias positivas para presença da FA, foram escolhidas as colônias provenientes da linhagem E1 para os experimentos subsequentes.

6.1.5 Análise da expressão dos transcritos de relacionados a genes de pluripotência exógenos (OSKM) e endógenos (*pOCT4*, *NANOG*)

Com o intuito de averiguar a reprogramação e o estado de pluripotência das linhagens obtidas, foram avaliadas por RT-qPCR as expressões do vetor com fatores humanos (hOSKM) (Figura 14), assim como os genes endógenos relacionados à pluripotência *pOCT4/POU5F1* (Figura 15) e *NANOG* (Figura 17), e suas respectivas

expressões relativas à expressão na amostra pEF (Figura 16 e 18, respectivamente) como demonstrado nos gráficos a seguir.

Figura 14 - Análise dos transcritos dos vetores exógenos humano (hOSKM) por RT-qPCR das linhagens em P8 e P11 ou P12.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico com análise por RT-qPCR dos transcritos dos vetores exógenos humano (hOSKM) em fibroblastos embrionários suínos (pEF E1) e nas 3 linhagens de colônias geradas, em passagem 8 e 11 ou 12 de cultivo. As amostras as quais não exibem algum valor no gráfico foram classificadas como “undetermined” no termociclador, pela expressão não ter sido encontrada mesmo em quantidades ínfimas.

Figura 15 - Análise dos transcritos do gene *OCT4/POU5F1* endógeno por RT-PCR das linhagens em P8 e P11 ou P12.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico com análise por RT-qPCR dos transcritos do gene *OCT4/POU5F1* endógeno (*pOCT4*) em fibroblastos embrionários suínos (pEF E1) e nas 3 linhagens de colônias geradas, em passagem 8 e P11 ou P12 de cultivo.

Figura 16 - Análise dos transcritos do gene *OCT4/POU5F1* endógeno por RT-PCR usando o valor de Δct de pEF como calibrador das linhagens em P8 e P11 ou P12.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico com análise por RT-qPCR dos transcritos do gene *OCT4/POU5F1* endógeno (*pOCT4*) em fibroblastos embrionários suínos (pEF E1) e nas 3 linhagens de colônias geradas, em passagem 8 e P11 ou P12 de cultivo. O valor de Δct de pEF é usado como calibrador e os dados são analisados através da metodologia de $2^{-\Delta\Delta ct}$.

Figura 17 - Análise dos transcritos dos genes NANOG suíno RT-qPCR das linhagens em P8 e P11 ou P12.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico com análise por RT-qPCR dos transcritos do gene *pNANOG* em fibroblastos embrionários suínos (pEF E1) e nas 3 linhagens de colônias geradas, em passagem 8 e P11 ou P12 de cultivo.

Figura 18- Análise dos transcritos do gene *pNANOG* endógeno por RT-PCR usando o valor de Δct de pEF como calibrador das linhagens em P8 e P11 ou P12.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico com análise por RT-qPCR dos transcritos do gene *pNANOG* em fibroblastos embrionários suínos (pEF E1) e nas 3 linhagens de colônias geradas, em passagem 8 e P11 ou P12 de cultivo. O valor de Δct de pEF é usado como calibrador e os dados são analisados através da metodologia de $2^{-\Delta\Delta ct}$.

Os valores apresentados na figura 16 indicam uma maior expressão do vetor exógeno policistrônico, principalmente na passagem 8. Simultaneamente, os genes endógenos relacionados a pluripotência (*pOCT4* e *pNANOG*) não são expressos ou apresentam um valor mais baixo em P8 (Figura 17 e 19). Assim, pode-se inferir que a reprogramação e alterações decorrentes dela estão vinculadas e são dependentes da presença do vetor e sua expressão até então. Estas, então, são consideradas como células parcialmente reprogramadas (SILVA et al., 2008; MIKKELSEN et al., 2008; SRIDHARAN et al., 2009).

Quando comparadas as expressões com as passagens mais elevadas (P11 ou 12), observa-se uma aparente redução de *hOSKM*. Diferente de *NANOG*, onde os valores permaneceram semelhantes (Figura 19). Quando calibrados para a expressão da amostra pEF, evidencia-se melhor a discrepância na expressão de *pOCT4* dentre as amostras (Figura 18), assim como a presente e pequena expressão de *pNANOG* (Figura 20).

Estes resultados associados à menor, porém presente, expressão de *pOCT4* pela Col 1 em P12 (Figura 17 e 19), sugerem um possível processo ativação dos genes endógenos relacionados a pluripotência pela Col 1 e Col 4 (SILVA et al., 2008). O mesmo não é visto na Col 7.

Através do RT-qPCR foi identificado a alta expressão do hOSKM pela Col 7 em ambas as passagens (P8 e P11). Nota-se que esta linhagem se apresenta resistente à ativação de genes de pluripotência endógenos com o passar das passagens até o momento, quando comparada às outras duas linhagens. Isto indica uma linhagem presa em um estado intermediário de reprogramação, característica condizente com os resultados obtidos dada que a expressão de OSKM é maior em células parcialmente reprogramadas do que em células reprogramadas (MIKKELSEN et al., 2008; SRIDHARAN et al., 2009).

Alterações por ação de mecanismos epigenéticos podem resultar em uma possível diminuição ou até silenciamento dos vetores nas células em passagens mais avançadas, auxiliando a queda na expressão de OSKM e a reprogramação completa (OKITA; ICHISAKA; YAMANAKA, 2007; SILVA et al., 2008; STADTFELD et al., 2010). É possível que uma reprogramação parcial se desenvolva à uma reprogramação completa (SILVA et al., 2008), no entanto, este processo é passível de ser impedido com a reativação ou inibição incompleta dos fatores de transcrição linhagem-específicos (MIKKELSEN et al., 2008). Já foi reportado a expressão persistente de vetores integrativos em passagens mais altas após a reprogramação celular, inclusive em fibroblastos embrionários suínos (YU et al., 2007; ESTEBAN et al., 2009; EZASHI et al., 2009; EZASHI; YUAN; ROBERTS, 2016; LIU et al., 2017).

6.1.6 Imunofluorescência

Foi realizada a detecção por imunofluorescência das proteínas geradas pelos genes exógenos OSKM, no caso OCT4 e SOX2, e endógenos relacionados à pluripotência (NANOG, SSEA1, TRA1-60). Os anticorpos utilizados são específicos para proteína humana, porém reativos ou preditos para a suína.

A imunofluorescência foi analisada com as 3 colônias em passagem menor e maior que 10. Na primeira, as 3 colônias P9 (Figura 19), foram positivas para SOX2. A Col 7 se mostrou negativa para a marcação relacionada aos genes endógenos,

enquanto a Col 1 e 4 foram positivamente marcadas. Porém somente a Col 1 foi positiva para a detecção de NANOG.

As mesmas marcações foram repetidas em passagens posteriores: Col 1 P11, Col 4 P12, Col 7 P11 (Figura 20) e Col 1 P16, Col 4 P17, Col 7 P15. Nestas análises, observou-se o mesmo resultado. Nota-se que na marcação para SSEA1 e TRA1-60 são positivas algumas células integrantes da colônia, e não a colônia como um todo. Estes dados foram compilados em uma tabela (Tabela 5). Como previamente discutido, os genes específicos para fibroblastos são silenciados e, então, seguidos pela ativação de marcadores de pluripotência endógenos como o gene da fosfatase alcalina e SSEA1, e posteriormente NANOG e OCT4 (SRIDHARAN et al., 2009; ŠTEFKOVÁ; PROCHÁZKOVÁ; PACHERNÍK, 2015; LIU et al., 2017).

