LAÍS VICARI DE FIGUEIREDO PESSÔA

Estudo do potencial de pluripotência de células-tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas à reprogramação induzida geneticamente (células iPS)

Pirassununga

2016

LAÍS VICARI DE FIGUEIREDO PESSÔA

Estudo do potencial de pluripotência de células-tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas à reprogramação induzida geneticamente (células iPS)

Tese 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 obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Co-Orientador:

Dra. Fabiana Fernandes Bressan

Pirassununga

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3419
FMVZ

Pessôa, Laís Vicari de Figueiredo
Estudo do potencial de pluripotência de células-tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas à reprogramação induzida geneticamente (células iPS) / Laís Vicari de Figueiredo Pessôa. -- 2016.
135 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, Pirassununga, 2016.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.

Co-orientador: Dra. Fabiana Fernandes Bressan.

1. iPS. 2. Equino. 3. Célula tronco. 4. Cordão umbilical. 5. Medula óssea. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Estudo do potencial de pluripotência de células-tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical (células iPS)", protocolado sob o nº2913/2013, utilizando três amostras de tecido epitelial, três amostras de tecido adiposo e três cordões umbilicais equinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, foi aprovado "ad referendum" e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Study of the pluripotency potential of equine stem cells derived from adult tissue and umbilical cord subjected genetically induced reprogramming (iPS cells)", protocol number 2913/2013, under the responsibility Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, was approved "ad referendum" and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 26 de maio de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PESSÔA, Laís Vicari de Figueiredo

Título: **Estudo do potencial de pluripotência de células-tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas à reprogramação induzida geneticamente (células iPS)**

Tese 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 obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, em especial a meus pais **Ana e José**, minhas irmãs, **Paula e Mariana,** meu namorado **Pedro** e a **Lola**. Minha família sempre me deu todo o apoio necessário para que eu pudesse realizar este trabalho, e por apoio necessário eu quero dizer tanta coisa, que nem caberia por aqui. Em relação ao Pedro, não tenho nem palavras para descrever toda a ajuda, científica ou não, mas principalmente muito obrigada por aturar meu mau humor sem sair do meu lado! Muito obrigada a todos, amo vocês!

Agradeço ao Prof. **Flávio Meirelles** que me aceitou como orientada em mais essa jornada e sempre me deu apoio científico, me ensinando a pensar como pesquisadora. Muito obrigada, Professor.

À minha co-orientadora, **Drª. Fabiana Fernandes Bressan,** agradeço imensamente sua amizade e colaboração durante não só este trabalho, mas desde minha chegada à Pirassununga. Tenho certeza que sem sua ajuda, nós não estaríamos aqui hoje!

Aos meus amigos e colegas Maite, Naira, Juliano Silveira e Kaiana, muito obrigada pela ajuda! Cada um de vocês é meio dono de um pedacinho deste trabalho.

Aos meus amigos pessoais e de laboratório, Mateus, Juliano, Rafa, Paulinho, Ligia, Neto, Luquinhas, Natália, Lenise, Pedro, Paula, Arina, Aline, Tiago de Bem, Maíra, Gabi, Kelly, Gabriel, Heloísa, Vanessa, Simone aos Professores Heidge, Perecin, Caju, Dani, Bento, Luciano, André e Ricardo e à minha família em Pirassununga, Monica, Eduardo e Tiago, todos vocês contribuíram de alguma forma para este trabalho, em momentos científicos e discussões ou em momentos de descontração.

Agradeço à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Hemocentro de Ribeirão Preto, à FAPESP (Processo 2013/17955-3), ao CEPID-CTC (FAPESP 2013/08135-2) e ao CNPq por possibilitarem a execução deste estudo.

RESUMO

PESSÔA, L. V. F. **Estudo do potencial de pluripotência de células-tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas à reprogramação induzida geneticamente (células iPS).** [Pluripotency potential of equine mesenchymal cells obtained from different sources subjected to genetically induced reprogramming (iPS cells)]. 2016. 135 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

A inserção de fatores de transcrição conhecidos em células somáticas é capaz de reprograma-las levando a um estágio de pluripotência, gerando células-tronco pluripotentes induzidas (iPS). A utilização destas células na medicina regenerativa tem grande potencial tanto na medicina humana quanto na veterinária, e a influência da origem da célula somática utilizada na geração de iPS é discutida atualmente. Mamíferos domésticos, como por exemplo o equino, são bons modelos para o estudo para medicina humana e veterinária, com destaque para terapia celular utilizando células mesenquimais em lesões ortopédicas e articulares. Tendo como hipótese que células equinas com diferentes origens apresentam potenciais de indução à pluripotência e capacidade de diferenciação *in vitro* variáveis; esta proposta tem como objetivo gerar células iPS equinas obtidas através da transdução viral dos fatores de transcrição OSKM humanos ou murinos em fibroblastos (eFibro) adultos e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (eAdMSC), medula óssea (eMO) e tecido de cordão umbilical (etCU). Foram isoladas e cultivadas 4 linhagens de células do tecido de cordão umbilical, 3 linhagens de fibroblastos equinos, 3 linhagens de células mesenquimais de tecido adiposo equinas e 2 linhagens de células de medula óssea equina. Essas células tiveram seu tempo de duplicação celular calculado em horas (eMO 61,3±15; etCU 53,8±5; eFIBRO 27±2; eAdMSC 18,2±4,5) e foram caracterizadas por diferenciação condrogênica, osteogênica e audiogênica e por imunofenotipagem. A partir destas células foram produzidas 85 linhagens iPS equinas (eiPS- 30 linhagens derivadas de fibroblasto, 33 linhagens derivadas de células de tecido adiposo, 21 linhagens derivadas de células de tecido de cordão umbilical com os fatores humanos e 1 linhagem de derivada de células de tecido adiposo com os fatores murinos). Testes de detecção de fosfatase alcalina e OCT4 foram realizados para células eiPS obtidas de cada linhagem e as células eiPS derivadas de tecido adiposo e fibroblastos foram

positivas para detecção de NANOG, TRA1-60, TRA1-81 e as células eiPS derivadas de eAdMSC foram positivas para detecção de SSEA-1. As células eiPS derivadas de cada tipo celular geraram corpos embrióides, que posteriormente foram dissociados para teste de diferenciação espontânea *in vitro.* Os resultados mostram que células equinas podem ser mais facilmente reprogramadas com fatores humanos quando comparadas com os fatores murinos ($P<0.05$). Enquanto os fatores murinos produziram apenas uma linhagem de células iPS derivada de eAdMSC, os fatores de reprogramação humanos foram capazes de produzir variadas linhagens de células iPS, sendo a formação de colônias mais eficiente para células derivadas de eAdMSC (322, $P<0.01$) do que para células derivadas de eFibro (65) e etCU (58), que não diferiram ($P=0.95$), e não foi possível produzir células eiPS a partir de eMO. Usando o sistema de indução à pluripotência padronizado em nosso laboratório, a utilização de fatores humanos na reprogramação direta gera uma maior eficiência na produção de células iPS equinas quando comparados com fatores murinos. No nosso conhecimento, este é o primeiro relato de células eiPS produzidas unicamente dependentes de bFGF, sem necessidade de adição de LIF no meio de cultivo.

Palavras-chave: iPS. Equino. Célula tronco. Cordão umbilical. Medula óssea.

ABSTRACT

PESSÔA, L. V. F. **Pluripotency potential of equine mesenchymal cells obtained from different sources subjected to genetically induced reprogramming (iPS cells).** [Estudo do potencial de pluripotência de células-tronco equinas derivadas de tecido adulto e cordão umbilical submetidas à reprogramação induzida geneticamente (células iPS)]. 2016. 135 f Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

The insertion of known transcription factors into somatic cells is capable of reprogramming them into a pluripotency stage, generating induced pluripotent stem cells (iPS). The influence of the origin of the somatic cell used in the generation of iPS is currently discussed, and the use of these cells in regenerative medicine has great potential in both human and veterinary medicine. Domestic mammals, such as the equine are great models for the study of human and veterinary medicine, highlighting cell therapy using mesenchymal cells in orthopedic and articular injuries. Hypothesizing that equine cells derived from different tissues show variable pluripotency induction potentials and *in vitro* differentiation capacity, depending on the source of derivation; this proposal aims to generate equine iPS cells obtained by viral transduction of human or murine OSKM transcription factors in adult fibroblasts (eFibro) and mesenchymal cells derived from adipose tissue (eAdMSC), bone marrow(eMO), umbilical cord tissue (etCU). Four umbilical cord tissue cell lines, three equine fibroblast cells lines, three equine adipose tissue mesenchymal cell lines and 2 equine bone marrow cell lines were isolated and cultured. These cells had their doubling time calculated in hours (eMO 61.3 ± 15, etCU 53.8 ± 5, eFIBRO 27 ± 2, and ADMSC 18.2 ± 4.5) and were characterized by chondrogenic, osteogenic and adipogenic and by immunophenotyping. From these cells, 85 equine iPS (eiPS) cell lines were produced (30 fibroblast-derived cell lines, 33 cell lines derived from adipose tissue cells, 21 cell lines derived from umbilical cord tissue cells, with human factors and 1 cell line derived from eAdMSC using murine factors). Alkaline phosphatase and OCT4 detection tests were performed on eiPS cells obtained from each cell line and eAdMSC and eFibro derived iPS cells were positive for the detection of NANOG,TRA1-60, TRA1-81 and eiPS derived from eAdMSC were positive for SSEA-1 detection. Embryonic bodies, which were later dissociated for spontaneous differentiation test *in vitro* were derived from each cell type. Results

show that equine cells can be more easily reprogrammed with human factors when compared to murine factors (P<0.05). While murine factors produced only one eiPS cell line derived from eAdMSC, human reprogramming factors were able to produce multiple eiPS cell lines, and colony formation was more efficient for cells derived from eAdMSC (322 P <0.01) than for cells derived from eFibro (65) and etCU (58), which did not differ (P = 0.95) and It has not yet been possible to produce iPS cells from the eMO cell lines. Using the induction system standardized in our laboratory, the use of human factors in direct reprogramming results in greater efficiency in the production of equine iPS cells when compared to murine factors. To our knowledge, this is the first report of eiPS cells produced solely dependent on bFGF, without the need for addition of LIF in the culture medium.

Key words: iPS. Equine. Stem cell. Umbilical cord. Bone marrow.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens das células equinas derivadas de diferentes fontes..... 36

Figura 2 - Imagens mostrando células equinas de diferentes fontes após processo de diferenciação 37

Figura 3 - Imagens mostrando células do grupo controle do experimento de diferenciação..... 38

Figura 4 - Gráfico mostrando o tempo de duplicação celular das várias linhagens equinas estudadas neste projeto..... 40

Figura 5 - Mapa do vetor STEMCCA..... 56

Figura 6 - Esquema experimental da indução a pluripotência em função do tempo de cultivo 57

Figura 7 - Processo de isolamento de MEFs 59

Figura 8 - Momentos de coleta de material para análise experimental..... 66

Figura 9 - Colônias de células eiPS derivadas de etCU..... 68

Figura 10 - Células após 15 dias em reprogramação com os fatores humanos e murinos 69

Figura 11 - Células após 30 dias em reprogramação com os fatores humanos e murinos 70

Figura 12 - Células eiPS produzidas com os fatores de reprogramação murinos 71

Figura 13 - Gráfico mostrando produção total de células eiPS com fatores hOSKM..... 72

Figura 14 - Gráfico mostrando a produção total de células eiPS com fatores mOSKM..... 72

Figura 15 - Colônias de iPS equinas no dia 18 depois da infecção 73

Figura 16 - Colônias de iPS equinas no dia 31 depois da infecção 74

Figura 17 - Colônias de iPS equina positivas para detecção de fosfatase alcalina 75
Figura 18 - Produção de corpos embrióides a partir das células eiPS..... 76
Figura 19 - Diferenciação espontânea dos corpos embrióides 76
Figura 20 - Detecção imunocitoquímica de OCT4 das células eiPS..... 77
Figura 21 - Detecção imunocitoquímica de NANOG das células eiPS 78
Figura 22 - Detecção imunocitoquímica de TRA1-60 das células eiPS 78
Figura 23 - Detecção imunocitoquímica de TRA1-81 das células eiPS 79
Figura 24 - Detecção imunocitoquímica de SSEA1 das células eiPS..... 79
Figura 25 - Ausência de detecção imunocitoquímica de SSEA4 das células eiPS..... 80
Figura 26 - Expressão de Oct4, Nanog e do endógeno GAPDH nas células equinas pré e pós indução a pluripotência..... 81
Figura 27 - Heatmap da análise do perfil de miRNA das células eiPS e controle 82
Figura 28 - Score plot da análise do perfil de miRNA das células eiPS e controle 83
Figura 29 - Análise do perfil de miRNA das células eiPS eFibro e controle..... 85
Figura 30 - Diagrama de Venn mostrando os miRNAs expressos em cada grupo 85
Figura 31 - Análise do perfil de miRNA das células eiPS etCU e controle..... 87
Figura 32 - Diagrama de Venn os miRNAs expressos em cada grupo..... 87
Figura 33 - Diagrama de Venn mostrando os miRNAs expressos em cada grupo 89
Figura 34 - Análise do perfil de miRNA das células eiPS eAdMSC e controle 89
Figura 35 - Níveis de expressão da família eca-miR-302 nas eiPS e controle 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem média de expressão de cada anticorpo em cada tipo celular após análise por citometria de fluxo 38

Tabela 2 - Relação de primers utilizados para análise de expressão gênica de genes associados a pluripotência 63

Tabela 3 - Resumo da produção total de células eiPS 66

Tabela 4 - Lista de miRNAs exclusivamente expressos em cada grupo 95

SUMÁRIO

1 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 20

1.1 INTRODUÇÃO GERAL 21

1.2 HIPÓTESES 24

1.3 OBJETIVOS 24

1.3.1 Objetivos gerais 24

1.3.2 Objetivos específicos 25

2 CAPÍTULO II: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE TECIDO ADULTO E DE CORDÃO UMBILICAL 26

2.1 INTRODUÇÃO 27

2.2 REVISÃO DE LITERATURA 27

2.2.1 Células tronco embrionárias e mesenquimais equinas 29

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS 30

2.3.1 Obtenção de células da medula óssea, células de tecido de cordão umbilical, fibroblastos equinos e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo 30

2.3.1.1 Células de medula óssea 30

2.3.1.2 Células de tecido de cordão umbilical 31

2.3.1.3 Fibroblastos equinos 31

2.3.1.4 Células mesenquimais de tecido adiposo 32

2.3.2 Caracterização celular 32

2.3.2.1 Diferenciação induzida 33

2.3.2.2 Imunofenotipagem das células equinas 33

2.3.2.3 Cálculo do tempo de duplicação celular 34

2.3.2.4 Análises estatísticas 35

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 35

2.4.1 Produção de linhagens celulares 35

2.4.2 Caracterização celular 37

2.4.2.1 Diferenciação induzida pelo kit StemPro 37

2.4.2.2 Imunofenotipagem 38

2.4.2.3 Tempo de duplicação celular 39

2.4.3 Discussão 40

2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS 43

REFERÊNCIAS 44

3 CAPÍTULO III: INDUÇÃO À PLURIPOTÊNCIA EM CÉLULAS ADULTAS E DE CORDÃO UMBILICAL DE EQUINOS ATRAVÉS DA INDUÇÃO GÊNICA. **49**