Esses dados corroboram com a ideia de que as Col 1 e 4 podem estar em um possível processo de ativação de genes endógenos que as levaria a reprogramação completa. Sendo que a marcação para NANOG sugere que a Col 1 estaria desta maneira melhor reprogramada. Diferentemente, a marcação da Col 7 se mantém constante com o passar das passagens indicando, mais uma vez, uma possível reprogramação parcial (como mencionado na seção de RT-qPCR).

Tabela 5 - Caracterização por imunofluorescência da linhagem Col 1, Col 4 e Col 7

Grupos/ anticorpos	Marcações				
	OCT4	SOX2	NANOG	SSEA1	TRA1-60
Col 1 P9	+	+	+	+	+
Col 1 P11	+	+	+	+	+
Col 1 P16	+	+	+	+	+
Col 4 P9	+	+	-	+	+
Col 4 P12	+	+	-	+	+
Col 4 P15	+	+	-	+	+
Col 7 P9	-	+	-	-	-
Col 7 P11	-	+	-	-	-
Col 7 P17	-	+	-	-	-

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Tabela demonstrando marcações positivas e negativas para presença das proteínas OCT4, SOX2, NANOG, SSEA1, TRA1-60 nas linhagens Col 1, Col 4 e Col 7 em passagens diferentes.

Resultados indicam 3 estados diferentes de reprogramação aonde Col 1 e 4 podem estar em um possível processo de ativação de genes endógenos que as levaria a reprogramação completa. Já Col 7 só apresenta marcação positiva para SOX2, indicando uma reprogramação parcial. Sendo que os resultados não mudaram neste período de aproximadamente 7 passagens abrangidas pelos testes.

Figura 19 - Caracterização por imunofluorescência da linhagem Col 1, Col 4 e Col 7 em P9.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Marcação por imunofluorescência da linhagem Col 1 em P11, Col 4 em P12 e Col 7 P11 para as proteínas SOX2, OCT4, NANOG, SSEA1, TRA1-60. Enquanto Col 1 se mostrou positiva para todas, Col 4 se mostrou positiva para os genes em questão, com exceção de NANOG. Já Col 7 só foi marcada positivamente para SOX2. Marcações em vermelho indicam resultado negativo. Fotos foram tiradas no aumento de 20x e barras representam 200 µm.

Figura 20 - Caracterização por imunofluorescência da linhagem Col 1 em P11, Col 4 em P12 e Col 7 P11.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Marcação por imunofluorescência da linhagem Col 1 em P11, Col 4 em P12 e Col 7 P11 para as proteínas SOX2, OCT4, NANOG, SSEA1, TRA1-60. Enquanto Col 1 se mostrou positiva para todas, Col 4 se mostrou positiva para os genes em questão, com exceção de NANOG. Já Col 7 só foi marcada positivamente para SOX2. Marcações em vermelho indicam resultado negativo. Fotos foram tiradas no aumento de 20x e barras representam 200 µm.

6.1.7 Formação de corpos embrióides

O protocolo de formação de corpos embrióides foi iniciado, sendo que em 24 horas foi possível a visualização de pequenos aglomerados celulares em suspensão na placa. As estruturas foram formadas nas 3 linhagens testadas, sendo que uma melhor definição de borda foi observada nas Col 1 e 4 em relação à 7, como mostrado na Figura 21.

Figura 21 - Corpos embrióides formados de cada linhagem.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Corpos embrióides formados com 6 dias **A.** Col 1 P12. **B.** Col 4 P14. **C.** Col 7 P11. Fotos foram tiradas no aumento de 10x e barras representam 400 μm .

6.2 Diferenciação neuronal

Durante o período do mestrado, foi possível a realização de um estágio no exterior (BEPE #: 2017/13973-8) onde foi possível aprender e realizar a técnica de indução e diferenciação neuronal. A partir de iPSCs derivadas de pacientes de Alzheimer e seus controles isogênicos (previamente produzidos através do uso de CRISPR/Cas9), foi possível a geração de células precursoras neuronais (NPC) e neurônios maduros, caracterizados por imunofluorescência das proteínas VGLUT1, Synaptophysin, TUJ1 (Beta tubulina 3), GFAP, GABA e MAP2.

Figura 22 – NPCs e neurônios maduros derivadas de iPSCs humanas.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: **A.** NPCs derivadas de hiPSCs da linhagem nomeada como h264 no aumento de 10x. **B.** h264 depois de 7 semanas em meio de maturação neuronal, no aumento de 10x.

Figura 23 -Caracterização por imunofluorescência de neurônios maduros.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Imunofluorescência nos neurônios derivados da linhagem de hiPSCs, nomeada h264, para as proteínas VGLUT1, Synaptophysin, TUJ1, GFAP, GABA e MAP2 após 7 semanas de maturação neuronal. Fotos foram tiradas no aumento de 40x e barras representam 25 μm .

Para a realização da diferenciação da neuronal de iPSCs em NPC de origem suínas foi utilizado o mesmo protocolo aprendido durante o estágio no exterior. Este protocolo foi aplicado nas iPSCs derivadas de fibroblastos embrionários suínos (pEF). 3 a 5×10^6 das iPSCs suínas foram transferidas (sendo repicado a maior quantidade sempre que possível) para um poço previamente coberto por matriz extracelular comercial, Matrigel, e meio E8. No dia seguinte o meio foi trocado por meio de indução neuronal (*neural induction media*, NIM) como detalhado no materiais e métodos. Este foi considerado D0, o meio foi trocado diariamente por 14 dias (Figura 22). O processo de indução foi completado na linhagem Col 7 em P12 e Col 4 em P15. A primeira, parcialmente reprogramada sem expressão de genes endógenos e com alta expressão de OSKM. Já a segunda, a situação oposta.

Também está em progresso o protocolo de indução nas linhagens Col 1 em P15, Col 4 em P17 e Col 7 em P14. Foram plaqueadas 4×10^6 células da Col 7 em P11 e 5×10^6 células da Col 4 em P14 e estas expostas ao NIM no dia seguinte (Figura 22).

6.2.1 Morfologia durante indução neural.

Figura 24 - Col 7 P12 e Col 4 P15, D0 da indução neuronal

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Colônias de piPSCs um dia depois de serem plaqueadas em Matrigel e meio E8. **A.** Linhagem Col 7 em P12. **B.** Col 4 em P15. Fotos foram tiradas no aumento de 10x e barras representam 400 μm .

Figura 25 - Col 7 P12, D2 e D4 da indução neuronal.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: **A.** Linhagem Col 7 em P12 em D2 da indução, 10x e barra representa 400 µm. **B.** Linhagem Col 7 em P12 em D4, 20x e barra representa 200 µm. Nota-se que a morfologia das células suínas foi bastante similar àquela apresentada pelas células humanas durante o protocolo de indução em NPCs com o passar dos dias.

Figura 26 - Col 4 P15, D2 e 6 da indução neuronal.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: **A.** Col 4 em P15 em D2 em meio NIM. **B.** Col 4 em P15 em D6 em meio NIM. Fotos tiradas no aumento de 20x e barra representa 200 µm. Nota-se que a morfologia das células suínas foi bastante similar àquela apresentada pelas células humanas durante o protocolo de indução em NPCs com o passar dos dias.

Figura 27 –Col 7 P12 e Col 4 P15 em D11.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: **A.** Col 7 em P12 em meio NIM em D11. **B.** Col 4 em P15 em meio NIM em D11. Fotos tiradas no aumento de 20x e barras representam 200 μ m. Nota-se que a morfologia das células suínas foi bastante similar àquela apresentada pelas células humanas durante o protocolo de indução em NPCs com o passar dos dias.

As figuras 25 a 27 permitem observar que a morfologia das células suínas foi bastante similar àquela apresentada pelas células humanas durante o protocolo de indução em NPCs (Figura 24). Também, para observar as alterações morfológicas durante o processo de indução, quando possível, foram plaqueadas o mesmo número de células em um outro poço revestido por Matrigel aonde as células foram cultivadas com meio E8, como foi o caso da Col 7 em P14, ainda no processo de indução (Figura 28). Com 4 dias já foi possível observar diferenças morfológicas em entre os dois cultivos. Enquanto as iPSCs continuam a apresentar um formato mais arredondado, as células em diferenciação apresentam também formatos mais diversos.

Figura 28 - Morfologia da Col 7 em P14 em Matrigel em meio E8 e NIM em D4.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: **A.** Col 7 em P14 cultivada em Matrigel em meio E8, após 4 dias de cultivo. **B.** Col 7 em P14 cultivada em Matrigel em meio NIM em D4. Fotos tiradas no aumento de 20x e barras representam 200 μm .

Após 14 dias (D14), as células foram transferidas na proporção de 1:3 com auxílio de accutase e RevitaCell, sendo estas consideradas células similares às neurais primordiais (NPCs) em P1. Estas foram repicadas com accutase sempre que atingissem 80% de confluência.

Figura 29 - NPC P1 proveniente da Col 4 P15, 1 dia após primeiro repique.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: NPC P1, proveniente da Col 4 P15 1 dia após primeiro repique em aumento de 20x, barra representa 200 μm .

Figura 30 – NPC proveniente da Col 7 P12 em P2.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: **A.** NPC proveniente da Col 7 P12 em P2 em aumento 10x, barra representa 400 µm. **B.** NPC proveniente da Col 7 P12 em P2 em aumento de 20x, barra representa 200 µm. Nota-se a transformação de morfologia com o passar dos dias, perdendo o aspecto das iPSCs de colônias de células arredondadas.

Figura 31– NPC proveniente da Col 4 P15 em P2.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: **A.** NPC proveniente da Col 4 P15 em P2 em aumento 10x, barra representa 400 µm. **B.** NPC proveniente da Col 4 P15 em P2 em aumento de 20x, barra representa 200 µm. Nota-se a transformação de morfologia com o passar dos dias, perdendo o aspecto das iPSCs de colônias de células arredondadas.

Uma vez concluído o protocolo de diferenciação, as células em questão deixaram de se organizar em colônias com a morfologia característica de iPSCs (agrupamentos celulares planos, compactos, de bordas claras e bem definidas) se

tornando mais próximas à NPCs cultivadas *in vitro* (Figuras 29, 30 e 31), como podemos observar no trabalho de Rasmussen onde diferenciou células do epiblasto embrionário suíno à NPCs (Figura 32) (RASMUSSEN et al., 2011). No entanto, apesar da mudança na morfologia, quando comparadas às apresentadas no trabalho de Rasmussen, observa-se que ainda há uma certa semelhança com as iPSCs, principalmente aquelas derivadas da Col 7 P12. Nota-se que em ambas linhagens, houve uma mudança, mas células formadas a partir de Col 7 P12, aparentam ser maiores e ter um formato mais arredondado do que as NPCs provenientes da Col 4 P15. Uma possível explicação para isso é a presença e contínua expressão do vetor hOSKM (dado analisado através de RT-qPCR). O método de indução a pluripotência baseado em um sistema integrativo com vetores virais, permanentemente alteram o genoma. Estes podem produzir mutações que interferem com a função das células produzidas e a expressão residual dos transgenes podem influenciar na tumorigenicidade, função e na diferenciação das células (Du et al. 2015; Yu *et al.*, 2009).

Figura 32 - NPCs diferenciadas a partir de células de epiblasto suíno.

Fonte: (RASMUSSEN et al., 2011)

Legenda: **A.** Roseta neural diferenciada a partir de células do epiblasto embrionário suíno, cultivadas em Matrigel com EGF e bFGF. Seta aponta para NPCs. **B.** NPCs provenientes da roseta em maior aumento. Barras representam 100 μ m.

6.2.2 Expressão gênica de *NESTINA* e *GFAP* nas NPCs.

Para avaliação de expressão gênica por RT-qPCR, foram escolhidos os genes para validação da indução neural o *NESTINA* e a proteína ácida fibrilar glial (*glial fibrillary acidic protein*, *GFAP*), ambos associados com células neurais primordiais. *NESTINA* é um filamento intermediário altamente expresso no sistema nervoso central de vertebrados durante o seu desenvolvimento. *GFAP*, outro filamento intermediário, está presente em mais de um tipo celular e é utilizado como marcador para células da glia, como astrócitos. Porém, sua presença também está associada à NPC adulta, enquanto ausente na NPC fetal (SCHWARTZ et al., 2005; PUY et al., 2010; RASMUSSEN et al., 2011).

Foram analisadas ambas as linhagens pelo protocolo de diferenciação até o momento, NPC P2 (C7P12) e NPC P1 (C4P15). Juntamente com estas amostras, foram analisadas amostras das linhagens de iPSCs de origem (em passagens superiores devida pouca quantidade de amostra disponível no momento. P14 e P17, respectivamente), fibroblasto embrionário suíno (pEF) em P4 e fibroblastos embrionários murinos (mEF) em P27. A análise dos dados fornecidos pela reação de RT-qPCR foi realizada como descrita anteriormente. Além disso, para melhor visualização e comparação, também foi realizada a análise utilizando o valor de Δct obtido na amostra pEF como calibrador na equação de $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$. Os valores obtidos para expressão de *pNESTINA* estão descritos nos gráficos a seguir (Figura 33 e 34).

Figura 33 - Análise de expressão de *pNESTINA* nas amostras de NPCs.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico com análise por RT-qPCR dos transcritos do gene *NESTINA* em fibroblastos embrionários murinos (mEF), suínos (pEF E1), nas 2 linhagens de colônias diferenciadas e suas respectivas NPCs, 2 passagens acima das mesmas (17 e 14). As amostras as quais não exibem algum valor no gráfico foram classificadas como “undetermined” no termociclador, pela expressão não ter sido encontrada mesmo em quantidades ínfimas.

Figura 34 - Análise de expressão de *pNESTINA* nas amostras de NPCs usando o valor de Δct de pEF como calibrador.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico com análise por RT-qPCR dos transcritos do gene *NESTINA* em fibroblastos embrionários murinos (mEF), suínos (pEF E1), nas 2 linhagens de colônias diferenciadas e suas respectivas NPCs, 2 passagens acima das mesmas (17 e 14). As amostras as quais não exibem algum valor no gráfico foram classificadas como “undetermined” no termociclador, pela expressão não ter sido encontrada mesmo em quantidades ínfimas.

A partir das informações demonstradas pelos gráficos, é possível observar que a amostra com maior expressão de *NESTINA* é o pEF, ocorrendo uma redução durante a reprogramação celular ao estágio de iPSCs para então essa expressão se manter ou, aparentemente, aumentar.

Para confirmar a especificidade dos primers e amplificação correta dos genes, o produto de PCR foi submetido a um gel de Agarose a 2% (UltraPure Agarose, cat. # 16500-500, Invitrogen) com SYBR Safe (cat. # S33102, Invitrogen), de acordo com as normas do fabricante, aonde foi utilizado 10µl do produto de PCR e 2 µl de azul de bromofenol. Sendo 4 µl de 1 kb ladder (cat. # 10787018, Invitrogen), 2 µl de azul de bromofenol e 6 µl de TAE 1x. Aplicou-se uma corrente de 110v por 60 min (Bio-Rad PowerPac Basic). Como demonstrado na Figura 35, uma única banda foi formada próxima à marcação de 200 pb pelo ladder. Este, corresponde aos 191 pb esperados do *NESTINA* amplificado (Figura 35).