3.1 INTRODUÇÃO 50

3.2 REVISÃO DE LITERATURA 51

3.2.1 Reprogramação Nuclear 51

3.2.2 Aquisição da pluripotência 52

3.2.3 iPS equinas 54

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS 55

3.3.1 Produção e caracterização células iPS equinas através dos fatores de transcrição relacionados à pluripotência. 55

3.3.2 Análise estatística 57

3.3.3 Produção de fibroblastos embrionários murinos (MEF) para utilização de monocamadas celulares de suporte 58

3.3.4 Detecção de fosfatase alcalina, formação de corpos embrióides (CE) e diferenciação espontânea in vitro 59

3.3.5 Caracterização das células eiPS por imunocitoquimíca 60

3.3.5.1 OCT4 60

3.3.5.2 NANOG, TRA1-60 e TRA1-81 60

3.3.5.3 SSEA1 e SSEA4 61

3.3.6 Diferenciação das células eiPS *in vitro* 61

3.3.6.1 Diferenciação das células eiPS com kit Ectoderm StemXVivo (R&D systems) 62

3.3.6.2 Diferenciação das células eiPS com kit Endoderm StemXVivo (R&D systems) 62

3.3.6.3 Diferenciação das células eiPS com kit Mesoderm StemXVivo (R&D systems) 63

3.3.7 Confirmação da reprogramação celular através da expressão gênica de transcritos relacionados à pluripotência 63

3.3.8 Análise do perfil de miRNAs das células eiPS de derivadas de diferentes tipos celulares 64

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 66

3.4.1 Produção e caracterização das células eiPS 66

3.4.2 Análise do perfil global de miRNAs após o processo de indução à pluripotência 81

3.4.2.1 Análise bioinformática do perfil de miRNAs para identificação de vias reguladas nas células eiPS derivadas de fibroblastos 83

3.4.2.2 Análise bioinformática do perfil de miRNAs para identificação de vias reguladas nas células eiPS derivadas de mesenquimais de cordão umbilical 86

3.4.2.3 Análise bioinformática do perfil de miRNAs para identificação de vias reguladas nas células eiPS derivadas de mesenquimais de tecido adiposo 88

3.4.3 Discussão 90

3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS 100

REFERÊNCIAS 101

APÊNDICES **113**

ANEXOS **127**

4 CAPÍTULO V: CONCLUSÕES GERAIS 129

4.1 CONCLUSÕES 130

REFERÊNCIAS 133

1 CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 INTRODUÇÃO GERAL

Desde a clonagem da ovelha Dolly através da técnica de transferência nuclear de célula somática (TNCS - WILMUT et al., 1997) pode-se afirmar que oócitos são capazes de reverter o estado diferenciado de núcleos de células somáticas, feito já realizado para as mais variadas espécies ao longo das últimas décadas. Em 2006, Takahashi e Yamanaka mostraram que fatores que apresentavam papel importante na manutenção das características de células embrionárias também seriam de igual importância para a indução de células somáticas à pluripotência. Desta maneira desenvolveram outra técnica de reprogramação gênica de células diferenciadas à pluripotência, através da introdução, em células de camundongo, dos fatores relacionados à pluripotência OCT3/4, SOX2, KLF4 e c-MYC (OSKM). Esses fatores foram escolhidos dentre 24 genes selecionados inicialmente por serem importantes para a indução e manutenção da do estado de pluripotência de células tronco embrionárias (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; JAENISCH; YOUNG, 2008). Desde então, essas células, chamadas de iPS (*induced pluripotent stem cells*) foram geradas para mais de 10 espécies animais.

O fator de transcrição OCT4 (*octamer-binding protein 4*, também conhecido como Pou5f1- POU *domain, class* 5, *transcription factor 1*) é expresso em embriões e células germinativas. Já foi comprovado que embriões de camundongo com deficiência na expressão de OCT4 desenvolvem-se até o estágio de blastocisto, porém sem apresentar pluripotência nas células da massa celular interna (NICHOLS et al., 1998), sendo assim, sua presença é diretamente correlacionada à pluripotência (NIWA et al., 2000). Foi evidenciado que a sequência do OCT4 é altamente conservada entre as espécies de mamíferos e a similaridade entre as sequências indica que o papel desempenhado por ele seja similar entre essas espécies (KIRCHHOF et al., 2000).

É grande o interesse na obtenção de células-tronco embrionárias de grandes mamíferos, como o equino e o bovino, seja ela para a pesquisa básica ou aplicada, uma vez que estes animais são ótimos modelos para o estudo de doenças humanas. Porém, as células tronco embrionárias equinas se mostraram problemáticas para o isolamento sendo que, até o momento só foram obtidas as

chamadas “células tronco embrionárias-*like*” (Saito et al., 2002; Li et al., 2006), que apresentam determinadas características de células tronco, como crescimento indeterminado e pluripotência *in vitro* além de expressão de determinados marcadores de pluripotência, porém não apresentaram provas de sua pluripotencialidade *in vivo*, como a formação de teratomas e/ou quimeras (PARIS et al., 2010). Já as células-tronco adultas, como possibilidade de tratamento, são cada vez mais estudadas e a aplicação de células mesenquimais em lesões ortopédicas e articulares já é uma realidade em clínicas pelo mundo, apresentando resultados como 76% de retorno ao trabalho em casos de injurias do ligamento suspensório, 77% dos casos de injurias de tendão e 57% dos casos de problemas articulares[1]. As células tronco de medula óssea utilizadas para a realização de terapia celular em equinos (DE VITA et al., 2012), e apresentam grande potencial osteogênico (TOUPADAKIS et al., 2010), alcançando altas taxas de recuperação em casos de lesões de tendão (PACCINI et al., 2007). Já as células mesenquimais de tecido adiposo representam uma fonte interessante para terapia celular, uma vez que são obtidas de maneira menos invasiva e em maior quantidade (KERN et al., 2006; TOUPADAKIS et al., 2010). As células derivadas de tecidos placentários, como cordão umbilical são de uma fonte não invasiva e possuem alta longevidade (TOUPADAKIS et al., 2010; CARRADE et al., 2012).

Uma vez que as lesões musculoesqueléticas são as principais limitantes da carreira de cavalos atletas, a terapia celular é um ramo cada vez mais importante da medicina regenerativa. A produção de células autólogas é de grande interesse médico e científico, porém, a produção a partir de células pluripotentes significa um avanço ainda maior no campo da terapia celular, uma vez que gera células capazes de se diferenciar nos mais variados tipos, ampliando o horizonte da medicina regenerativa.

As células iPS equinas já foram obtidas por alguns grupos de pesquisa. Nagy et al. (2011) obtiveram sucesso na produção de iPS com um sistema de *PiggyBac-transposon* associado à tetraciclina em fibroblastos fetais com fatores murinos. Já Khodadadi et al. (2012) obtiveram células iPS equinas através da transdução retroviral dos fatores OCT4, KLF4 e SOX2 humanos em fibroblastos adultos, assim como e Whitworth et al. (2014), que incluíram outro fator de

[1] Relatos clínicos da VetStem- *Regenerative Veterinary Medicine*, dados obtidos de http://www.vet-stem.com/horses.php em 07/11/2016.

reprogramação, o c-MYC; e fibroblastos de potros foram utilizados para a produção de células iPS equinas a partir introdução de vetores virais contendo os fatores OSKM murinos (BRETON et al., 2013) e a partir de células mesenquimais de tecido adiposo (LEE et al., 2016 no prelo)[2]. Como é possível observar, o número de células iPS equinas produzidas é pequeno e seu potencial de diferenciação em células de interesse terapêutico ainda não foi devidamente estudado (SHARMA et al., 2014).

Assim, neste estudo, objetivamos a geração de células iPS equinas através da introdução de fatores OSKM interespecíficos para a produção das células iPS de diferentes origens: mesenquimais derivadas de tecido adiposo, de medula óssea, de tecido de cordão umbilical e fibroblastos. Os diferentes tipos celulares foram utilizados visando avaliar possíveis efeitos de origem celular.

Nosso grupo obteve sucesso na produção de células iPS equinas por meio da introdução de fatores relacionados a pluripotência através de vetores lentivirais policistrônicos excisáveis STEMCCA (*Stem cell cassette*; SOMMER et al. 2009) contendo a sequência para transcritos dos genes OCT4, KLF4, SOX2 e c-MYC humanos em células mesenquimais derivadas de tecido adiposo equino (BRESSAN, 2013), tecido de cordão umbilical e fibroblastos adultos. Também obtivemos células iPS equinas a partir dos fatores OSKM murinos, utilizando células derivadas de tecido adiposo equino, porém com uma eficiência mais baixa. Em nossos resultados preliminares há indícios que a utilização de fatores específicos humanos na reprogramação direta gera uma maior eficiência na produção de células iPS equinas. Acreditamos também que a fonte de derivação das células-tronco equinas pode influenciar na capacidade de reprogramação e posterior re-diferenciação destas células.

As células iPS produzidas neste estudo a partir de fibroblastos, células mesenquimais de tecido adiposo e de tecido de cordão umbilical foram caracterizadas quanto à detecção de fosfatase alcalina e formação de corpos embrióides, expressão gênica de OCT4 e NANOG, expressão de OCT4, NANOG, TRA1-60, TRA1-81, SSEA1, SSEA4 e perfil de miRNA.

---

[2] LEE, E. M.; KIM, A.Y.; LEE, E. J.; PARK, J. K.; PARK, S. I.; CHO, S. G.; KIM, H. K.; KIM, S. Y.; JEONG, K. S. Generation of equine induced pluripotent stem cells and analysis of their therapeutic potential for muscle injuries. **Cell Transplantation**, 2016. (no prelo)

Como é possível observar, todos os dados envolvendo a produção de células iPS de equinos são recentes e ainda são necessários mais estudos a respeito destas células, principalmente visando a terapia celular.

1.2 HIPÓTESES

- A geração de células iPS equinas é possível através da introdução de fatores interespecíficos (humanos e murinos) relacionados à pluripotência e é mais eficiente a partir da introdução dos fatores humanos.
- Células pluripotentes induzidas equinas derivadas de diferentes tecidos apresentam características de pluripotência e capacidade de diferenciação *in vitro* diferentes, segundo a fonte de derivação.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivos gerais

- Gerar e caracterizar células equinas derivadas de diferentes tecidos:
  - Células mesenquimais de tecido adiposo (eAdMSC)
  - Células mesenquimais de medula óssea (eMO)
  - Células mesenquimais do tecido de cordão umbilical (etCU)
  - Fibroblastos equinos (eFibro)

- Estudar a geração iPS equinas (eiPS) a partir dos diferentes tipos celulares isolados, através da introdução dos fatores OSKM humano ou murino, avaliando a influência da fonte celular na reprogramação.

1.3.2 Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar por diferenciação induzida e imunofenotipagem as linhagens celulares equinas de medula óssea, de tecido adiposo, de tecido de cordão umbilical e fibroblastos.

- Induzir estas linhagens celulares à pluripotência por reprogramação direta através da introdução dos fatores OSKM humanos ou murinos.

- Caracterizar as células iPS geradas quanto à pluripotência e perfil de miRNA.

2 CAPÍTULO II: PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES DERIVADAS DE TECIDO ADULTO E DE CORDÃO UMBILICAL

2.1 INTRODUÇÃO

A indústria do cavalo movimenta mais de 100 bilhões de dólares por ano (SHARMA et al., 2014) portanto, as afecções musculoesqueléticas geram prejuízo e são a principal causa de problemas em equinos, além de ser as responsáveis por aposentar de 50 a 75% dos animais acometidos, devido à baixa capacidade de autorreparo apresentada por cartilagens e tendões (KHODADADI et al., 2012).

Devido as semelhanças entre atletas humanos e equinos e entre as lesões decorrentes da atividade física em ambas espécies (HACKET et al., 2012), equinos são ótimos modelos para pesquisa musculo esquelética e de terapia celular. Sendo a última considerada problemática, uma vez que aproximadamente 0,01% das células mesenquimais usadas na terapia são de fato multipotentes, o potencial de replicação e diferenciação são limitados (BRETON et al., 2013; SHARMA et al., 2014), as células são pouco caracterizadas e faltam sistemas apropriados para expansão e manutenção das mesmas *in vitro* (SHARMA et al., 2014).

Considerando que as células mesenquimais não são plenamente caracterizadas, e que existem indícios de que células iPS apresentam vestígios epigenéticos residuais oriundos da célula que foi reprogramada, que podem apresentar efeitos na capacidade de reprogramação e diferenciação das mesmas (KIM et al., 2010), ponderamos ser importante a utilização de mais de uma fonte celular para os experimentos deste estudo. Assim, objetivou-se obter e caracterizar as linhagens celulares equinas que foram trabalhadas neste estudo. São elas: células de medula óssea, de tecido adiposo, de tecido de cordão umbilical e fibroblastos.

2.2 REVISÃO DE LITERATURA

Logo após a formação do zigoto através da fusão dos gametas feminino e masculino inicia-se o processo de reprogramação celular, que resulta na divisão destas células em duas categorias distintas: o trofoblasto, que dará origem aos anexos embrionários e a massa celular interna, formada por células pluripotentes

que originarão células das três camadas germinativas (ROSSANT, 2001; OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008).

As células-tronco embrionárias (CTEs) são células derivadas da massa celular interna de embriões no início do desenvolvimento (blastocistos), que apresentam a capacidade de se diferenciar em qualquer um dos folhetos germinativos embrionários: a endoderme, a mesoderme e a ectoderme, que darão origem centenas tipos celulares durante todo o desenvolvimento, além de crescer indefinidamente mantendo sua pluripotência (EVANS; KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; THOMSON et al., 1998; OHGANE; YAGI; SHIOTA, 2008). Além disso, as CTEs apresentam características morfológicas específicas como formato arredondado, núcleo grande e citoplasma escasso (THOMSON et al., 1998; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). As CTEs são interessantes do ponto de vista da pesquisa pois poderiam ser utilizadas em terapia celular em uma variedade de doenças além serem consideradas um notável mecanismo para o estudo da diferenciação celular e desenvolvimento embrionário humano. Porém sua utilização prática na pesquisa fica comprometida, uma vez que as CTEs dependeriam da produção e destruição de embriões. Assim, foi necessário desenvolver outros métodos que gerassem células semelhantes morfologicamente e que atuassem da mesma forma. Foi assim que surgiram os estudos relacionados às células tronco de pluripotência induzida (células IPS; TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

Desde 2006, as células iPS são a grande esperança para a terapia celular. Como sua utilização na clínica humana ainda é considerada arriscada, os modelos animais, principalmente os com grandes mamíferos, ganham cada vez mais destaque no mundo da pesquisa. É por essas razões que cada vez mais grupos de pesquisa buscam estudar a fundo e desenvolver novas técnicas que aprimorem a produção das iPS para as mais variadas espécies animais.

Os equinos são atletas que possuem uma carreira considerada curta e instável, uma vez que estão expostos diariamente a riscos de fraturas e lesões que não apresentam hoje um tratamento totalmente satisfatório. Atualmente a terapia celular com células mesenquimais é considerada uma nova opção que seria capaz de remediar situações antes consideradas graves. Uma vez que as células iPS são pluripotentes e não multipotentes como as células mesenquimais, espera-se que sua utilização na clínica seja mais eficiente para determinados tratamentos. Por isso o

campo das células iPS precisa ser estudado a fundo para que possamos conhecer intimamente o funcionamento destas células.

2.2.1 Células tronco embrionárias e mesenquimais equinas

O isolamento de células tronco embrionárias não foi bem-sucedido para todas as espécies (FORTIER, 2005) e em equinos, até o momento, só foram isoladas as chamadas "células tronco embrionárias-like" (CTE-like), que não apresentam todas as características esperadas de uma célula tronco embrionária propriamente dita. O primeiro relato sobre CTE-like equinas é de Saito et al. (2002), que isolaram as células através da dissecação microcirúrgica da massa celular interna de blastocistos entre os dias 6 e 7. Estas células mantiveram sua capacidade de proliferação *in vitro* por mais de 50 passagens, foram positivas para marcadores de pluripotência clássicos como fosfatase alcalina, OCT4, SSEA1 e STAT3 e possuem a capacidade de se diferenciar em outros tipos celulares. Já Li et al. (2006) produziu CTE-*like* a partir da dissecação imuno-cirúrgica de blastocistos expandidos. Estas células também se mostraram positivas para os marcadores de pluripotência fosfatase alcalina, OCT4, SSEA1 e STAT3, entre outros assim como a capacidade de diferenciação em outros tipos celulares. Porém as linhagens de CTE-*like* apresentadas falharam em demostrar o potencial de pluripotência *in vivo,* através da formação de quimeras ou teratomas (SAITO et al., 2002; LI et al., 2006; PARIS et al., 2010).