Figura 35 - Gel de agarose para produto de PCR, *pNESTINA*.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gel de agarose a 2%, onde foi corrido o produto de PCR de *pNESTINA*. É possível visualizar uma única banda na coluna do produto próxima a banda de 200 pb no ladder, o que corresponde aos 191pb do produto amplificado pelos primers de *pNESTINA*.

O produto também foi sequenciado, sendo sua sequência comparada contra o genoma suíno e murino, e pareou especificamente somente com a sequência de *NESTINA* suíno. Um segundo par de primers foi testado gerando valores similares ao primeiro. Confirmando assim, a amplificação e identificação de *NESTINA* nas amostras em questão.

Sellmeyer e Krah, analisaram a expressão de *NESTINA* durante o desenvolvimento embrionário humano e observaram que há a expressão do gene em toda derme primitiva, e com o desenvolvimento a expressão diminui e se restringe a pontos específicos (SELLMEYER; KRAHL, 2010). Em 2016, Mateu e colaboradores demonstraram diferenças funcionais e morfológicas entre fibroblastos de humanos adultos e de neonatos. Eles reportaram a expressão de *NESTINA* em fibroblastos

neonatos enquanto negativa nos fibroblastos adultos (MATEU et al., 2016). Enquanto Janmaat e colaboradores, em 2015, relataram a marcação por imuno-histoquímica negativa para *NESTINA* em fibroblastos humanos adultos. No entanto, houve detecção por RT-qPCR da expressão do mesmo gene, sugerindo um possível degradação de proteína ou de mRNA pós-traducional (JANMAAT et al., 2015).

Em 2004, Zhu e colaboradores isolaram células tronco de pele fetal suína e realizaram a sua caracterização. Dentre os marcadores expressos pelas células indiferenciadas isoladas encontra-se *NESTINA* (ZHU et al., 2004). Levando em consideração a origem e natureza embrionária dos fibroblastos utilizados para este projeto de pesquisa, e a proximidade morfofisiológica da espécie suína para com a humana, pode-se inferir que possivelmente estes também expressem *NESTINA* em seu estado inicial de desenvolvimento. Podendo a expressão nas células iPSCs ser fruto de um silenciamento parcial devido a falha na reprogramação epigenética durante o processo de indiferenciação e reprogramação celular (ZHU et al., 2004; STADTFELD et al., 2010; KRISHNAKUMAR; BLELLOCH, 2013). Assim, faz-se necessário questionar se, nessas circunstâncias apresentadas, *NESTINA* seria um bom marcador para indicar comprometimento com a linhagem neural.

No caso de *GFAP*, a análise de expressão gênica demonstrou os seguintes valores (Figura 36 e 37).

Figura 36 - Análise por RT-qPCR de *pGFAP* na NPCs.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico com análise por RT-qPCR dos transcritos do gene *GFAP* em fibroblastos embrionários suínos (pEF E1), nas 2 linhagens de colônias diferenciadas e suas respectivas NPCs, 2 passagens acima das mesmas (17 e 14).

Figura 37 -- Análise de expressão de *pGFAP* nas amostras de NPCs usando o valor de Δct de pEF como calibrador.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráfico com análise por RT-qPCR dos transcritos do gene *GFAP* em fibroblastos embrionários suínos (pEF E1), nas 2 linhagens de colônias diferenciadas e suas respectivas NPCs, 2 passagens acima das mesmas (17 e 14). O valor de Δct de pEF é usado como calibrador e os dados são analisados através da metodologia de $2^{-\Delta\Delta ct}$.

A clara expressão de *pGFAP* pela NPC C4P15 indica comprometimento com a linhagem neural, possivelmente demonstrando a geração de uma NPC com características mais semelhantes à uma NPC mais adulta quando comparada a uma NPC fetal, podendo ser o caso da NPC C7P12 (PUY et al., 2010; RASMUSSEN et al., 2011)

6.2.3 Marcação por imunofluorescência das proteínas NESTINA, BETA TUBULINA III e VIMENTINA.

Para caracterização e confirmação da natureza neuronal das células diferenciadas, utilizou-se da marcação de proteínas sabidamente positivas em NPCs: NESTINA, BETA TUBULINA III e VIMENTINA (SCHWARTZ et al., 2005; PUY et al., 2010; RASMUSSEN et al., 2011; YIN et al., 2011; BRENNAND et al., 2015) conforme descrito em Materiais e Métodos. Nos três casos, a marcação foi positiva indicando a presença das proteínas em questão e a diferenciação das células iPSCs (Figura 38).

Figura 38 - Caracterização por imunofluorescência da NPC P2 (C7P12).

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Marcação positiva por imunofluorescência na NPC P2 (C7 P12) para as proteínas NESTINA, BETA TUBULINA III e VIMENTINA. Fotos foram tiradas no aumento de 20x e barras representam 200 μ m.

Foram realizadas também a imunofluorescência destes marcadores para NPC nas amostras pEF P6, iPSC Col 4 P17, iPS Col 7 P14, NPC P2 (C4P15). Todos os marcadores foram marcados positivamente. Buscando quantificar a fluorescência destas amostras, estas foram enzimaticamente extraídas com TrypLE Express (como descrito para as iPSCs) das placas de cultivo e analisadas por citometria de fluxo (Figura 39). Na figura é possível observar que todas as amostras são positivas para presença das proteínas VIMENTINA, BETA TUBULINA III e NESTINA. No entanto, a porcentagem de células fluorescentes nos grupos variam, sendo um padrão destacado. Nota-se que a para NESTINA e BETA TUBULINA III, a porcentagem obtida nas amostras pEF são semelhantes às iPSCs, porém ambas são inferiores à NPC. Já no caso da VIMENTINA, percebe-se que há uma queda do valor encontrando das pEF para às iPSCs e, então, um aumento no estado de NPC.

Figura 39 - Análise da intensidade da imunofluorescência por citometria de fluxo.

Fonte: (MACHADO L.S., 2018)

Legenda: Gráficos demonstrando a porcentagem de células de fibroblastos embrionários (pEF), iPSCs e NPC (C4P15) fluorescentes para VIMENTINA, BETA TUBULINA III e NESTINA. Nota-se que a para NESTINA e BETA TUBULINA III, a porcentagem obtida nas amostras pEF são semelhantes às iPSCs, porém inferiores à NPC. Já no caso da VIMENTINA, percebe-se que há uma queda do valor encontrando nas pEF para às iPSCs e, então, um aumento no estado de NPC.

Foi-se demonstrado que durante a reprogramação induzida os fibroblastos sofrem uma transformação mesenquimal-epitelial. Sendo assim, VIMENTINA, um sabido marcador de células mesenquimais como fibroblastos, tem sua expressão reduzida durante a este processo (HØFFDING; HYTTEL, 2015). A sua detecção maior em estágio de fibroblasto, a redução enquanto iPSC, e subsequente aumento ao ser diferenciada (sendo VIMENTINA um marcador de NPCs também), realça juntamente com os outros dados o comprometimento das células com destino neuronal.

Em 2008, Jouhilahti e colaboradores descreveram a presença de BETA TUBULINA III em células mesenquimais e epiteliais, como fibroblasto, em humanos (JOUHILAHTI; PELTONEN; PELTONEN, 2008). Já em 2016, foi demonstrado a

presença deste em fibroblastos, principalmente na transição epitelial-mesenquimal (CHILOSI et al., 2017). A expressão desse marcador em células iPSCs pode ser fruto de uma falha no silenciamento epigenético durante o processo de reprogramação, assim como *NESTINA* descrito na seção anterior. Corroborando com os dados encontrados no qRT-PCR, a proteína NESTINA se mostrou presente em todas as fases do processo de reprogramação e diferenciação. Todavia, nota-se o claro aumento da mesma no estágio após a diferenciação em uma célula neural.