A definição clássica de células mesenquimais atesta que elas devem ser aderentes ao plástico, fusiformes e multipotentes, apresentando a capacidade de diferenciação condrogênica, adipogênica e osteogênica (CARRADE et al., 2012). Entre as células tronco mesenquimais, as células tronco de medula óssea, na forma de aspirado celular, que foram utilizadas para terapia em equinos pela primeira vez no início dos anos 2000 (HERTHEL, 2002) ainda são amplamente utilizadas para a realização de terapia celular em equinos (DE VITA et al., 2012), porém, apresentam desvantagens como o longo tempo necessário para expansão destas células in vitro (3 a 6 semanas) e este tempo em cultivo é essencial, uma vez que a quantidade de células mesenquimais presentes no aspirado de medula óssea é baixo (0,001 a 0,01%; FORTIER; TRAVIS, 2011) e a utilização de células de medula óssea

expandidas pode atingir até 90% de sucesso em tratamentos de tendinites (PANCINI et al., 2007). Um estudo comparando o potencial osteogênico de células de medula óssea, tecido adiposo e de sangue e tecido de cordão umbilical mostrou que as células de medula óssea apresentam maior potencial osteogênico, seguidas pelas células de tecido adiposo e, com um potencial mais baixo, as células derivadas de cordão umbilical (TOUPADAKIS et al., 2010). Já as células mesenquimais derivadas de tecido adiposo podem ser consideradas muito interessantes para a terapia celular por apresentarem um número maior de células tronco por volume obtido de material (KERN et al., 2006) e por serem coletadas de uma forma menos invasiva que as células de medula óssea (TOUPADAKIS et al., 2010), porém podem ser difíceis de se obter em animais atletas, em plena forma física (CARRADE et al., 2011). As células derivadas de cordão umbilical são interessantes por consistirem de uma fonte não invasiva e por apresentarem alta longevidade (TOUPADAKIS et al., 2010; CARRADE et al., 2012), apesar das taxas de isolamento serem mais baixas que quando comparado com tecido adiposo ou medula óssea (63%, 100%, 100%, respectivamente) as células derivadas de cordão umbilical apresentaram maior potencial de expansão (KERN et al., 2006). As células mesenquimais de variadas fontes já são amplamente utilizadas para a terapia celular em equinos, porém ainda é necessário estudar estas células a fundo, para garantir resultados mais uniformes.

2.3 MATERIAIS E MÉTÓDOS

2.3.1 Obtenção de células da medula óssea, células de tecido de cordão umbilical, fibroblastos equinos e células mesenquimais derivadas de tecido adiposo

2.3.1.1 Células de medula óssea

As células de medula óssea equina foram obtidas através de uma colaboração com a Professora Fernanda da Cruz Landim e seu grupo (FMVZ/UNESP- Botucatu), de grande conhecimento na área de células tronco derivadas de animais domésticos (DE VITA et al., 2012; MAIA et al., 2013).

Resumidamente, os animais coletados foram sedados e anestesiados localmente na região do 5º esternebro, de onde as células são coletadas com uma agulha de Komiyashiki. O aspirado é fracionado por gradiente de densidade e centrifugado. O pellet é lavado algumas vezes até que as células sejam cultivadas em meio de cultivo *Eagle Dulbecco* Modificado (DMEM) (Life Technologies), suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/ml de piruvato e 1% de antibiótico e, cultivado em placas de 100 mm de diâmetro a 38,5ºC em atmosfera de 5% de CO_2 e máxima umidade (condição padrão da estufa) até 80% de confluência e criopreservadas para uso posterior, como descrito por Maia et al. (2013).

2.3.1.2 Células de tecido de cordão umbilical

As células de tecido de cordão umbilical foram derivadas a partir de um fragmento de cordão umbilical coletado imediatamente após a ruptura natural do cordão umbilical no pós-parto. O tecido foi lavado em solução salina 0,9% contendo 5% de antibiótico (estreptomicina e penicilina) e reduzido a pequenos fragmentos antes da incubação na forma de explantes em meio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; *Life Technologies*), suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) e 1% de antibiótico e, cultivado em placas de 35 mm de diâmetro nas condições padrão da estufa.

2.3.1.3 Fibroblastos equinos

Os fibroblastos equinos foram obtidos de pele de equino adulto. Um fragmento de pele foi coletado do pescoço de equino que foi lavado em solução salina 0,9% contendo 5% de antibiótico (estreptomicina e penicilina) e reduzido em pequenos fragmentos antes da incubação em 0,001% de colagenase IV (Sigma) por 3 h. Após inativação da colagenase, o precipitado de células foi ressuspendido em meio de cultivo IMDM, suplementado com 15% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/ml de piruvato e 1% de antibiótico e, cultivado em placas de 35 mm de diâmetro a

38,5ºC em condição padrão da estufa. As células foram repicadas antes de atingirem 90% de confluência e criopreservadas em várias alíquotas na terceira passagem para serem utilizadas para os experimentos.

2.3.1.4 Células mesenquimais de tecido adiposo

As linhagens de células mesenquimais de tecido adiposo foram obtidas a partir de uma biopsia de tecido equino retirada da prega da cauda e digerida em 5 ml de colagenase IV (Sigma) por um período de 3h em incubadora, lavado e plaqueado, como o descrito para os fibroblastos. As células mesenquimais foram repicadas antes de atingirem 90% de confluência e criopreservadas para posterior utilização.

Durante os experimentos, as células foram cultivadas em placas de 100 mm de diâmetro em IMDM na presença de 10% de SFB, 100 µg/ml de piruvato e 1% de antibiótico. As células foram contadas em Câmara de Neubauer a cada passagem para avaliação do crescimento celular. Foram derivados os tipos celulares descritos de pelo menos 3 animais diferentes.

2.3.2 Caracterização celular

As células derivadas de tecido adiposo, tecido de cordão umbilical, medula óssea e fibroblastos foram caracterizadas por diferenciação adipogênica, condrogênica e osteogênica seguindo as instruções do kit comercial StemPro (Gibco), sempre em triplicata.

2.3.2.1 Diferenciação induzida

Resumidamente, usando o kit StemPro, para a diferenciação celular condrogênica, as células eFibro, eMO, eAdMSC e etCU foram plaqueadas em gotículas 5 µl na concentração de 1,6 x 10^7células/ml e a placa foi incubada a 38,5°C, 5%CO_2 e máxima umidade, por 2h, quando o meio de diferenciação foi adicionado. O meio foi substituído a cada 4 dias, por 2 semanas. Para a diferenciação osteogênica, 5x 10^3 células/cm^2 foram plaqueadas e incubadas a 38,5°C, 5%CO_2 e máxima umidade, por 24h, quando o meio IMDM foi substituído por meio de diferenciação específico. As trocas de meio ocorreram a cada 4 dias, por 2 semanas. Já para a diferenciação adipogênica 1x 10^4 células/cm^2 foram plaqueadas e incubadas a 38,5°C, 5%CO_2 e máxima umidade, por 24h, quando o meio IMDM foi substituído por meio de diferenciação específico. As trocas de meio ocorreram a cada 4 dias, por 2 semanas.

As células do grupo controle foram plaqueadas nas mesmas condições, porém foram mantidas em meio IMDM. Ao final do período de 2 semanas, as células foram fixadas e coradas, utilizando-se os corantes *sudan black* para células diferenciadas por adipogênese, *alizarin red* para células diferenciadas por osteogênese e *alcian blue* para células diferenciadas por condrogênese.

2.3.2.2 Imunofenotipagem das células equinas

Os marcadores de superfície CD44 (MCA1082GA, AbD Serotek, Raleigh, NC, USA), CD86 (NB100-77815, BD Pharmigen), MHCI (MCA1086GA, AbD Serotek), e MHC II (MCA1085GA, AbD Serotek) foram selecionados para analise por citometria de fluxo por serem descritos na literatura como marcadores de células tronco mesenquimais equinas (CARRADE et al., 2011; BARBERINI et al., 2014; DE SCHAUWER et al., 2014;). Todas as centrifugações realizadas para a marcação destas células foram realizadas a 600g, temperatura ambiente por 5 minutos na centrifuga Eppendorf (5415 R). Para a marcação, as células foram peletizadas e lavadas com solução de BSA 0,1% seguida por centrifugação. A seguir, as células

foram bloqueadas com solução BSA 10% por 1 hora, a temperatura ambiente e centrifugadas. As células foram então marcadas com anticorpos primários na diluição 1:300 específicos para equinos por 1 hora a temperatura ambiente, lavadas e centrifugadas novamente. Foi realizada então a marcação com anticorpo secundário policlonal *goat anti-mouse* FITC (1:300, F-0479, Dako) por 1 hora, seguida por centrifugação e fixação com PFA 2% a temperatura ambiente, por 10 minutos. Foi realizada uma última centrifugação e as células foram suspendidas em 300μl de PBS para citometria de fluxo (FACS ARIA, BD).

2.3.2.3 Cálculo do tempo de duplicação celular

As linhagens celulares foram semeadas em triplicata, na concentração $3x10^4$, em placas de 6 poços. Após 48hr em cultivo, as células foram repicadas enzimaticamente (*Tryple Express*, Sigma), contadas em câmara de Neubauer e semeadas novamente na concentração inicial ($3x10^4$), processo esse que foi repetido por pelo menos três passagens. O cálculo do tempo de duplicação celular (em horas) foi realizado usando como base a fórmula a seguir, como descrito por Gruber et al. (2011).

$TD = (T - T_0) \log 2 / (\log N - \log N_0)$

Onde:
TD= tempo de duplicação celular
$(T - T_0)$ = tempo (horas) de incubação entre os repiques
N_0 = número inicial de células semeadas
N = número de células recuperadas após o repique

2.3.2.4 Análises estatísticas

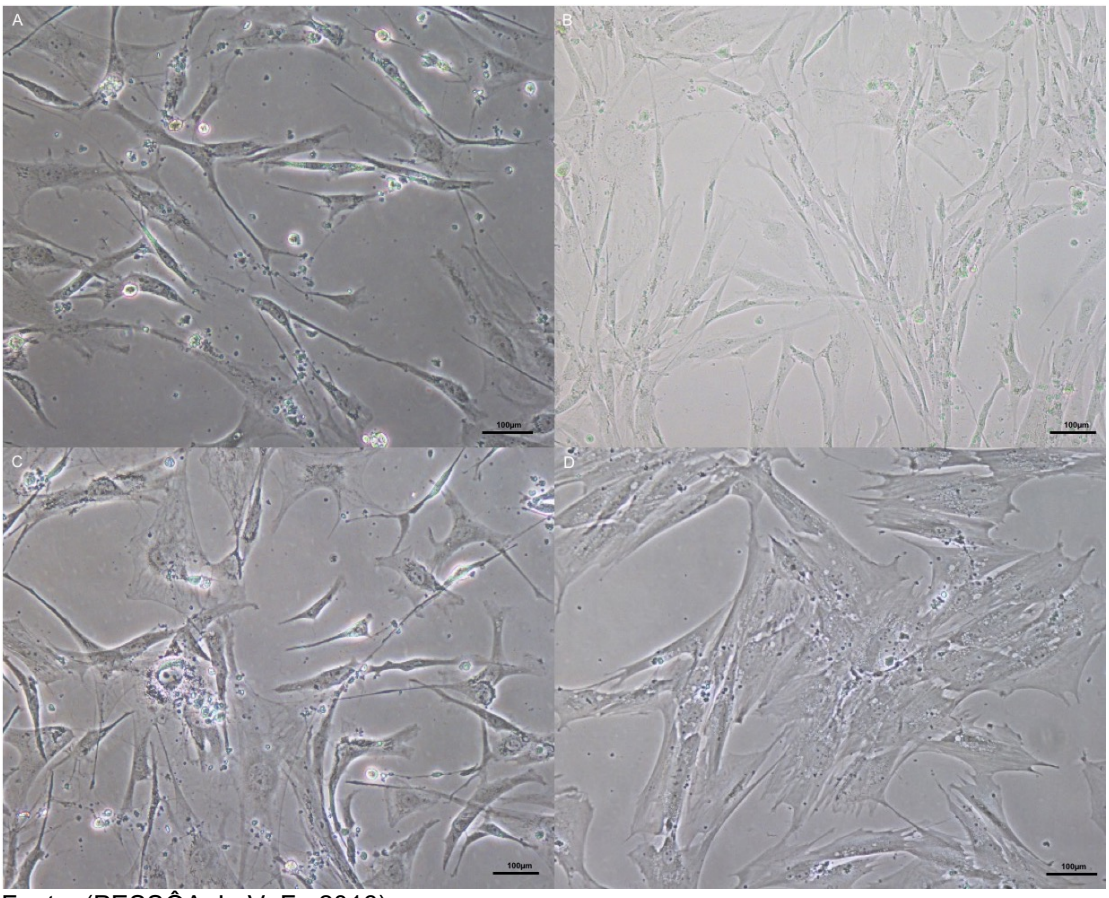
Para a análise estatística dos experimentos de imunofenotipagem e tempo de duplicação celular, foi aplicado um teste de análise de variância seguido por teste de Tukey adotando um critério com 5% de significância.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Produção de linhagens celulares

Obtivemos 4 linhagens de células do tecido de cordão umbilical, 3 linhagens de fibroblastos equinos, 3 linhagens de células mesenquimais de tecido adiposo equinas e 2 linhagens de células de medula óssea equina (Figura 1).

Figura 1 - Imagens das células equinas derivadas de diferentes fontes



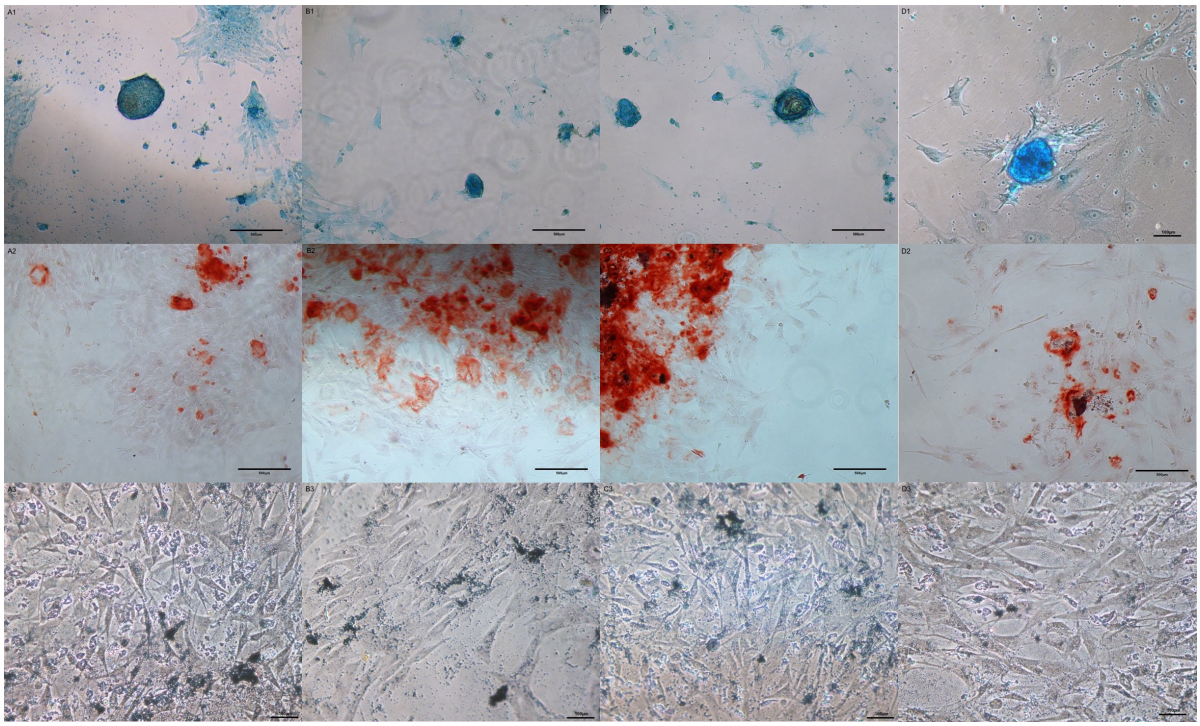
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: (A) são células obtidas de tecido adiposo, (B) são fibroblastos, (C) são células obtidas de tecido de cordão umbilical e (D) são células obtidas de medula óssea (200x).

2.4.2 Caracterização celular

2.4.2.1 Diferenciação induzida pelo kit StemPro

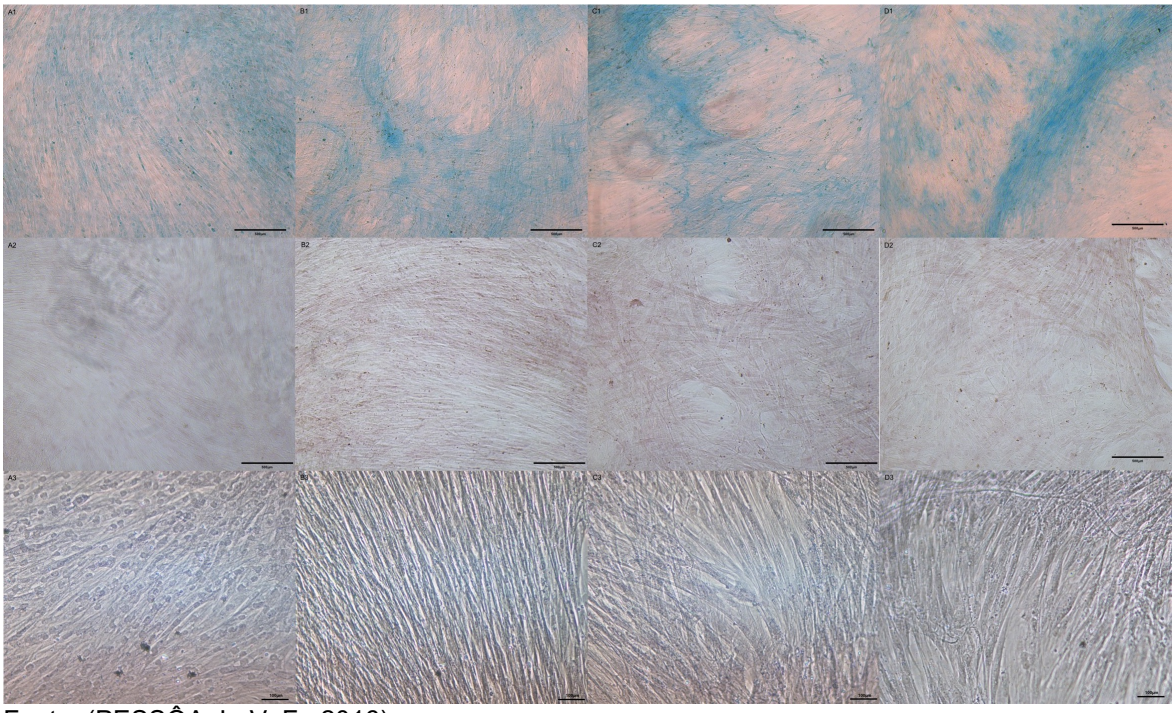
A caracterização das células mesenquimais de tecido adiposo, de cordão umbilical, medula óssea e fibroblastos, através do kit comercial StemPro (Gibco) foi bem-sucedida. Foi possível observar alterações morfológicas nas células diferenciadas por condrogênese, osteogênese e adipogênese quando comparadas aos controles (Figuras 2 e 3).

Figura 2 - Imagens mostrando células equinas de diferentes fontes após processo de diferenciação



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Tipos celulares estudados após o processo de diferenciação induzida *in vitro*. Células mesenquimais de tecido adiposo (A), medula óssea (B), cordão umbilical (C) e fibroblastos equinos (D) fixadas após processo de diferenciação condrogênica (1), osteogênica (2), com aumento de 100x e adipogênica (3), com aumento de 200x, coradas com *alcian blue, alizarin red* e *sudan black*, respectivamente.

Figura 3 - Imagens mostrando células do grupo controle do experimento de diferenciação



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Grupos controle da diferenciação condrogênica (1), osteogênica (2), com aumento de 100x e adipogênica (3), com aumento de 200x, fixadas e coradas com *alcian blue*, *alizarin red* e *sudan black*, respectivamente onde (A) células mesenquimais de tecido adiposo, (B) células mesenquimais de medula óssea e (C) células mesenquimais de cordão umbilical e (D) fibroblastos equinos.

2.4.2.2 Imunofenotipagem

A porcentagem de marcação de cada anticorpo em cada tipo celular foi aferida por citometria de fluxo. É possível notar que todas as linhagens analisadas apresentam baixa expressão dos marcadores CD86 e MHCII e alta expressão dos marcadores CD44 e MHCI. Os valores encontrados, listados na tabela abaixo (Tabela 1), condizem com o encontrado na literatura (CARRADE et al., 2012; BARBERINI et al., 2014; DE SCHAUWER et al., 2014), não havendo diferenças estatísticas quando comparamos a expressão de cada marcador entre as quatro linhagens.

Tabela 1 - Porcentagem média de expressão de cada anticorpo em cada tipo celular após análise por citometria de fluxo

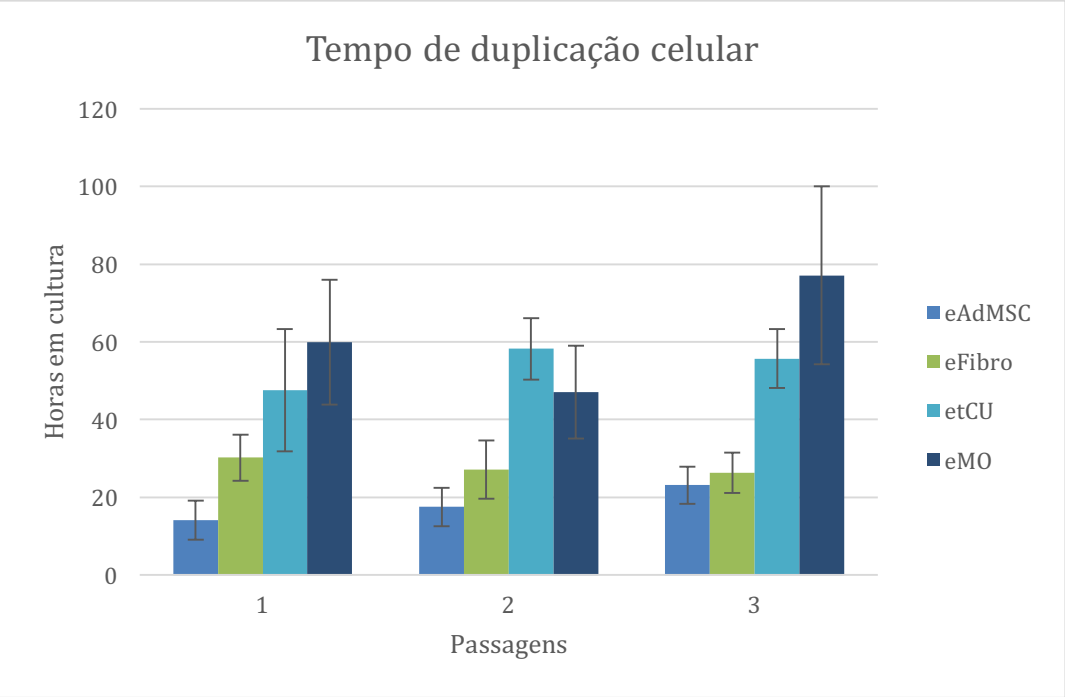
	eAdMSC	etCU	eMO	eFibro
CD44	92,5±11,9	93,4±5,1	86±15,1	89,7±7,5
CD86	1,8±1,3	1,2±0,7	6,4±5,1	0,6±0,1
MHC I	84±7,5	81,2±17,8	61±4,5	94,13±7,52
MHC II	3±0,5	5,4±1,9	13,2±10	5,7±1,6

Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Porcentagens de expressão de cada marcador de superfície para cada tipo celular equino após análise por citometria de fluxo. É possível notar que os fibroblastos equinos apresentam o mesmo perfil imunofenotípico que os demais tipos celulares, não havendo diferenças estatísticas entre as linhagens, para cada marcador.

2.4.2.3 Tempo de duplicação celular

O tempo (horas) de proliferação das células foi calculado para cada tipo celular, conforme descrito anteriormente. Os resultados obtidos mostram que as células de medula óssea apresentam tempo de duplicação mais longo (eMO 61,3±15) seguidas pelas células derivadas de tecido de cordão umbilical (etCU 53,8±5), fibroblastos (eFibro 27±2) e tecido adiposo (eAdMSC 18,2±4,5), conforme mostra a figura a baixo (Figura 4), não houveram diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens em cada uma das passagens, provavelmente devido a grande variação entre as replicatas experimentais.

Figura 4 - Gráfico mostrando o tempo de duplicação celular das várias linhagens equinas estudadas neste projeto



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Gráfico mostrando o tempo de duplicação celular das várias linhagens equinas estudadas neste trabalho. Células derivadas de sangue de cordão umbilical (A), células de medula óssea (B), células de tecido de cordão umbilical (C), fibroblastos derivados de equino adulto (D), células de tecido adiposo umbilical (E) não havendo diferenças estatísticas entre as linhagens em cada passagem.

2.4.3 Discussão

Apesar da tentativa de padronização da caracterização das células mesenquimais equinas feita por De Schauwer et al. (2011), o baixo número de anticorpos específicos para equinos (De MATTOS et al., 2009; LOMBANA et al., 2015) implica em grande dificuldade para a caracterização imunofenotípica das mesmas. Portanto, as células mesenquimais estudadas neste projeto foram analisadas conforme o descrito na literatura (CARRADE et al., 2012; BARBERINI et al., 2014; De SCHAUWER et al., 2014), levando em conta os anticorpos específicos para equinos disponíveis no mercado.

Células mesenquimais de variadas espécies, incluindo equinos, sabidamente apresentam expressão de CD44, um receptor de hialuronato que atua na ativação dos linfócitos T e MHCI (CARRADE et al., 2011; DE SCHAUWER et al.,

2011) e não apresentam expressão de MHCII e outras moléculas que co-estimulam linfócitos T, como CD86 (CARRADE et al., 2011), porém há relatos recentes na literatura de células mesenquimais de medula óssea equinas que apresentam variáveis níveis de expressão de MHCII (SCHNABEL et al., 2014).

As células de tecido adiposo, cordão umbilical, medula óssea e fibroblastos analisadas por nosso grupo apresentaram característica de adesão quando em cultivo, morfologia fusiforme e, perante estímulo, foram capazes de se diferenciar *in vitro* em linhagens condrogênicas, osteogênicas e adipogênicas (Figura 2). As linhagens também apresentaram marcação positiva para expressão de CD44 e MHCI, e baixa expressão dos marcadores CD86 e MHCII (Tabela1), como descrito previamente (CARRADE et al., 2011; DE SCHAUWER et al., 2011; BARBERINE et al., 2014; DE SCHAUWER et al., 2014) não havendo diferença estatística quando comparamos a expressão de cada marcador entre as linhagens.

De Schauwer et al. (2014), analisaram imunofenotipicamente células mesenquimais equinas de fontes não invasivas, encontrando taxas médias de expressão de CD44: 97,3%; MHCI: 77,6% e MHCII: 0,8% para células de matriz cordão umbilical. Já Carrade et al. (2012) citam os valores médios de CD44: 94,8% e MHCI: 69,69% e relatam ausência de expressão de MHCII e CD86 em células mesenquimais de tecido adiposo, medula óssea, sangue e tecido de cordão umbilical. Barberini et al. analisaram, entre outros marcadores, a expressão de CD44 e MHCII em células mesenquimais de tecido adiposo (CD44: 92,4%; MHCII: 3,8%), medula óssea (CD44: 96,2; MHCII: 6,8) e cordão umbilical (CD44: 95,7%; MHCII: 5,9%).

Contudo, pode-se notar que os fibroblastos analisados neste estudo apresentaram um perfil imunofenotípico e capacidade de diferenciação semelhantes aos das células mesenquimais, o que está de acordo com Denu et al. (2016), que mostraram que em humanos, fibroblastos não só possuem o mesmo perfil imunofenotípico que células mesenquimais, como também apresentam perante estímulo, potencial de diferenciação *in vitro* em linhagens condrogênicas, osteogênicas e adipogênica. Este é um indício de que os métodos de caracterização amplamente utilizados atualmente não são específicos para células “tronco” mesenquimais e da multipotencialidade dos fibroblastos equinos.

Em mamíferos, assim como em outros organismos multicelulares, três classes proteicas extracelulares são responsáveis por controlar o tamanho, a divisão

e a morte celular sendo elas: mitógenos, fatores de crescimento e fatores de sobrevivência. Os mitógenos são responsáveis por atenuar controles negativos intracelulares que impedem a progressão no ciclo celular, de maneira a estimular a divisão das células. Os fatores de crescimento promovem a síntese de variadas macromoléculas ao mesmo tempo que impedem sua degradação, causando um crescimento celular. Já os fatores de sobrevivência reprimem a apoptose aumentando a sobrevivência e, consequentemente, o número de células (ALBERTS et al., 2002). A velocidade em que isso acontece é chamada de taxa de proliferação celular.

Em adição a esses fatores, já foi comprovado que sucessivas passagens *in vitro*, assim como a idade do doador afetam a negativamente a taxa de proliferação e a capacidade de diferenciação de células derivadas de medula óssea em murinos (KRETLOW et al., 2008) e humanos (ZAIM et al., 2011) e em células de tecido adiposo humano (CHOUDHERY et al., 2014). A determinação da taxa de proliferação celular é importante para os experimentos seguintes neste trabalho, uma vez que existem indícios de que ela pode afetar a capacidade de reprogramação celular (RUIZ et al., 2011).

Existem variações nas taxas de proliferação celular entre tipos celulares e espécies diferentes. Aliborzi et al. (2016), compararam células mesenquimais de tecido adiposo e de medula óssea de porcos da índia e identificaram que as células de tecido adiposo apresentavam menor taxa de proliferação. Já em humanos, Jin et al. (2013) comparou células derivadas de sangue de cordão umbilical, medula óssea e tecido adiposo e relataram que as células de sangue de cordão umbilical apresentam menor taxa de proliferação quando comparada as demais, enquanto Al-Nbaheen et al. (2013) compararam células humanas derivadas de tecido adiposo adulto e pele adulta e de recém-nascidos e encontraram maior taxa de proliferação nas células derivadas de tecido mais jovem. Heidari et al. (2013) compararam células mesenquimais fetais derivadas de fígado, medula óssea e tecido adiposo de ovinos e notaram que as células derivadas de fígado apresentavam maior taxa de proliferação, seguidas por células de medula óssea e por último, células de tecido adiposo.

Em equinos, as taxas de proliferação de células derivadas de sangue periférico, sangue e tecido de cordão umbilical foram comparadas, porém, apesar das alterações entre passagens, os valores não apresentaram diferenças

significativas (DE SCHAUWER et al., 2014). Entre as células analisadas neste estudo, não houveram diferenças estatisticamente significativas entre as linhagens (Figura 4), em cada uma das passagens, provavelmente devido a grande variação entre as replicatas experimentais. Entretanto, é possível notar que as células de medula óssea apresentaram menores taxas de proliferação, quando comparada as demais. Já foram relatadas diferenças entre a taxa de proliferação e capacidade de diferenciação de células mesenquimais de medula óssea isoladas de grupos de equinos do mesmo gênero e idade, indicando um possível efeito de indivíduo ou raça (CARTER-ARNOLD et al., 2014). Em nosso trabalho, é possível que essas diferenças estejam relacionadas as idades e raças dos doadores, uma vez que as células mesenquimais de tecido adiposo, de cordão umbilical e fibroblastos foram coletados de animais jovens da raça bretã, enquanto as idades e raças dos doadores de medula óssea são desconhecidas.

2.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Analisando os resultados obtidos, podemos concluir que foi possível isolar células equinas derivadas de tecido adiposo, tecido de cordão umbilical, medula óssea e fibroblastos utilizando os métodos propostos.