Assim, neste caso, a simples presença destes marcadores não permite concluir uma diferenciação neural bem-sucedida. Entretanto, a queda seguida de aumento de VIMENTINA, o aumento de 18% para 52% de BETA TUBULINA III e de 46% para 74% de NESTINA de células positivas destes marcadores, indica um processo de diferenciação das células. A diferenciação associada a maior presença deste conjunto de marcadores nas células geradas, sugere comprometimento com a diferenciação neural, sendo estas células semelhantes às NPCs (*NPC-like*).

7 CONCLUSÕES

A hipótese deste projeto afirma a possibilidade da formação de células pluripotentes induzidas suínas e sua diferenciação em células progenitoras neurais (NPCs).

Como observado nestes experimentos, colônias foram geradas com sucesso através do uso dos vetores lentivirais humanos e murinos. Os fibroblastos transduzidos com fatores de transcrição humanos formaram colônias planas, compactas, de bordas claras e bem definidas, como alta relação núcleo/citoplasma. Estas são características morfológicas de colônias de células tronco suína. Além disso, as colônias foram positivas para presença da enzima fosfatase alcalina, característica sabidamente associada a pluripotência. Este foi corroborado pelos resultados positivos para presença de proteínas e expressão de genes exógenos e endógenos de pluripotência (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *SSEA1*, *TRA1-60*). Imunofluorescência. Com estas, foram estabelecidas 3 linhagens de piPSCs em estágios diferentes de reprogramação, evidenciando a singularidade de cada transdução.

Foi realizado o protocolo de diferenciação à NPCs. As células geradas apresentaram resultados positivos para marcadores de NPC por imunofluorescência (NESTINA, BETA TUBULINA III e VIMENTINA) e expressão gênica de *NESTINA* e *GFAP* foi detectada, sugerindo uma diferenciação bem-sucedida.

Interessantemente, observou-se que os marcadores NESTINA, BETA TUBULINA III e VIMENTINA foram detectados em todos os estágios da reprogramação e diferenciação, indicando que neste projeto estes não foram marcadores específicos da diferenciação de pEF à NPCs-*like*. A maior expressão de *NESTINA* pelos fibroblastos embrionários suínos, semelhante aos fibroblastos embrionários humanos, sugere que no caso da reprogramação a partir de fibroblastos suínos de origem embrionária, tanto o uso da expressão gênica quanto a proteína NESTINA como marcador pode ser limitado já que sua presença pode ser resultado de uma falha no silenciamento epigenético durante a reprogramação, fazendo-se importante a necessidade de também outros marcadores para comprovação de diferenciação neuronal. Porém, quantitativamente, nota-se que os marcadores demonstram de maneira mais evidente a diferenciação e o comprometimento das células pluripotentes ao destino neural.

O aprofundamento em estudos sobre fatores importantes como a expressão endógena dos fatores de pluripotência e o silenciamento dos fatores exógenos, incluindo o estudo de iPSCs derivadas a partir de fatores humanos, além da utilização de um maior número de colônias de iPSCs suínas mais completamente reprogramadas serão de fundamental importância para o melhor entendimento, sucesso e caracterização das NPCs suínas.

8 REFERÊNCIAS

- ARAVALLI, R. N.; CRESSMAN, E. N. K.; STEER, C. J. Hepatic differentiation of porcine induced pluripotent stem cells in vitro. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 194, n. 3, p. 369–374, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023312002158>>.
- BAO, L.; HE, L.; CHEN, J.; WU, Z.; LIAO, J.; RAO, L.; REN, J.; LI, H.; ZHU, H.; QIAN, L.; GU, Y.; DAI, H.; XU, X.; ZHOU, J.; WANG, W.; CUI, C.; XIAO, L. Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. **Cell research**, v. 21, n. 4, p. 600–8, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3203662&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.
- BEN-NUN, I. F.; MONTAGUE, S. C.; HOUCK, M. L.; TRAN, H. T.; GARITAONANDIA, I.; LEONARDO, T. R.; WANG, Y. C.; CHARTER, S. J.; LAURENT, L. C.; RYDER, O. A.; LORING, J. F. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 829–831, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892153>>.
- BENEDETTI, S.; PIROLA, B.; POLLO, B.; MAGRASSI, L.; BRUZZONE, M. G.; RIGAMONTI, D.; GALLI, R.; SELLERI, S.; DI MECO, F.; DE FRAJA, C.; VESCOVI, A.; CATTANEO, E.; FINOCCHIARO, G. Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. **Nature Medicine**, v. 6, n. 4, p. 447–450, 2000.
- BRENNAND, K.; SAVAS, J. N.; KIM, Y.; TRAN, N.; SIMONE, A.; HASHIMOTO-TORII, K.; BEAUMONT, K. G.; KIM, H. J.; TOPOL, A.; LADRAN, I.; ABDELRAHIM, M.; MATIKAINEN-ANKNEY, B.; CHAO, S. H.; MRKSICH, M.; RAKIC, P.; FANG, G.; ZHANG, B.; YATES, J. R.; GAGE, F. H. Phenotypic differences in hiPSC NPCs derived from patients with schizophrenia. **Molecular Psychiatry**, 2015.
- BRESSAN, F. F. **Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência**. 2013. Universidade de São Paulo, 2013.
- CHILOSI, M.; CALIÒ, A.; ROSSI, A.; GILIOLI, E.; PEDICA, F.; MONTAGNA, L.; PEDRON, S.; CONFALONIERI, M.; DOGLIONI, C.; ZIESCHE, R.; GRUBINGER, M.; MIKULITS, W.; POLETTI, V. Epithelial to mesenchymal transition-related proteins ZEB1, β -catenin, and β -tubulin-III in idiopathic pulmonary fibrosis. **Modern**

Pathology, v. 30, n. 1, p. 26–38, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/modpathol.2016.147>>.

CONG, Y.; MA, J.; SUN, R.; WANG, J.; XUE, B.; WANG, J.; XIE, B.; WANG, J.; HU, K.; LIU, Z. Derivation of putative porcine embryonic germ cells and analysis of their multi-lineage differentiation potential. **Journal of Genetics and Genomics**, 2013.

DE SOUZA, A. F.; GODOY PIERI, N. C.; ROBALLO, K. C. S.; BRESSAN, F. F.; CASALS, J. B.; AMBRÓSIO, C. E.; PERECIN, F.; MARTINS, D. S. Dynamics of male canine germ cell development. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–22, 2018.

DENG, Y.; LIU, Q.; LUO, C.; CHEN, S.; LI, X.; WANG, C.; LIU, Z.; LEI, X.; ZHANG, H.; SUN, H.; LU, F.; JIANG, J.; SHI, D. Generation of induced pluripotent stem cells from buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal fibroblasts with buffalo defined factors. **Stem cells and development**, v. 21, n. 13, p. 2485–94, 2012. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22420535>>.

DIMOS, J. T.; RODOLFA, K. T.; NIAKAN, K. K.; WEISENTHAL, L. M.; MITSUMOTO, H.; CHUNG, W.; CROFT, G. F.; SAPHIER, G.; LEIBEL, R.; GOLAND, R.; WICHTERLE, H.; HENDERSON, C. E.; EGGAN, K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. **Science**, v. 321, n. 5893, p. 1218–1221, ago. 2008.