Após o processo de caracterização por diferenciação e imunofenotipagem, podemos concluir que, como o esperado e corroborando com a literatura, (CARRADE et al., 2011; DE SCHAUWER et al., 2011; BARBERINE et al., 2014; DE SCHAUWER et al., 2014, DENU et al., 2016), todas as linhagens estudadas apresentam potencial de diferenciação osteogênica, condrogênica e adipogênica e apresentam perfil imunofenotípico semelhante, expressando CD44 e MHCI e apresentando baixa expressão de CD86 e MHCII.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. p. 712.

ALIBORZI, G.; VAHDATI, A.; MEHRABANI, D.; HOSSEINI, S. E.; TAMADON, A. Isolation, characterization and growth Kinetic comparison of bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells of guinea pig. **International Journal of Stem Cells**, v. 30, n. 9, p.115-123, May. 2016.

AL-NBAHEEN, M.; VISHNUBALAJI, R.; ALI, D.; BOUSLIMI, A., AL-JASSIR, F.; MEGGES, M.; PRIGIONE, A.; ADJAYE, J.; KASSEM, M.; ALDAHMASH, A. Human stromal (mesenchymal) stem cells from bone marrow, adipose tissue and skin exhibit differences in molecular phenotype and differentiation potential. **Stem Cell Reviews,** v. 9 n. 1, p. 32-43, Feb. 2013.

BARBERINI, D. J.; FREITAS, N. P.; MAGNONI, M. S.; MAIA, L.; LISTONI, A. J.; HECKLER, M. C.; SUDANO, M. J.; GOLIM, M. A.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F.; AMORIM, R. M. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. **Stem Cell Research Therapy**, v. 21, n. 1, p. 25, Feb. 2014.

BRETON, A.; SHARMA, R.; DIAZ, A. C.; PARHAM, A. G.; GRAHAM, A.; NEIL, C.; WHITELAW, C. B.; MILNE, E.; DONADEU, F. X. Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. **Stem Cells and Development,** v. 22, n. 4, p. 611-621, Feb. 2013.

CARRADE, D. D.; OWENS, S. D.; GALUPPO, L. D.; VIDAL, M. A.; FERRARO, G. L.; LIBRACH, F.; BUERCHLER, S.; FRIEDMAN, M. S.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. **Cytotherapy**, v. 13, n. 4, p. 419-430, Apr. 2011.

CARRADE, D. D.; LAME, M. W.; KENT, M. S.; CLARK, K. C.; WALKER, N. J.; BORJESSON, D. L. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. **Cell Medicine**, v. 4, n. 1, p 1-11, 2012.

CARTER-ARNOLD, J. L.; NEILSEN, N. L.; AMELSE, L. L.; ODOI, A.; DHAR, M. S. In vitro analysis of equine, bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates diferences within age- and gender-matched horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 46, n. 5, p. 589-595, Sep. 2014.

CHOUDHERY, M. S.; BADOWSKI, M.; MUISE, A.; PIERCE, J.; HARRIS, D. T. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. **Journal of Translational Medicine,** v. 7, n. 12, p. 1-8, Jan. 2014.

DE MATTOS CARVALHO, M.; ALVES, A. L. G.; GOLIM, M. A.; MOROZ, A.; HUSSNI, C. A.; DE OLIVEIRA, P. G.; DEFFUNE, E. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. **Veterinary Immunology and Immunopathology,** v. 132, n. 1-2, p. 303–6, 2009

DENU, R. A.; NEMCEK, S.; BLOOM, D. D.; GOODRICH, A. D.; KIM, J.; MOSHER, D. F.; HEMATTI, P. Fibroblasts and Mesenchymal Stromal/Stem Cells Are Phenotypically Indistinguishable. **Acta Haematologica,** v. 136, n. 2, p. 85-97, 2016.

DE SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G. R.; VAN SOOM, A. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. **Theriogenology,** v. 75, n. 8, p. 1431-43, May. 2011.

DE SCHAUWER, C.; GOOSSENS, K.; PIEPERS, S.; HOOGEWIJS, M. K.; GOVAERE, J. L.; SMITS, K.; MEYER, E.; VAN SOOM, A.; VAN DE WALLE, G. R. Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. **Stem Cell Research Therapy**, v. 5, n. 1, p. 6, 2014.

DE VITA, B.; CAMPOS, L. L.; LISTONI, A. J.; MAIA, L.; FREITAS, N. P. P.; ALVARENGA, F.; PRESTES, N. C. Anexos fetais: uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária equina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 008-022, 2012.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature,** v. 292, p. 154-156, 1981.

FORTIER, L. A. Stem cells: classifications, controversies, and clinical applications**.** **Vet Surgery,** v. 34, n. 5, p. 415-23, Sep-Oct. 2005.

FORTIER, L. A.; TRAVIS, A. J. Stem cells in veterinary medicine. **Stem Cell Research Therapy,** v. 2, n. 1, p. 9, Feb. 2011.

GRUBER, H. E.; SOMAYAJI, S.; RILEY, F.; HOELSCHER, G. L.; NORTON, H. J.; INGRAM, J.; HANLEY JR., E.N. Human adipose-derived mesenchymal stem cells:

serial passaging, doubling time and cell senescence. **Biotechnic & Histochemistry,** v. 87, n. 4, p. 303-311, May. 2012.

HACKETT, C. H.; GREVE, L.; NOVAKOFSKI, K. D.; FORTIER, L. A. Comparison of gene-specific DNA methylation patterns in equine induced pluripotent stem cell lines with cells derived from equine adult and fetal tissues. **Stem Cells and Development,** v. 21, n. 10, p. 1803-1811, Jul. 2012.

HEIDARI, B.; SHIRAZI, A.; AKHONDI, M. M.; HASSANPOUR, H.; BEHZADI, B.; NADERI, M. M.; SARVARI, A.; BORJIAN, S. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of sheep mesenchymal stem cells derived from bone marrow, liver, and adipose tissue. **Avicenna J Med Biotechnol**, v. 5, n. 2, p. 104-17, Apr. 2013.

HERTHEL, D. J. Suspensory desmitis therapies.In: ACVS SYMPOSIUM, 12., 2002, San Diego. **Proceedings** of **12th ACVS Symposium**, San Diego, 2002. p.165-167.

JIN, H. J.; BAE, Y. K.; KIM, M.; KWON, S. J.; JEON, H. B.; CHOI, S. J.; KIM, S. W.; YANG, Y. S.; OH, W.; CHANG, J. W. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood as sources of cell therapy. **International Journal of Molecular Science,** v. 14, n. 9, p. 17986-8001, Sep. 2013.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells,** v. 24, n. 5, p. 1294-301, May. 2006.

KHODADADI, K.; SUMER, H.; PASHAIASL, M.; LIM, S.; WILLIAMSON, M.; VERMA, P.J. Induction of pluripotency in adult equine fibroblasts without c-MYC. **Stem Cells,** v. 2012, p. 429160, Mar. 2012.

KIM, K.; DOI, A.; WEN, B.; NG, K.; ZHAO, R.; CAHAN, P.; KIM, J.; ARYEE, M. J.; JI, H.; EHRLICH, L. I.; YABUUCHI, A.; TAKEUCHI, A.; CUNNIFF, K. C.; HONGGUANG, H.; MCKINNEY-FREEMAN, S.; NAVEIRAS, O.; YOON, T. J.; IRIZARRY, R. A.; J UNG, N.; SEITA, J.; HANNA, J.; MURAKAMI, P.; JAENISCH, R.; WEISSLEDER, R.; ORKIN, S. H.; WEISSMAN, I. L.; FEINBERG, A. P.; DALEY, G. Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature,** v. 467, n. 7313, p. 285-90, Sep. 2010.

KRETLOW, J. D.; JIN, Y. Q.; LIU, W.; ZHANG, W. J.; HONG, T. H.; ZHOU, G.; BAGGETT, L. S.; MIKOS, A. G.; CAO, Y. Donor age and cell passage affects

differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. **BMC Cell Biology**, v. 9, p. 60, 2008

LI, X.; ZHOU, S. G.; IMREH, M. P.; AHRLUND-RICHTER, L.; ALLEN, W. R. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. **Stem Cells and Development**, v. 15, p. 523–31, 2006.

LOMBANA, K. G.; GOODRICH, L. R.; PHILLIPS, J. N.; KISIDAY, J. D.; RUPLE-CZERNIAK, A.; MCILWRAITH, C. W. An Investigation of equine mesenchymal stem cell characteristics from different harvest sites: more similar than not. **Frontiers in Veterinary Science,** v. 7, p. 2:67, Dec. 2015.

MAIA, L.; DE VITA, B.; MORAES, C. N.; DESTRO, F. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; AMORIM, R. M. Considerações sobre a obtenção, processamento, caracterização e aplicação terapêutica das células-tronco mesenquimais em medicina equina. **Veterinária e Zootecnia,** v. 20 p. 359-373, 2013.

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

OHGANE, J; YAGI, S; SHIOTA, K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. **Placenta,** p. S29-35, Mar. 2008. Supplement.

PACINI, S.; SPINABELLA, S.; TROMBI, L.; FAZZI, R.; GALIMBERTI, S.; DINI, F.; CARLUCCI, F.; PETRINI, M. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. **Tissue Engineering**, v. 13, n. 12, p. 2949-55, Dec. 2007.

PARIS, D. B.; STOUT, T. A. Equine embryos and embryonic stem cells: defining reliable markers of pluripotency. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 516-24,Sep. 2010.

ROSSANT, J. Stem cells from the mammalian blastocyst. **Stem Cells,** v. 19, n. 6, p. 477-82.

RUIZ, S.; PANOPOULOS, A. D.; HERRERÍAS, A.; BISSIG, K. D.; LUTZ, M.; BERGGREN, W. T.; VERMA, I. M.; IZPISUA BELMONTE, J. C. A high proliferation rate is required for cell reprogramming and maintenance of human embryonic stem cell identity. **Current Biology,** v. 21, n. 1, p. 45-52, Jan. 2011.

SAITO, S.; UGAI, H.; SAWAI, K.; YAMAMOTO, Y.; MINAMIHASHI, A.; KUROSAKA, K.; KOBAYASHI, Y.; MURATA, T.; OBATA, Y.; YOKOYAMA, K. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. **FEBS Letters,** v. 531, n. 3, p. 389-96, Nov. 2002.

SCHNABEL, L. V.; PEZZANITE, L. M.; ANTCZAK, D. F.; FELIPPE, M. J.; FORTIER, L. A. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 5, n. 1, p. 13, Jan. 2014.

SHARMA, R.; LIVESEY, M. R.; WYLLIE, D. J.; PROUDFOOT, C.; WHITELAW, C. B.; HAY, D. C.; DONADEU, F. X. Generation of functional neurons from feeder-free, keratinocyte-derived equine induced pluripotent stem cells. **Stem Cells and Development,** v. 23, n. 13, p. 1524-1534, Jul. 2014.

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.

TOUPADAKIS, C. A.; WONG, A.; GENETOS, D. C.; CHEUNG, W. K.; BORJESSON, D. L.; FERRARO, G. L.; GALUPPO, L. D.; LEACH, J. K.; OWENS, S. D.; YELLOWLEY, C. E. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. **American Journal Veterinary Research,** v. 71, n. 10, p. 1237–1245, 2010.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science,** v. 282, n.5391, p. 1145-7, Nov. 1998. Erratum in: **Science** v. 282, n. 5395, p. 1827, Dec. 1998.

ZAIM, M.; KARAMAN, S.; CETIN, G.; ISIK, S. Donor age and long-term culture affect differentiation and proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells. **Annals Hematology**. v. 91, n. 8, p. 1175-1186, Aug. 2012.

3 CAPÍTULO III: INDUÇÃO À PLURIPOTÊNCIA EM CÉLULAS ADULTAS E DE CORDÃO UMBILICAL DE EQUINOS ATRAVÉS DA INDUÇÃO GÊNICA.

3.1 INTRODUÇÃO

As células pluripotentes induzidas, desenvolvidas em 2006 (TAKAHASHI; YAMANAKA 2006) despertam grande interesse a terapia celular. Porém, sua utilização na clínica humana ainda é considerada arriscada, o que realça a importância dos modelos animais, principalmente os com grandes mamíferos. É por essas razões que cada vez mais grupos de pesquisa buscam estudar a fundo e desenvolver novas técnicas que aprimorem a produção das iPS para as mais variadas espécies animais.

Considerando os indicativos de que as células mesenquimais apresentam potencial terapêutico limitado e, nos equinos, focado para lesões musculo esqueléticas, o interesse por células iPS equinas é intenso e as mesmas já foram produzidas por variados grupos de pesquisa, a partir de fibroblastos derivados de animais de diferentes idades, de queratinócitos e células mesenquimais de tecido adiposo e utilizado combinações dos fatores de reprogramação humanos ou murinos, gerando células dependentes de LIF (l*eukemia inhibitory fator*) e bFGF (*basic fibroblast growth factor*) ou apenas LIF (NAGY et al., 2011; KHODADADI et al., 2012; BRETON et al., 2013; SHARMA et al., 2014; WHITWORTH et al., 2014; LEE et al., 2016 no prelo)[3].

Levando em conta os indícios da presença de uma memória epigenética residual em células iPS (KIM et al., 2010), nesta etapa objetivou-se a produção das mesmas a partir das variadas linhagens celulares obtidas anteriormente, através da introdução dos fatores OSKM humanos e murinos e a caracterização das células iPS geradas quanto à pluripotência celular.

---

[3] LEE, E. M.; KIM, A.Y.; LEE, E. J.; PARK, J. K.; PARK, S. I.; CHO, S. G.; KIM, H. K.; KIM, S. Y.; JEONG, K. S. Generation of equine induced pluripotent stem cells and analysis of their therapeutic potential for muscle injuries. **Cell Transplantation**, 2016. (no prelo)

3.2 REVISÃO DE LITERATURA

3.2.1 Reprogramação Nuclear

Quando bem-sucedido, o processo de desenvolvimento embrionário dos mamíferos leva ao comprometimento e diferenciação celulares, notados através da formação dos diferentes tecidos em um organismo. A primeira diferenciação celular morfológica gera duas linhagens celulares: o trofoblasto e a massa celular interna. O primeiro dá origem aos tecidos extra-embrionários, enquanto a segunda, considerada pluripotente, apresenta-se capaz de se diferenciar nos três folhetos germinativos embrionários: a endoderme, a mesoderme e a ectoderme, que por sua vez darão origem a centenas tipos celulares (fetais e/ou adultos) durante todo o desenvolvimento (ROSSANT, 2001; NAFEE et al., 2008; OHGANE; YAGI; SHIOTA; 2008).

Os fatores OCT4 e o NANOG inauguraram a lista dos fatores de transcrição necessários para o desenvolvimento embrionário e para a manutenção da pluripotência de células-tronco (NICHOLS et al., 1998; MITSUI et al., 2003). Mais tarde, o fator de transcrição SOX2 também foi identificado como participante do processo de regulação de genes em células pluripotentes (BOYER et al., 2005). Hoje sabemos que fatores como OCT4, SOX2 e NANOG são considerados de extrema importância para a manutenção da pluripotência em embriões e células-tronco (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), porém não estão sozinhos na regulação das vias gênicas de aquisição e manutenção da pluripotência (IVANOVA et al., 2006; LOH et al., 2006).

Todo o procedimento de diferenciação celular quer seja ele “natural” ou “induzido” sofrerá processos moleculares chamados de modificações epigenéticas, que controlam genes específicos de fatores de transcrição (MANN; BARTOLOMEI, 2002; BEISEL; PARO, 2009). Alguns destes genes possuem padrões de expressão associados ao desenvolvimento embrionário e à manutenção da pluripotência, tais como OCT4, SOX2 e NANOG (NICHOLS et al., 1998; MITSUI et al., 2003; BOYER et al., 2005). Se tratando particularmente de células-tronco, um grande número de pesquisadores tem se dedicado a identificar este mecanismo de manutenção e até

mesmo de indução de pluripotência celular, desta forma, grupos de pesquisa (TAKAHASHI; YAMANAKA 2006; MAHEALI et al., 2007; OKITA et al., 2007; WERNIG et al., 2007) mostraram que fatores transcrição específicos (*c-Myc, Klf4, Oct4* e *Sox2*) conseguem alterar o perfil transcricional e favorecer a indução e manutenção de pluripotência.

A maneira pela qual estes fatores trabalham em conjunto ainda precisa de maiores esclarecimentos. Aparentemente, eles interagem com fatores de remodelação da cromatina e enzimas modificadoras de histonas para a modulação da conformação da cromatina, o que teria por consequência a modulação também da expressão gênica (CHEN; DALEY, 2008).

3.2.2 Aquisição da pluripotência

Em 2006 os pesquisadores Takahashi e Yamanaka, da Universidade de Kyoto, realizaram uma grande descoberta para o campo da terapia celular, mostrando ao meio científico pela primeira vez um processo de reprogramação celular induzido (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006), algo que até então, se dava apenas por fatores oocitários, mediante técnicas de transferência nuclear (MUNSIE et al., 2000; YANG et al., 2007; HAN; YOON, 2011). Baseados no fato que células somáticas poderiam ser reprogramadas através das técnicas de transferência nuclear para oócitos e fusão de células embrionárias com somáticas, eles presumiram que havia fatores que apresentavam papel importante na manutenção da identidade das células embrionárias *(Oct4*, *Sox2, Klf4 e c-Myc:* OSKM) também seriam de igual importância para a indução de células somáticas à pluripotência. Essa hipótese os guiou ao desenvolvimento das células denominadas células-tronco induzidas (*induced pluripotent stem cell*, iPS) murinas (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Esta descoberta foi ainda mais celebrada quando em 2007, o mesmo grupo demonstrou que a técnica também poderia ser replicada em fibroblastos humanos (TAKAHASHI et al., 2007), o gerou um aumento expressivo em pesquisas voltadas para terapia celular.

Primeiramente, as iPS foram produzidas por mediação retroviral tendo os quatro fatores OSKM inseridos diretamente no genoma celular. Desde então

diversos grupos desenvolveram células iPS em diferentes espécies como camundongo (NAKAGAWA et al., 2008); humano (TAKAHASHI et al., 2007; NAKAGAWA et al., 2008); rato (CHANG et al., 2010); suíno (ESTEBAN et al., 2009), macaco (LIU et al., 2008; WU et al., 2010), ovinos (BAO et al., 2011; LIU et al., 2012), bovinos (BRESSAN et al., 2013; MALAVER-ORTEGA et al., 2015), frango (YU et al., 2014), cães (KOH; PIEDRAHITA, 2015), caprinos (TAI et al., 2015) e equinos (NAGY et al., 2011; KHODADADI et al., 2012; BRETON et al., 2013; SHARMA et al., 2014; WHITWORTH et al., 2014; LEE et al., 2016 no prelo)[4], entre outros.

As células iPS e células-tronco embrionárias partilham diversos aspectos, como morfologia, padrão de expressão gênica, estado epigenético e capacidade de diferenciação *in vitro* e *in vivo*. Nos camundongos foram capazes de desenvolver quimeras adultas e apresentaram competência de transmissão germinativa (MAHERALI et al., 2007; OKITA et al., 2007; WERNIG et al., 2007). No entanto, foi observado a formação frequente de tumores tanto em quimeras como em progênies derivadas de células iPS, estando relacionadas com uma possível reativação do oncogene *c-Myc* (OKITA et al., 2007). Com o objetivo de excluir este fator negativo, Nakagawa et al. (2008) e Wernig et al. (2008), conseguiram então gerar células iPS sem a inserção do fator *c-Myc* porém com baixa eficiência. Atualmente, foi realizada a indução da pluripotência em células humanas e de camundongos sem a integração de transgenes (OSKM) no genoma, através da transfecção contínua utilizando plasmídeos fechados ou epissomais (OKITA et al., 2008; YU et al., 2009). No entanto os protocolos atuais ainda apresentam evidências de que anomalias genéticas e epigenéticas ocorrem aleatoriamente durante o processo de indução da pluripotência (ZHAO et al., 2010; LAURENT et al., 2011), causando eventos que podem afetar futuramente as funções da célula quando diferenciada.

Desta forma, a produção destas células ainda precisa ser melhor fundamentada para que a aplicação prática de células induzidas à indiferenciação pela modificação genética possa ser praticada com segurança (YAMANAKA et al., 2007; LIU, 2008).

---

[4] LEE, E. M.; KIM, A.Y.; LEE, E. J.; PARK, J. K.; PARK, S. I.; CHO, S. G.; KIM, H. K.; KIM, S. Y.; JEONG, K. S. Generation of equine induced pluripotent stem cells and analysis of their therapeutic potential for muscle injuries. **Cell Transplantation**, 2016. (no prelo)

3.2.3 iPS equinas

Células iPS equinas já foram obtidas por alguns grupos de pesquisa. Entre eles podemos citar Nagy et al. (2011), que obtiveram sucesso na produção de iPS dependentes de bFGF e LIF com um sistema de PiggyBac-transposon associado à tetraciclina, em fibroblastos fetais usando os fatores de reprogramação OCT4, KLF4, SOX2 e C-MYC murinos.

Células iPS equinas dependentes de bFGF e LIF também foram obtidas a partir introdução de vetores virais contendo os fatores OSKM murinos em fibroblastos de potros usando o sistema MMLV (*Moloney murine leukemia vírus*; BRETON et al., 2012). Já Khodadadi et al. (2012) obtiveram células iPS equinas dependentes de bFGF, LIF e EGF (*epidermal growth fator*) através da transdução retroviral usando o sistema MMLV dos fatores Oct4, Klf4 e Sox2 humanos em fibroblastos adultos. Sharma et al. (2014), por sua vez, obteve células eiPS dependentes unicamente de LIF, através da introdução dos fatores OSKM murinos em queratinócitos de potro de 5 meses, usando o sistema MMLV. Withworth et al. (2014) também produziu eiPS dependentes somente de LIF, usando um sistema de vetor lentiviral contendo os fatores OSKM humanos, a partir de fibroblastos adultos. Recentemente, Lee et al. (2016 no prelo)[5] gerou eiPS a partir de células mesenquimais de tecido adiposo de um equino jovem, dependentes de LIF, a partir de um vetor lentiviral induzível TetO contendo os fatores de reprogramação mOSKM. As linhagens de células eiPS citadas a cima mostraram-se positivas para fosfatase alcalina, expressão de OCT4 e NANOG, entre outros marcadores de pluripotência e todas apresentaram potencial de diferenciação em ectoderma, mesoderma e endoderma *in vitro* e *in vivo*, com exceção das células produzidas por Nagy et al. (2011), que não foram testadas *in vitro* e Withworth et al. (2014), que não foram testadas *in vivo*.

Nosso grupo obteve sucesso na produção de células iPS equinas dependentes somente de bFGF, por meio da introdução de fatores relacionados a pluripotência através de vetores lentivirais policistrônicos excisáveis STEMCCA

[5] LEE, E. M.; KIM, A.Y.; LEE, E. J.; PARK, J. K.; PARK, S. I.; CHO, S. G.; KIM, H. K.; KIM, S. Y.; JEONG, K. S. Generation of equine induced pluripotent stem cells and analysis of their therapeutic potential for muscle injuries. **Cell Transplantation**, 2016. (no prelo)

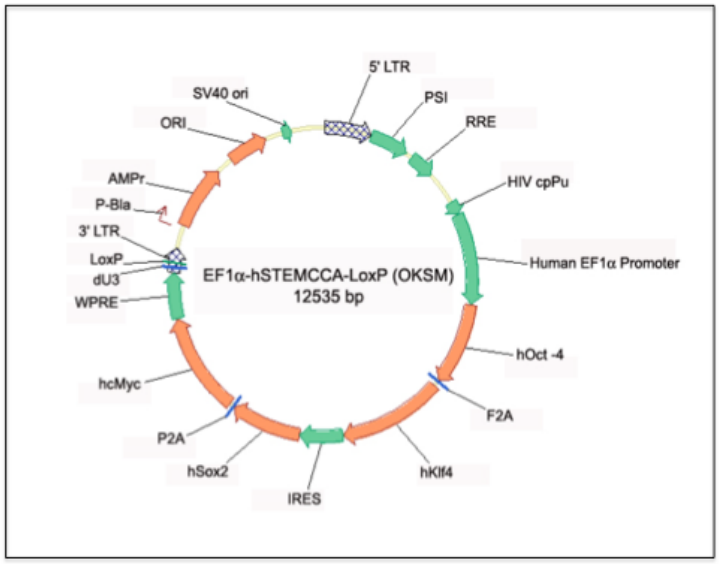
(Stem cell cassette) contendo o cDNA de OCT4, KLF4, SOX2 e c-MYC humanos em células mesenquimais derivadas de tecido adiposo, de tecido de cordão umbilical e fibroblastos de equinos adultos e com os fatores de reprogramação murinos, a partir de células mesenquimais de tecido adiposo. Como se pode notar, todos os dados envolvendo a produção de células iPS de equinos são recentes e ainda é necessário estudar tudo que estas células têm a oferecer, principalmente visando a terapia celular.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Produção e caracterização células iPS equinas através dos fatores de transcrição relacionados à pluripotência.

A produção de células iPS equinas foi realizada conforme protocolo previamente padronizado em nosso laboratório (BRESSAN, 2013). Para a produção viral, foi utilizada a lipofecção (Lipofectamina 3000, Life Technologies). Para isso, células 293FT foram plaqueadas em placas de cultivo de 100mm na concentração de 5 x 10^6 células, de modo que apresentassem 90% de confluência no momento da transfecção. Foram utilizados 12 µg dos vetores STEMCCA (Figura 5) e 1,2 µg de cada vetor auxiliar, com exceção do plasmídeo VSVG, sendo utilizados 2,4 µg.

Figura 5 - Mapa do vetor STEMCCA



Fonte: (BRESSAN, F. F., 2013)
Legenda: mapa do vetor STEMCCA, contendo os fatores de reprogramação humanos.

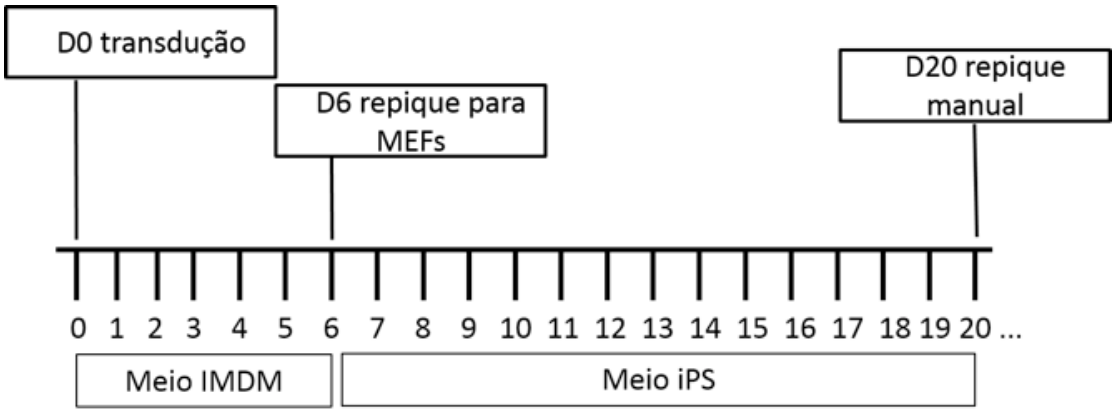
A lipofecção foi incubada *overnight* (de 12 a 16 horas) em contato com as células, quando houve troca de meio. Após 48 e 72h o meio coletado foi filtrado e utilizado na transdução.

As células equinas foram cultivadas (2 x 10^5 células por poço de placa de 6 poços) e transduzidas com o vetor STEMCCA contendo os fatores OSKM humanos (hOSKM) ou murinos (mOSKM) através de mecanismo lentiviral na presença de 8µg/ml polibreno (brometo de hexadimetrina, Sigma). Cinco a seis dias após a transdução, as células foram repicadas enzimaticamente com *Tryple Express* (Life technologies) e 2,5 x 10^4 células foram transferidas para poços de uma placa de 6 poços contendo uma monocamada de fibroblastos murinos fetais (MEFs) mitoticamente inativados (Mitomicina C- Sigma). O meio de cultivo de células-tronco pluripotentes induzidas é constituído de DMEM/F12 (Invitrogen) suplementado com 20% KO-Serum Replacement (Invitrogen), 2mM Glutamina (Invitrogen), 1% aminoácidos não essenciais (Invitrogen), 0.055mM beta-mercaptoetanol (Invitrogen), 10ng/mL bFGF (Sigma) e antibióticos. O meio é trocado a cada dois dias, as células foram avaliadas diariamente quanto a sua morfologia e o primeiro repique de cada colônia é feito manualmente e os demais com *Tryple Express* (Life technologies).

Cultivos celulares foram recuperados antes da reprogramação (no dia 0 ou D0, dia da transdução) e após reprogramação, após o repique das colônias para a 1ª passagem, para o acompanhamento da reprogramação induzida (Figura 6).

Foram realizadas quatro repetições da indução a pluripotência e a cada repetição foram realizadas contagens das estruturas presentes nas placas de cultivo e quando estas apresentavam-se com bordas regulares e com população celular morfologicamente homogênea, foram chamadas de colônias. Os períodos escolhidos foram os dias 15 e 20 depois da indução, períodos em que geralmente já existem colônias propriamente ditas e momento do primeiro repique, respectivamente.

Figura 6 - Esquema experimental da indução a pluripotência em função do tempo de cultivo



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Modelo esquemático experimental do processo de indução a pluripotência em células equinas.

3.3.2 Análise estatística

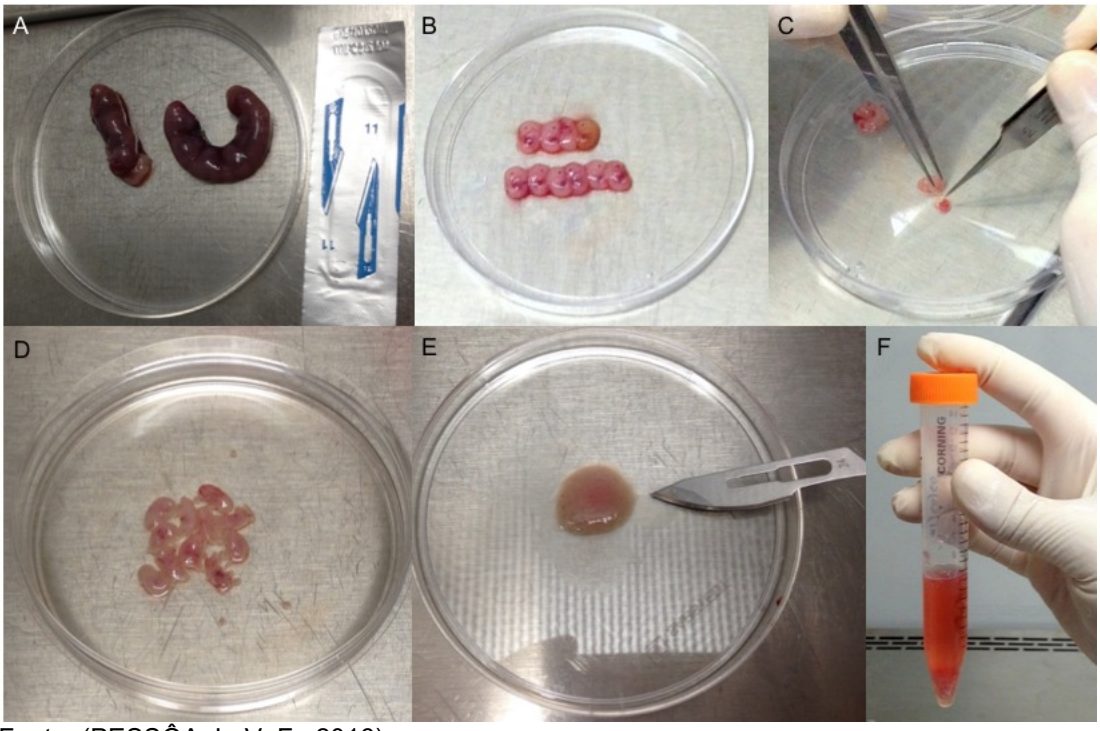
Para a análise de formação de colônias entre as diferentes linhagens, uma vez que todas as repetições partiram de um mesmo número de células transduzidas plaqueadas, foi feita a comparação entre a quantidade de colônias observadas após o período de reprogramação (p0). Foi aplicado o teste de análise de variância seguido por teste de Tukey adotando um critério com 5% de significância.