DU, X.; FENG, T.; YU, D.; WU, Y.; ZOU, H.; MA, S.; FENG, C.; HUANG, Y.; OUYANG, H.; HU, X.; PAN, D.; LI, N.; WU, S. Barriers for Deriving Transgene-Free Pig iPS Cells with Episomal Vectors. **STEM CELLS**, v. 33, n. 11, p. 3228–3238, nov. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/stem.588>>.

ESTEBAN, M. A.; XU, J.; YANG, J.; PENG, M.; QIN, D.; LI, W.; JIANG, Z.; CHEN, J.; DENG, K.; ZHONG, M.; CAI, J.; LAI, L.; PEI, D. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 26, p. 17634–17640, 2009.

EZASHI, T.; TELUGU, B. P. V. L.; ALEXENKO, A. P.; SACHDEV, S.; SINHA, S.; ROBERTS, R. M. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 27, p. 10993–8, 2009. Disponível em:

<<http://www.pnas.org/content/106/27/10993.short>>.

EZASHI, T.; YUAN, Y.; ROBERTS, R. M. Pluripotent Stem Cells from Domesticated Mammals. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 223–253, 2016.

Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-021815->

111202>.

FALK, A.; KOCH, P.; KESAVAN, J.; TAKASHIMA, Y.; LADEWIG, J.; ALEXANDER, M.; WISKOW, O.; TAILOR, J.; TROTTER, M.; POLLARD, S.; SMITH, A.; BRÜSTLE, O. Capture of neuroepithelial-like stem cells from pluripotent stem cells provides a versatile system for in vitro production of human neurons. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2012.

HØFFDING, M. K.; HYTTEL, P. Ultrastructural visualization of the Mesenchymal-to-Epithelial Transition during reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Stem Cell Research**, v. 14, n. 1, p. 39–53, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2014.11.003>>.

HONDA, A.; HIROSE, M.; HATORI, M.; MATOBA, S.; MIYOSHI, H.; INOUE, K.; OGURA, A. Generation of induced pluripotent stem cells in rabbits: Potential experimental models for human regenerative medicine. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, p. 31362–31369, 2010.

ISRAEL, M. a.; YUAN, S. H.; BARDY, C.; REYNA, S. M. S.; MU, Y.; HERRERA, C.; HEFFERAN, M. P.; VAN GORP, S.; NAZOR, K. L.; BOSCOLO, F. S.; CARSON, C. T.; LAURENT, L. C.; MARSALA, M.; GAGE, F. H.; REMES, A. M.; KOO, E. H.; GOLDSTEIN, L. S. B. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 482, n. 7384, p. 216–220, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nature10821>%5Cn<http://www.nature.com/nature/journal/v482/n7384/abs/nature10821.html>>.

JANMAAT, C. J.; DE ROOIJ, K. E.; LOCHER, H.; DE GROOT, S. C.; DE GROOT, J. C. M. J.; FRIJNS, J. H. M.; HUISMAN, M. A. Human dermal fibroblasts demonstrate positive immunostaining for neuron- and glia-specific proteins. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2015.

JOUHILAHTI, E. M.; PELTONEN, S.; PELTONEN, J. Class III β -tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 56, n. 12, p. 1113–1119, 2008.

KARUMBAYARAM, S.; NOVITCH, B. G.; PATTERSON, M.; UMBACH, J. A.; RICHTER, L.; LINDGREN, A.; CONWAY, A. E.; CLARK, A. T.; GOLDMAN, S. A.; PLATH, K.; WIEDAU-PAZOS, M.; KORNBLUM, H. I.; LOWRY, W. E. Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 27, n. 4, p. 806–11, abr. 2009.

- KIM, E.; KIM, M.; HWANG, S.-U.; KIM, J.; LEE, G.; PARK, Y. S.; HYUN, S.-H. Neural induction of porcine-induced pluripotent stem cells and further differentiation using glioblastoma-cultured medium. **Journal of cellular and molecular medicine**, n. November 2018, p. 1–12, 2019.
- KRISHNAKUMAR, R.; BLELLOCH, R. H. Epigenetics of cellular reprogramming. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 23, n. 5, p. 548–555, out. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959437X13000981>>.
- LE GRAND, J. N.; GONZALEZ-CANO, L.; PAVLOU, M. A.; SCHWAMBORN, J. C. Neural stem cells in Parkinson's disease: A role for neurogenesis defects in onset and progression. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 773–797, 2015.
- LI, T.; PIRES, C.; NIELSEN, T. T.; WALDEMAR, G.; HJERMIND, L. E.; NIELSEN, J. E.; DINNYES, A.; HOLST, B.; HYTTEL, P.; FREUDE, K. K. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from an Alzheimer's disease patient carrying a M146I mutation in PSEN1. **Stem Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 334–337, 2016a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2016.01.001>>.
- LI, T.; PIRES, C.; NIELSEN, T. T.; WALDEMAR, G.; HJERMIND, L. E.; NIELSEN, J. E.; DINNYES, A.; HYTTEL, P.; FREUDE, K. K. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from an Alzheimer's disease patient carrying an A79V mutation in PSEN1. **Stem Cell Research**, v. 16, n. 2, p. 229–232, 2016b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2016.01.001>>.
- LI, X.; ZHANG, F.; SONG, G.; GU, W.; CHEN, M.; YANG, B.; LI, D.; WANG, D.; CAO, K. Intramyocardial Injection of Pig Pluripotent Stem Cells Improves Left Ventricular Function and Perfusion: A Study in a Porcine Model of Acute Myocardial Infarction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, 2013.
- LIAO, J.; CUI, C.; CHEN, S.; REN, J.; CHEN, J.; GAO, Y.; LI, H.; JIA, N.; CHENG, L.; XIAO, H.; XIAO, L. Generation of Induced Pluripotent Stem Cell Lines from Adult Rat Cells. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 1, p. 11–15, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2008.11.013>>.
- LIAO, Y. J.; LIAO, C. H.; LIAO, J. W.; YUAN, K.; LIU, Y. Z.; CHEN, Y. S.; CHEN, L. R.; YANG, J. R. Establishment and Characterization of Novel Porcine Induced Pluripotent Stem Cells Expressing hrGFP. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, v. 04, n. 05, 2014. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/open-access/establishment-characterization-novel-porcine-induced-pluripotent-stem-cells->

2157-7633.1000208.php?aid=25853>.

LIND, N. M.; MOUSTGAARD, A.; JELSING, J.; VAJTA, G.; CUMMING, P.; HANSEN, A. K. The use of pigs in neuroscience: Modeling brain disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, n. 5, p. 728–751, 2007.

LIU, H.; ZHU, F.; YONG, J.; ZHANG, P.; HOU, P.; LI, H.; JIANG, W.; CAI, J.; LIU, M.; CUI, K.; QU, X.; XIANG, T.; LU, D.; CHI, X.; GAO, G.; JI, W.; DING, M.; DENG, H.

Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Rhesus Monkey

Fibroblasts. **Cell Stem Cell**, v. 3, n. 6, p. 587–590, 2008. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2008.10.014>>.

LIU, K.; MAO, J.; SONG, L.; FAN, A.; ZHANG, S.; WANG, J.; FAN, N.; LIU, N.; YE, X.; FU, H.; ZHOU, Z.; WANG, Y.; WEI, H.; LIU, Z.; LI, Z.; LAI, L.; WANG, X.; LIU, L.

DNA repair and replication links to pluripotency and differentiation capacity of pig iPS cells. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–22, 2017.