3.3.3 Produção de fibroblastos embrionários murinos (MEF) para utilização de monocamadas celulares de suporte

Camundongos B6/C57 (5 fêmeas e 2 machos) apresentando três a cinco meses de idade foram acasalados e a cópula confirmada pela observação da presença de tampão vaginal (plug). Aos 13,5 dias de gestação, as fêmeas foram eutanasiadas em câmara de CO2 e realizou-se a coleta dos úteros gravídicos que foram prontamente lavados em solução de PBS suplementado com antibióticos e antifúngico. A seguir, os fetos foram recuperados e suas cabeças, membros, órgãos torácicos e abdominais foram removidos (Figura 5); o tecido restante foi macerado e incubado por 3h a 38,5^{0}C com colagenase IV (0,040g/mL), centrifugado e o pellet ressuspendido em meio IMDM (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino, antibióticos e antifúngico. Aproximadamente 4 embriões foram cultivados por cada garrafa de cultivo de 75cm2 e, após 48h os cultivos foram congelados e estocados para uso posterior (Figura 7).

Para a produção de monocamadas de fibroblasto murino inativadas mitoticamente, garrafas de cultivo de 75cm2 apresentando aproximadamente 80% de confluência foram incubadas com mitomicina-C (10mg/mL, Sigma) por 3h. Após este período os cultivos foram digeridos enzimaticamente com *Tryple Express* (Life technologies) e semeados em placas de cultivo na concentração de 0,8 x 10^5 células por placa de 35mm (placa de 6 poços).

Figura 7 - Processo de isolamento de MEFs



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016).
Legenda: Coleta de embriões murinos com 13,5 dias de gestação. A: Úteros gravídicos contendo os embriões. B: embriões recuperados do útero e placenta. C: embriões sendo dissecados. D: Embriões após a retira da cabeça, membros e fígado. E: Grupo de 4 embriões macerados. F: embriões em digestão em colagenase.

3.3.4 Detecção de fosfatase alcalina, formação de corpos embrióides (CE) e diferenciação espontânea in vitro

A atividade da enzima fosfatase alcalina foi observada nas células eiPS derivadas de células eAdMSC (eiPS-eAdMSC), etCU (eiPS-etCU) e eFibro (eiPS-eFibro), através do kit de detecção de fosfatase alcalina (Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit, Sigma), segundo recomendações do fabricante. Células coradas em rosa avermelhado foram classificadas como positivas.

Para a formação de CE, as células foram enzimaticamente digeridas por 3 minutos e grumos foram cultivados em suspensão em placas cobertas por agarose 0,6% para evitar adesão à placa, em meio de células iPS sem bFGF. Os CEs foram cultivados por 72h, fotodocumentados. Os CEs formados foram dissociados mecanicamente e cultivados em IMDM na presença de 10% de SFB e 1% de

antibiótico para diferenciação espontânea *in vitro*, que foi avaliada por imunocitoquímica.

3.3.5 Caracterização das células eiPS por imunocitoquimíca

Para realização dos diferentes protocolos de imunocitoquímica, as células eiPS foram cultivadas em placas de 24 poços, com 1,6x 10^4 MEFs, em meio iPS padrão até que apresentassem colônias, momento em que foram fixadas com paraformaldeído (Synth) por 12 minutos e lavadas com PBS por 3 vezes.

3.3.5.1 OCT4

Para a marcação nuclear com OCT4 (Sc8628, Santa Cruz), cada poço foi lavado com PBS por 5 minutos. A seguir, as células foram permeabilizadas com solução de Tryton X-100 (Labome) 0,1%, por 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente foram lavadas novamente por 3 vezes e bloqueadas com solução BSA 1% adicionada de Tween 20 (Biocare medical) 0,1%, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Foram então marcadas com o anticorpo primário (diluição 1:100) *overnight.* Após 3 lavagens consecutivas com PBS, as células foram marcadas com o anticorpo secundário (*Anti-goat* Alex 488, A11078; diluição 1:300) por 1 hora, seguido de 3 lavagens consecutivas e marcação com hoechst (33342; diluição 1:1000) por 5 minutos, e última lavagem com PBS.

3.3.5.2 NANOG, TRA1-60 e TRA1-81

Para a marcação nuclear com NANOG (ab80892; diluição 1:200), e citoplasmática com TRA1-60 (MAB4360-Millipore; diluição 1:50) e TRA1-81 (MAB4381-Millipore; diluição 1:50), cada poço foi lavado com PBS por 5 minutos. A

seguir, as células foram bloqueadas com solução 5% de soro de cabra, por 30 minutos, a temperatura ambiente e foram marcadas com o anticorpo primário diluído em solução 3% soro de cabra, *overnight.* Após 3 lavagens consecutivas com PBS, as células foram marcadas com o anticorpo secundário: NANOG (*Anti-rabbit* igG Alex 488; diluição 1:500), Tra1-60 e Tra1-81 (*Anti-goat* IgM Alex 594; diluição 1:500) por 2 horas, seguido de 3 lavagens consecutivas e marcação com hoechst (33342; diluição 1:1000) por 5 minutos, e última lavagem com PBS.

3.3.5.3 SSEA1 e SSEA4

Para a marcação citoplasmática com SSEA1 (MAB4301-Millipore; diluição 1:110) e SSEA4 (MAB4304-Millipore; diluição 1:110) cada poço foi lavado com PBS por 5 minutos. A seguir, as células foram permeabilizadas com solução de Tryton 0,1%, por 10 minutos, a temperatura ambiente. Posteriormente foram lavadas novamente por 3 vezes e bloqueadas com solução BSA 1% adicionada de Tween 0,1%, por 30 minutos, a temperatura ambiente. Foram então marcadas com o anticorpo primário, *overnight* a 4°C. Após 3 lavagens consecutivas com PBS, as células foram marcadas com o anticorpo secundário (*Anti-goat* IgM Alex 594; diluição 1:500) por 2 horas, seguido de 3 lavagens consecutivas e marcação com hoechst (33342; diluição 1:1000) por 5 minutos, e última lavagem com PBS.

3.3.6 Diferenciação das células eiPS *in vitro*

As células tronco embrionárias apresentam características importantes, como a capacidade de autorrenovação por tempo indeterminado e de diferenciação em todas as linhagens de células somáticas (EVANS; KAUFMAN, 1981). As células iPS compatilham estes aspectos, e portanto, a habilidade de gerar células dos três folhetos embrionários é essencial para a caracterização das células tronco de pluripotência induzida. As células foram caracterizadas por diferenciação in vitro de

duas formas: após dissociação mecanica dos corpos embrioides gerados e com auxilio dos kits comerciais *StemXVivo Endoderm, Ectoderm e Mesoderm.*

3.3.6.1 Diferenciação das células eiPS com kit Ectoderm StemXVivo (R&D systems)

Para a realização desta etapa, foram utilizadas as células eiPS derivadas das linhagens eFibro, etCU e eAdMSC. Resumidamente, estas células foram plaqueadas na concentração de 1,1x 10^5 células /cm^2, em poços previamente cobertos com extrato de membrana basal Cultrex® (BME), em meio condicionado para MEF contendo FGF e cultivadas por 24h, a 37°C e 5% de CO_2, até que atingissem aproximadamente 50% de confluência. Neste momento o meio de cultivo foi trocado por meio de diferenciação ectodérmica e as células foram incubadas por 12 a 24 horas. A partir do segundo dia em cultivo para diferenciação, as trocas de meio foram diárias, por 4 dias. Após este período, as células estavam prontas para diferenciação em tipos celulares específicos ou para análise por citometria de fluxo e imunocitoquímica.

3.3.6.2 Diferenciação das células eiPS com kit Endoderm StemXVivo (R&D systems)

Para a realização desta etapa, foram utilizadas as células eiPS derivadas das linhagens eFibro, etCU e eAdMSC. Resumidamente, estas células foram plaqueadas na concentração de 3,3x 10^5 células /cm^2, em poços previamente cobertos com extrato de membrana basal Cultrex® (BME), em meio condicionado para MEF contendo FGF e cultivadas por 24h, a 37°C e 5% de CO_2, até que se apresentassem como uma monocamada de células fortemente justapostas. Neste momento o meio de cultivo foi reposto por meio condicionado para MEF contendo FGF fresco e incubado por 2 a 4 horas. Após este período, o meio foi removido, o poço foi lavado com PBS e adicionou-se o meio de diferenciação endodérmica I, que foi incubado por 12 a 16 horas. A seguir, o meio foi substituído por meio de

diferenciação endodérmica II, que foi substituído a cada 12 horas, por 4 dias. Após este período, as células estavam prontas para diferenciação em tipos celulares específicos ou para análise por citometria de fluxo e imunocitoquímica.

3.3.6.3 Diferenciação das células eiPS com kit Mesoderm StemXVivo (R&D systems)

Para a realização desta etapa, foram utilizadas as células eiPS derivadas das linhagens eFibro, etCU e eAdMSC. Resumidamente, estas células foram plaqueadas na concentração de 1,1x 10^5 células/cm^2, em poços previamente cobertos com extrato de membrana basal Cultrex® (BME), em meio condicionado para MEF contendo FGF e cultivadas por 24h, a 37°C e 5% de CO_2, até que atingissem aproximadamente 50% de confluência. Neste momento o meio de cultivo foi trocado por meio de diferenciação mesodérmica, e as células foram incubadas por 12 a 16 horas. O meio de cultivo foi reposto no segundo dia em cultivo e, após 12 a 20 horas, as células estavam prontas para diferenciação em tipos celulares específicos ou para análise por citometria de fluxo e imunocitoquímica.

3.3.7 Confirmação da reprogramação celular através da expressão gênica de transcritos relacionados à pluripotência

Para a análise de expressão gênica foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) das células antes e após a reprogramação celular (iPS). Para tal, as amostras de células coletadas tiveram seu RNA total isolado utilizando-se o kit RNAeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA), como descrito no item 3.3.8, e o cDNA sintetizado utilizando o kit High capacity RNA to cDNA Reverse Transcription seguindo instruções do fabricante (Applied Biosystems, EUA).

A reação de PCR foi desenvolvida utilizando o termociclador C1000 Touch™ Thermal Cycler (BIO-RAD, California, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 30 segundos, 45 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C por 60

segundos e 68°C por 30 segundos, e 68°C por 5 minutos. Foram utilizados oligos iniciadores para específicos para transcritos equinos dos genes NANOG, OCT4 e GAPDH (Tabela 2), desenhados para este experimento.

Tabela 2 - Relação de primers utilizados para análise de expressão gênica de genes associados a pluripotência

Alvo	Sequência	Tamanho do fragmento
eOCT4	FW TAGGGTTAGAGCTGCCCCCTC	199 pb
	Rev GTTTGTGTTGTCCCTCCCCCA	
eNANOG	Fw ACTGCTCATTCAGGACAGCC	200 pb
	Rev TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	
eGAPDH	Fw GTTTGTGATGGGCGTGAACC	205 pb
	Rev ATCGCGCCACATCTTCCC	

Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016).
Legenda: Relação de primers específicos para equinos, desenhados e utilizados para análise de expressão gênica de genes associados a pluripotência.

3.3.8 Análise do perfil de miRNAs das células eiPS de derivadas de diferentes tipos celulares

Para a análise de miRNA, as amostras de células mesenquimais de tecido de cordão umbilical, fibroblastos, eAdMSC foram coletadas em dois momentos: no D0 da indução a pluripotência (células não induzidas, ou controle da indução), a partir da 5ª passagem das colônias de eiPS (eiPS-etCU, eiPS-eAdMSC, eiPS-eFibro). Este delineamento (Figura 8) foi idealizado para analizarmos os miRNAs associados com a aquisição da pluripotência nestas células. O Apêndice A contém a tabela com os primers utilizados.

As amostras dos cultivos foram peletizadas, lavadas em PBS e congeladas em nitrogênio líquido seguido por armazenamento a -80^0 C. O RNA total das amostras foi extraído com o kit comercial miRNAeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo recomendações do fabricante, como descrito a seguir.

Adicionou-se 700µl de reagente de lise QIAzol à amostra, que foi homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos. A seguir, acrescentou-se 200µl de clorofórmio, agitou-se a amostra vigorosamente por aproximadamente 15 segundos, para então incubar a temperatura ambiente por 3

minutos e centrifugar por 15 minutos à 12000 x g e 4^0C. Com este processo, a amostra passa a apresentar-se segregada em fases. Foi realizada então a transferência da fase aquosa para um novo tubo, evitando coletar qualquer porção da interfase e foi adicionado etanol 100% na quantidade de 1,5 vezes o volume da amostra. Na sequência, 700µl de amostra foram pipetados por vez em uma mini coluna RNeasy®, acoplada a um tubo e centrifugados por ≥8000 x g, a temperatura ambiente, por 30 segundos, passo este que foi repetido até que o volume total da amostra seja centrifugado. A seguir, 700µl de buffer RTW foram adicionados a coluna, que foi centrifugada por ≥8000 x g, a temperatura ambiente, por 30 segundos, e o volume filtrado foi descartado. O processo foi repetido utilizando-se 500µl de buffer RPE por duas vezes. A primeira a centrifugação foi realizada a ≥8000 x g, a temperatura ambiente, por 30 segundos e a segunda por 2 minutos. Após este procedimento, a coluna foi transferida para um novo tubo e centrifugada por 1 minuto, à velocidade máxima, para secar a membrana. Por fim, adicionou-se 30µl de água livre de RNAse diretamente na membrana da coluna que foi centrifugada por ≥8000 x g, a temperatura ambiente, por 1 minuto, para eluir o RNA isolado. Após a extração, o RNA isolado foi analisado quanto à quantidade e qualidade (razão 260/280) usando NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

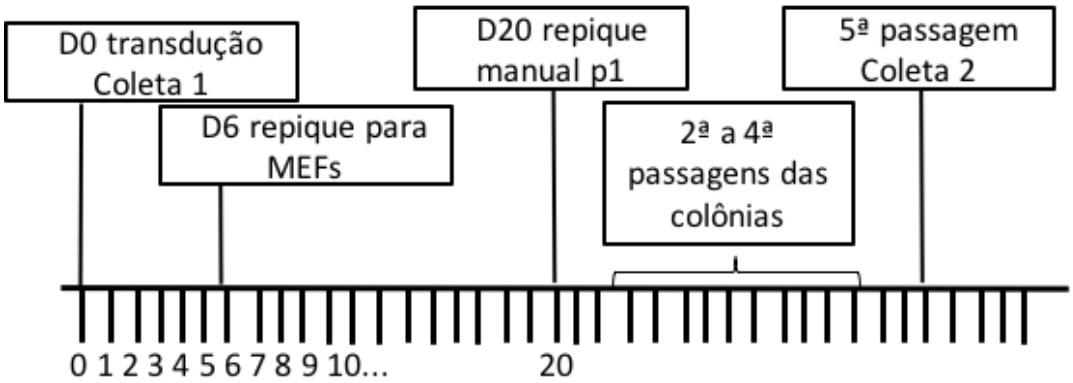
Para análise do perfil de miRNA foi utilizada a metodologia descrita por Silveira et al. em 2012. A reação de transcriptase reversa foi realizada com miScript (Quiagen nº218193, Venlo, Limburg, Holanda), seguindo instruções do fabricante. Inicialmente, 200ng do RNA total foram transformados em cDNA num total de 10 µl e usados na análise de 125 miRNAs. Resumidamente, o RNA foi incubado em 5x miScript HiFlex Buffer, 10x miScript Nucleic Mix, agua livre de RNase e miScript reverse transcriptase a 37°C por 1hora e a 95°C por 5 minutos.