LOH, Y. H.; WU, Q.; CHEW, J. L.; VEGA, V. B.; ZHANG, W.; CHEN, X.; BOURQUE, G.; GEORGE, J.; LEONG, B.; LIU, J.; WONG, K. Y.; SUNG, K. W.; LEE, C. W. H.; ZHAO, X. D.; CHIU, K. P.; LIPOVICH, L.; KUZNETSOV, V. A.; ROBSON, P.;

STANTON, L. W.; WEI, C. L.; RUAN, Y.; LIM, B.; NG, H. H. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. **Nature Genetics**, v. 38, n. 4, p. 431–440, 2006.

LOWRY, W. E.; PLATH, K. The many ways to make an iPS cell. **Nature biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 1246–1248, 2008.

LU, Y.; WEST, F. D.; JORDAN, B. J.; MUMAW, J. L.; JORDAN, E. T.; GALLEGOS-CARDENAS, A.; BECKSTEAD, R. B.; STICE, S. L. Avian-Induced Pluripotent Stem Cells Derived Using Human Reprogramming Factors. **Stem Cells and Development**, v. 21, n. 3, p. 394–403, 2012.

MATEU, R.; ŽIVICOVÁ, V.; KREJÍ, E. D.; GRIM, M.; STRNAD, H.; VLEK, A.; KOLÁ, M.; LACINA, L.; GÁL, P.; BORSKÝ, J.; SMETANA, K.; DVOÁNKOVÁ, B. Functional differences between neonatal and adult fibroblasts and keratinocytes: Donor age affects epithelial-mesenchymal crosstalk in vitro. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 4, p. 1063–1074, 2016.

MIKKELSEN, T. S.; HANNA, J.; ZHANG, X.; KU, M.; WERNIG, M.; SCHORDERET, P.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R.; LANDER, E. S.; MEISSNER, A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. **Nature**, v. 454, n. 7200, p. 49–55, 3 jul. 2008. Disponível em:

<<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07056>>.

MUNGENAST, A. E.; SIEGERT, S.; TSAI, L.-H. Modeling Alzheimer's disease with human induced pluripotent stem (iPS) cells. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 73, p. 13–31, 2016.

NAGY, K.; SUNG, H.-K.; ZHANG, P.; LAFLAMME, S.; VINCENT, P.; AGHA-MOHAMMADI, S.; WOLTJEN, K.; MONETTI, C.; MICHAEL, I. P.; SMITH, L. C.; NAGY, A. Induced pluripotent stem cell lines derived from equine fibroblasts. **Stem cell reviews**, v. 7, n. 3, p. 693–702, 2011. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3137777&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

NARISAWA, S.; FRÖHLANDER, N.; MILLÁN, J. L. Inactivation of two mouse alkaline phosphatase genes and establishment of a model of infantile hypophosphatasia.

Developmental Dynamics, v. 208, n. 3, p. 432–446, 1997.

O'CONNOR, M. D.; KARDEL, M. D.; IOSFINA, I.; YOUSSEF, D.; LU, M.; LI, M. M.; VERCAUTEREN, S.; NAGY, A.; EAVES, C. J. Alkaline Phosphatase-Positive Colony Formation Is a Sensitive, Specific, and Quantitative Indicator of Undifferentiated Human Embryonic Stem Cells. **Stem Cells**, v. 26, n. 5, p. 1109–1116, 2008.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0801>>.

OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 313–317, 2007.

OKITA, K.; MATSUMURA, Y.; SATO, Y.; OKADA, A.; MORIZANE, A.; OKAMOTO, S.; HONG, H.; NAKAGAWA, M.; TANABE, K.; TEZUKA, K.; SHIBATA, T.;

KUNISADA, T.; TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, J.; SAJI, H.; YAMANAKA, S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. **Nature methods**, v. 8, n. 5, p. 409–412, 2011.

PAULSEN, B. da S.; MACIEL, R. D. M.; GALINA, A.; SOUZA, SILVEIRA, D. M.; SOUZA, C. dos S.; DRUMMOND, H.; POZZATTO, E. N.; JUNIOR, H. S.;

CHICAYBAM, L.; MASSUDA, R.; SETTI-PERDIGÃO, P.; BONAMINO, M.; SILVA BELMONTE-DE-ABREU, P.; CASTRO, N. G.; BRENTANI, H.; REHEN, S. K. Altered Oxygen Metabolism Associated to Neurogenesis of Induced Pluripotent Stem Cells Derived From a Schizophrenic Patient. **Cell Transplantation**, v. 21, p. 1547–1559, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.3727/096368911X600957%5Cnwww.cognizantcommunication.com>>.

- PERA, M. F.; REUBINOFF, B.; TROUSON, A. Human embryonic stem cells. **Journal of Cell Science**, v. 113, p. 5–10, 2000. Disponível em: <<http://jcs.biologists.org/content/113/1/5.short>>.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 45e–45, 1 maio 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/29.9.e45>>.
- PICK, M.; STELZER, Y.; BAR-NUR, O.; MAYSHAR, Y.; EDEN, A.; BENVENISTY, N. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. **Stem Cells**, v. 27, n. 11, p. 2686–2690, 2009.
- PINCUS, D. W.; GOODMAN, R. R.; FRASER, R. A. R.; NEDERGAARD, M.; GOLDMAN, S. A. Neural stem and progenitor cells: A strategy for gene therapy and brain repair. **Neurosurgery**, v. 42, n. 4, p. 858–868, 1998.
- POON, A.; LI, T.; PIRES, C.; NIELSEN, T. T.; NIELSEN, J. E.; HOLST, B.; DINNYES, A.; HYTTEL, P.; FREUDE, K. K. Derivation of induced pluripotent stem cells from a familial Alzheimer's disease patient carrying the L282F mutation in presenilin 1. **Stem Cell Research**, v. 17, n. 3, p. 470–473, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1873506116301313>>.
- PUY, L. du; CHUVA DE SOUSA LOPES, S. M.; HAAGSMAN, H. P.; ROELEN, B. A. J. Differentiation of Porcine Inner Cell Mass Cells Into Proliferating Neural Cells. **Stem Cells and Development**, v. 19, n. 1, p. 61–70, 2010. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/scd.2009.0075>>.
- RASMUSSEN, M. A.; HALL, V. J.; CARTER, T. F.; HYTTEL, P. Directed differentiation of porcine epiblast-derived neural progenitor cells into neurons and glia. **Stem Cell Research**, v. 7, n. 2, p. 124–136, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2011.04.004>>.
- RASMUSSEN, M. A.; HOLST, B.; T?MER, Z.; JOHNSEN, M. G.; ZHOU, S.; STUMMANN, T. C.; HYTTEL, P.; CLAUSEN, C. Transient p53 suppression increases reprogramming of human fibroblasts without affecting apoptosis and DNA damage. **Stem Cell Reports**, v. 3, n. 3, p. 404–413, 2014.
- ROSSELLÓ, R. A.; CHEN, C. C.; DAI, R.; HOWARD, J. T.; HOCHGESCHWENDER, U.; JARVIS, E. D. Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–24, 2013.
- RUAN, W. M.; HAN, J. Y.; LI, P.; CAO, S. Y.; AN, Y.; LIM, B.; LI, N. A novel strategy

to derive iPS cells from porcine fibroblasts. **Science China Life Sciences**, v. 54, n. 6, p. 553–559, 2011.

SCHWARTZ, P. H.; NETHERCOTT, H.; KIROV, I. I.; ZIAEIAN, B.; YOUNG, M. J.; KLASSEN, H. Expression of Neurodevelopmental Markers by Cultured Porcine Neural Precursor Cells. **Stem Cells**, v. 23, n. 9, p. 1286–1294, 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2004-0306>>.

SELLHEYER, K.; KRAHL, D. Spatiotemporal expression pattern of neuroepithelial stem cell marker nestin suggests a role in dermal homeostasis, neovasculogenesis, and tumor stroma development: A study on embryonic and adult human skin.

Journal of the American Academy of Dermatology, v. 63, n. 1, p. 93–113, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2009.07.013>>.

SHI, Y.; KIRWAN, P.; LIVESEY, F. J. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. **Nature Protocols**, v. 7, n. 10, p. 1836–1846, 2012.

SHIMADA, H.; NAKADA, A.; HASHIMOTO, Y.; SHIGENO, K.; SHIONOYA, Y.; NAKAMURA, T. Generation of canine-induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. **Molecular Reproduction and Development**, v. 77, n. 1, p. 2, 2010.

SILVA, J.; BARRANDON, O.; NICHOLS, J.; KAWAGUCHI, J.; THEUNISSEN, T. W.; SMITH, A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. **PLoS Biology**, v. 6, n. 10, p. 2237–2247, 2008.

SRIDHARAN, R.; TCHIEU, J.; MASON, M. J.; YACHECHKO, R.; KUOY, E.; HORVATH, S.; ZHOU, Q.; PLATH, K. Role of the Murine Reprogramming Factors in the Induction of Pluripotency. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 364–377, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.001>>.

STADTFELD, M.; HOCHEDLINGER, K.; PLURIPOTENT, M. H.; CARDIOMYOCYTES, S. C. Induced pluripotency : history , mechanisms , and applications. v. 5, p. 582–596, 2010.

ŠTEFKOVÁ, K.; PROCHÁZKOVÁ, J.; PACHERNÍK, J. Alkaline phosphatase in stem cells. **Stem Cells International**, v. 2015, n. 2006, 2015.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 861–72, nov. 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse

Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006.

TELUGU, B. P. V. L.; EZASHI, T.; ROBERTS, R. M. Porcine induced pluripotent stem cells analogous to naïve and primed embryonic stem cells of the mouse. **The International journal of developmental biology**, v. 54, n. 11–12, p. 1703–1711, 2010.

TROUNSON, A. Rats, Cats, and Elephants, but Still No Unicorn: Induced Pluripotent Stem Cells from New Species. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 1, p. 3–4, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2008.12.002>>.

TUBSUWAN, A.; PIRES, C.; RASMUSSEN, M. A.; SCHMID, B.; NIELSEN, J. E.; HJERMIND, L. E.; HALL, V.; NIELSEN, T. T.; WALDEMAR, G.; HYTTEL, P.; CLAUSEN, C.; KITIYANANT, N.; FREUDE, K. K.; HOLST, B. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from an Alzheimer's disease patient carrying a L150P mutation in PSEN-1. **Stem Cell Research**, v. 16, n. 1, p. 110–112, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2015.12.015>>.

VERMA, A.; VERMA, N. Induced pluripotent stem cells and promises of neuroregenerative medicine. **Neurology India**, v. 59, n. 4, p. 555–7, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21891933>>.

WAKITANI, S.; TAKAOKA, K.; HATTORI, T.; MIYAZAWA, N.; IWANAGA, T.; TAKEDA, S.; WATANABE, T. K.; TANIGAMI, A. Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint. **Rheumatology**, v. 42, n. 1, p. 162–165, 2003.

WALTER, J.; NICKELS, S. L.; SCHWAMBORN, J. C. Human induced pluripotent stem cell-derived neuronal progenitors are a suitable and effective drug discovery model for neurological mtDNA disorders. **Stem Cell Investigation**, v. 1, n. 12, p. 101–101, 2017. Disponível em: <<http://sci.amegroups.com/article/view/17849/18158>>.

WEST, F. D.; TERLOUW, S. L.; KWON, D. J.; MUMAW, J. L.; DHARA, S. K.; HASNEEN, K.; DOBRINSKY, J. R.; STICE, S. L.; AL, W. E. T. Porcine Induced Pluripotent Stem Cells. v. 19, n. 8, 2010.

WEST, F. D.; YANG, J.-Y.; MUMAW, J. L.; LIU, Y.; STICE, S. L. SSEA4-Positive Pig Induced Pluripotent Stem Cells Are Primed for Differentiation Into Neural Cells. **Cell Transplantation**, v. 22, n. 49, p. 945–959, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3727/096368912X657279%0Awww.cognizantcommunication.co>>

m>.

WU, Y.; ZHANG, Y.; MISHRA, A.; TARDIF, S. D.; HORNSBY, P. J. Generation of induced pluripotent stem cells from newborn marmoset skin fibroblasts. **Stem Cell Research**, v. 4, n. 3, p. 180–188, 2010. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.scr.2010.02.003>>.

WU, Z.; CHEN, J.; REN, J.; BAO, L.; LIAO, J.; CUI, C.; RAO, L.; LI, H.; GU, Y.; DAI, H.; ZHU, H.; TENG, X.; CHENG, L.; XIAO, L. Generation of Pig Induced Pluripotent Stem Cells with a Drug-Inducible System. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 46–54, 1 out. 2009. Disponível em:

<<http://jmc.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jmc/mjp003>>.

YIN, F.; GUO, L.; LU, R. F.; ZHU, Q. S. Spontaneous differentiation of porcine neural progenitors in vitro. **Cytotechnology**, v. 63, n. 4, p. 363–370, 2011.

YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. **Science**, v. 318, n. 5858, p. 1917–1920, 21 dez. 2007.

Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1151526>>.

ZAEHRES, H.; SCHÖLER, H. R. Induction of pluripotency: from mouse to human. **Cell**, v. 131, n. 5, p. 834–5, nov. 2007.

ZAEHRES, H.; SCHÖLER, H. R.; MARTIN, L. Previews Induction of Pluripotency : From Mouse to Human. **Cell**, p. 834–835, 2007.

ZHANG, J.; LIAN, Q.; ZHU, G.; ZHOU, F.; SUI, L.; TAN, C.; MUTALIF, R. A.; NAVASANKARI, R.; ZHANG, Y.; TSE, H.; STEWART, C. L.; COLMAN, A. Article A Human iPSC Model of Hutchinson Gilford Progeria Reveals Vascular Smooth Muscle and Mesenchymal Stem Cell Defects. **Stem Cell**, v. 8, n. 1, p. 31–45, 2011.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.002>>.

ZHANG, Y.; SCHMID, B.; NIKOLAISEN, N. K.; RASMUSSEN, M. A.; ALDANA, B. I.; AGGER, M.; CALLOE, K.; STUMMANN, T. C.; LARSEN, H. M.; NIELSEN, T. T.; HUANG, J.; XU, F.; LIU, X.; BOLUND, L.; MEYER, M.; BAK, L. K.;

WAAGEPETERSEN, H. S.; LUO, Y.; NIELSEN, J. E.; HOLST, B.; CLAUSEN, C.; HYTTEL, P.; FREUDE, K. K. Patient iPSC-Derived Neurons for Disease Modeling of Frontotemporal Dementia with Mutation in CHMP2B. **Stem Cell Reports**, v. 8, n. 3, p. 648–658, 2017. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213671117300279>>.

ZHOU, L.; WANG, W.; LIU, Y.; DE CASTRO, J. F.; EZASHI, T.; TELUGU, B. P. V. L.; ROBERTS, R. M.; KAPLAN, H. J.; DEAN, D. C. Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina. **Stem Cells**, v. 29, n. 6, p. 972–980, 2011.

ZHU, H.; CRAIG, J. A.; DYCE, P. W.; SUNNEN, N.; LI, J. Embryos Derived from Porcine Skin-Derived Stem Cells Exhibit Enhanced Preimplantation Development¹.

Biology of Reproduction, v. 71, n. 6, p. 1890–1897, 2004. Disponível em:

<<https://academic.oup.com/biolreprod/article-lookup/doi/10.1095/biolreprod.104.032227>>.