A expressão dos miRNAs foi analisada nas células equinas eFibro, eAdMSC e etCU antes e após da indução a pluripotência. As análises foram realizadas em reações de 6 µl contendo 10 µM primer reverse Universal (Quiagen), 10 µM primer forward específico de miRNA (Apendice A), 0,03 µl de cDNA e master mix 2x Quantitec SYBER Green (Quiagen). A reação de PCR-tempo real foi analisada usando QuantStudio 6 Flex PCR System (Applied Biosystems) com as seguintes condições de ciclo: 95°C por 5 minutos, 45 ciclos de 95°C por 10 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 15 segundos, seguida por uma análise de curva de *melt* para confirmação da amplificação. A normalização dos valores de amplificação foi

realizada pela subtração do valor de cycle thrashold (Ct) do miRNA de interesse pelo valor do Ct no miRNA-99b o qual apresentou expressão constante em todos os grupos analisados.

Após verificar a homologia entre os miRNAs humanos e equinos mediante o miRBase (hhtp://mirbase.com), foi utilizada a ferramenta DIANA TOOLS (mirPath v.3) para o estudo das vias reguladas por os miRNAs de interesse.

Figura 8 - Momentos de coleta de material para análise experimental



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Desenho experimental mostrando as coletas de material para análise comparativa de miRNA.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Produção e caracterização das células eiPS

As células mesenquimais de tecido adiposo, medula óssea, tecido de cordão umbilical e fibroblastos equinos foram induzidos a pluripotência com os fatores de reprogramação OSKM humanos e murinos, com a finalidade de gerar células eiPS e cada linhagem respondeu de maneira diferente ao processo de reprogramação (Tabela 3).

Quando utilizando os fatores de reprogramação humanos, as células etCU exibiram as primeiras colônias com morfologia típica aproximadamente 11 dias após a indução (Figura 9). Já as células eAdMSC começam a se organizar em colônias

com morfologia típica em 13 dias após transdução com hOSKM enquanto os fibroblastos começam a mostrar este comportamento 15 dias após a indução (Figura 10). As três linhagens foram repicadas após aproximadamente 20 dias pós-transdução (Figura 11). Apenas uma linhagem de eAdMSC foi produzida com os fatores de reprogramação murinos (Figura 12).

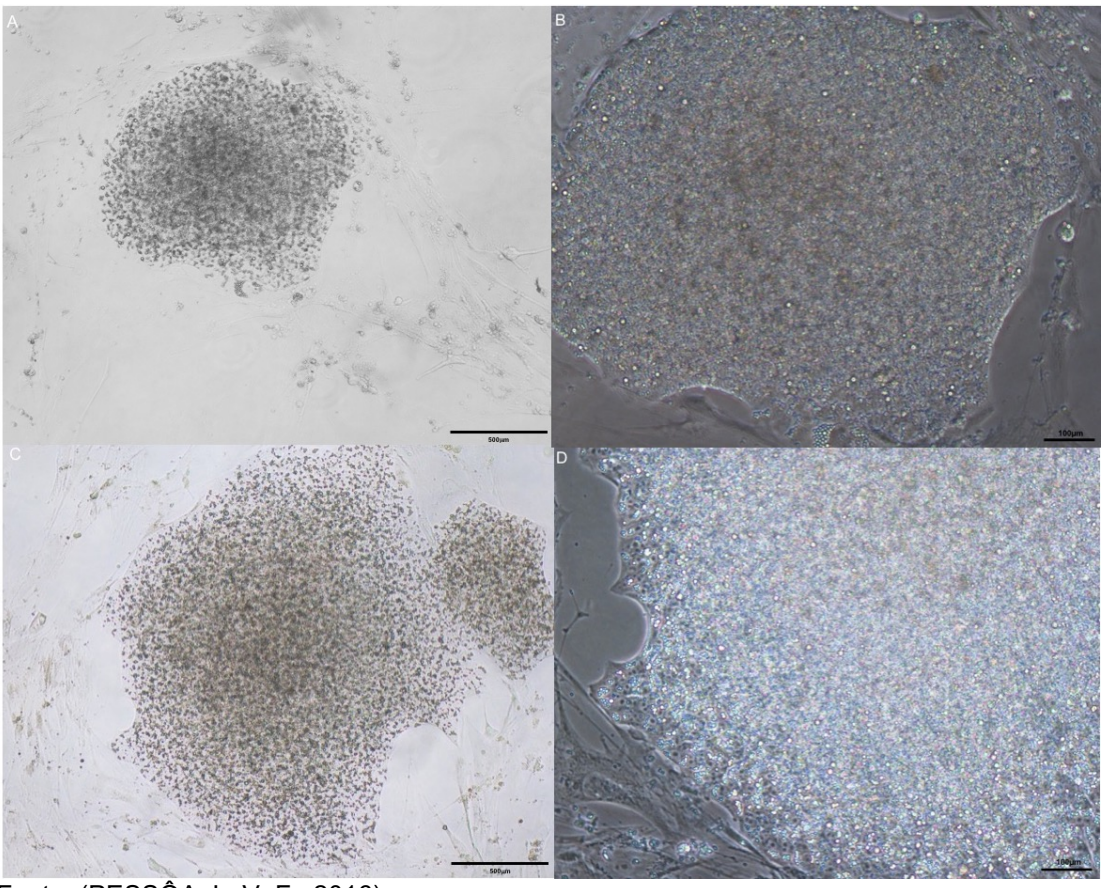
As células derivadas de medula óssea foram induzidas a reprogramação com os fatores humanos e murinos, porém não foi possível produzir colônias de células eiPS a partir deste tipo celular.

Tabela 3 - Resumo da produção total de células eiPS

Tipo celular	Fator de reprogramação	Total de Colônias	Linhagens Isoladas
eMO	hOSKM	0	0
eMO	mOSKM	0	0
etCU	hOSKM	58	21
etCU	mOSKM	0	0
eAdMSC	hOSKM	322	33
eAdMSC	mOSKM	1	1
eFibro	hOSKM	65	30
eFibro	mOSKM	0	0

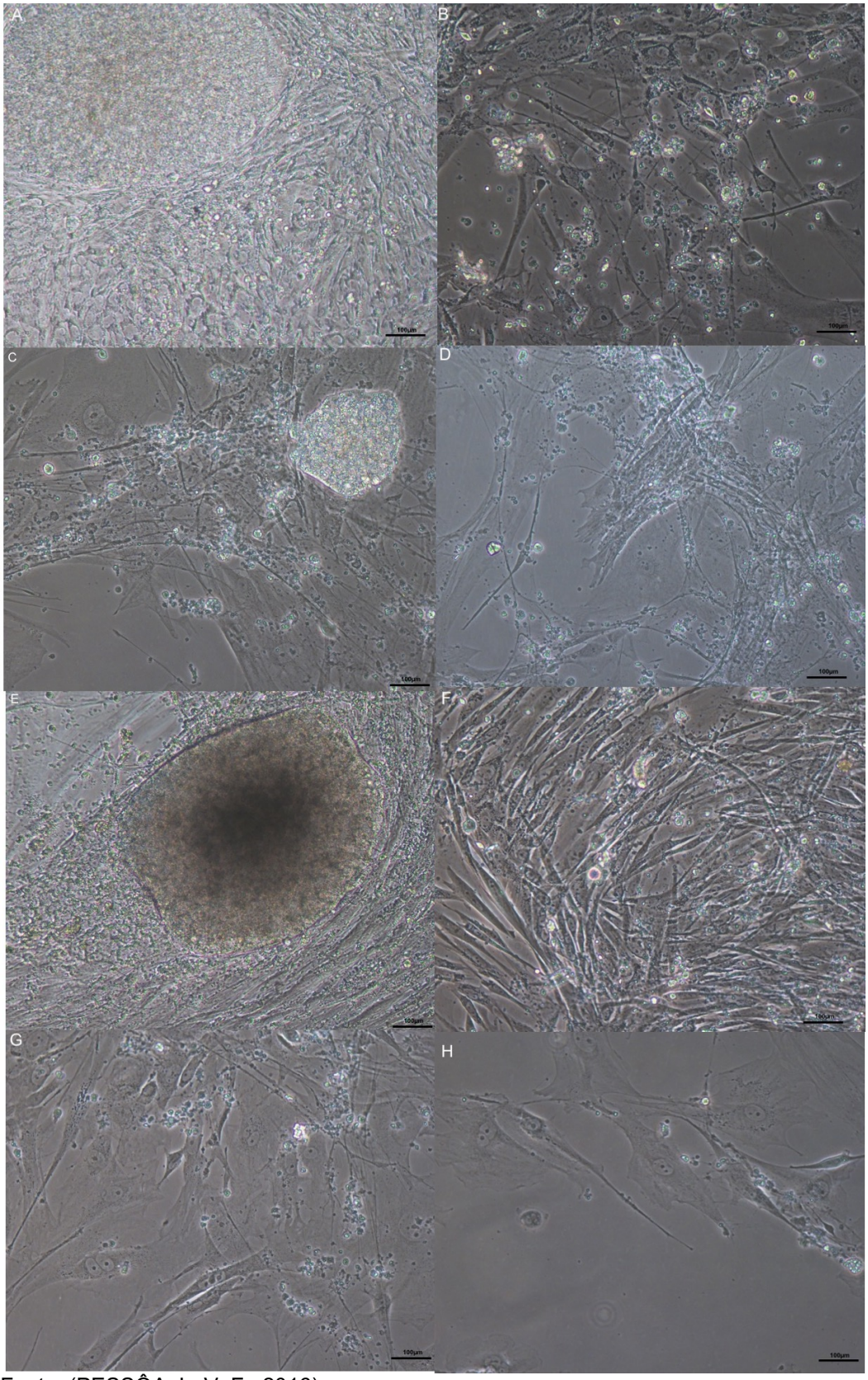
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Relação total do número de colônias produzido para cada linhagem celular e cada conjunto de fatores de reprogramação

Figura 9 - Colônias de células eiPS derivadas de etCU



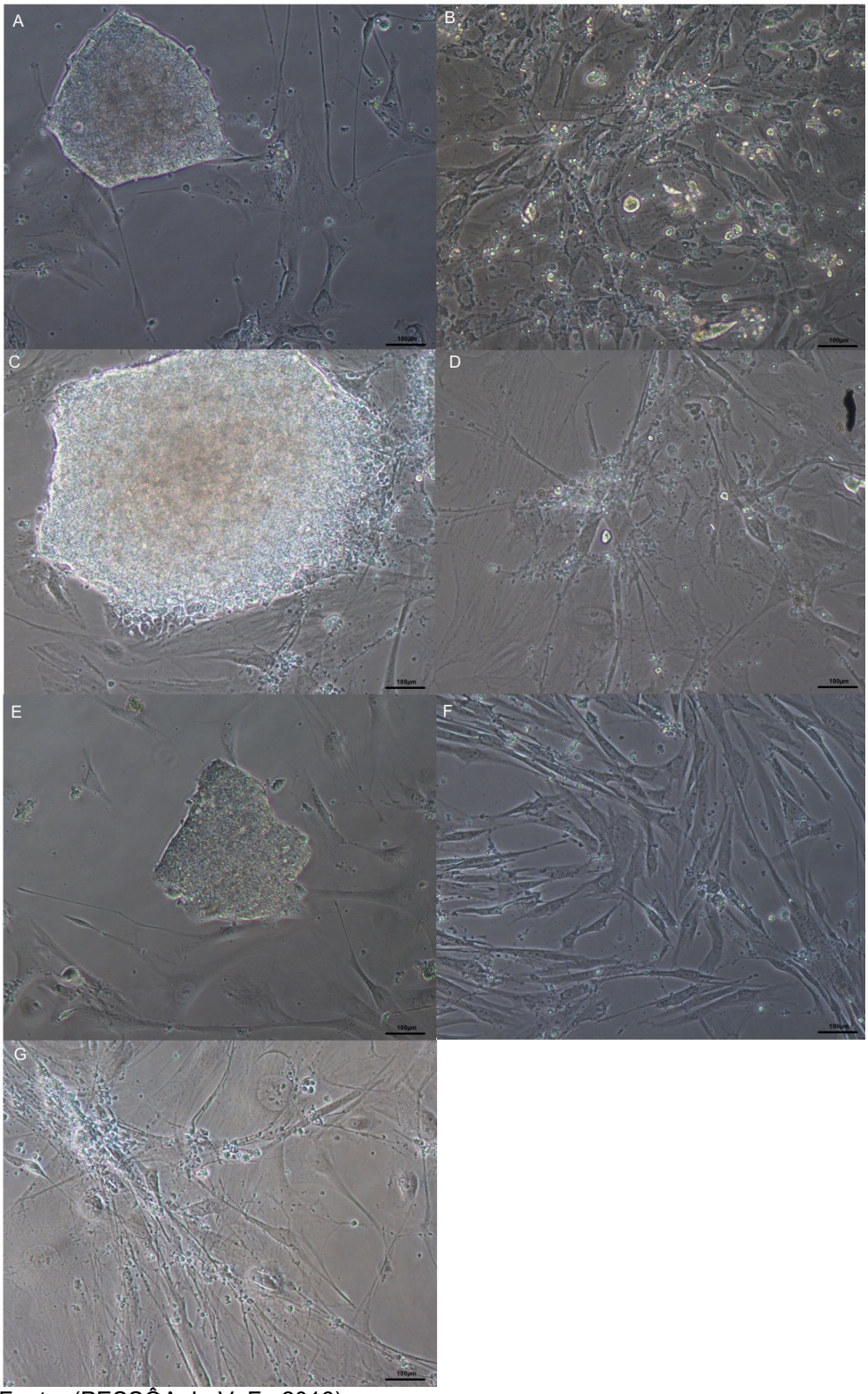
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Primeiras colônias de células eiPS derivadas de etCU, utilizando os fatores de reprogramação humanos. A e C com aumento de 100x e B e D com aumento de 200x .

Figura 10 - Células após 15 dias em reprogramação com os fatores humanos e murinos



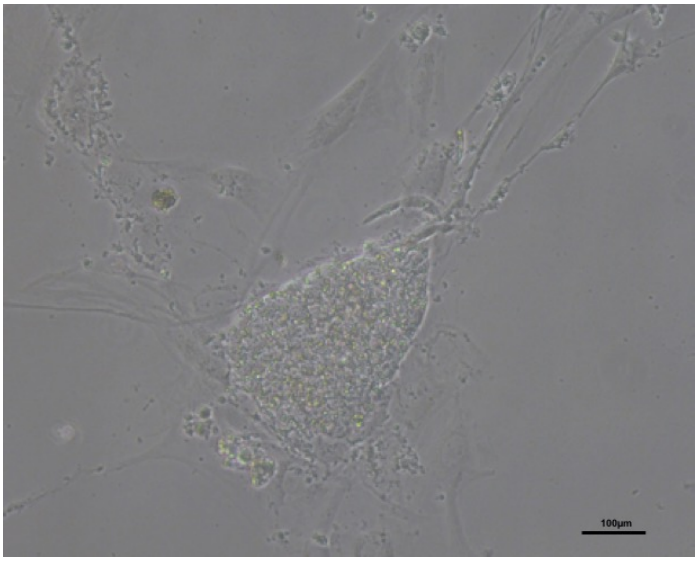
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Células de eAdMSC (A e B), etCU (C e D), eFibro (E e F) e eMO (G e H), 15 dias após a indução a pluripotência no quarto experimento, com os fatores de reprogramação humanos (A, C, E e G) e murinos (B, D, F, H), em aumento de 200x.

Figura 11 - Células após 30 dias em reprogramação com os fatores humanos e murinos



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Células de eAdMSC (A e B), etCU (C e D), eFibro (E e F) e eMO (G e H), 30 dias após a indução a pluripotência no quarto experimento, com os fatores de reprogramação humanos (A, C, E e G) e murinos (B, D, F). Nota-se a ausência das células de eMO induzidas com os fatores murinos, devido a contaminação, em aumento de 200x.

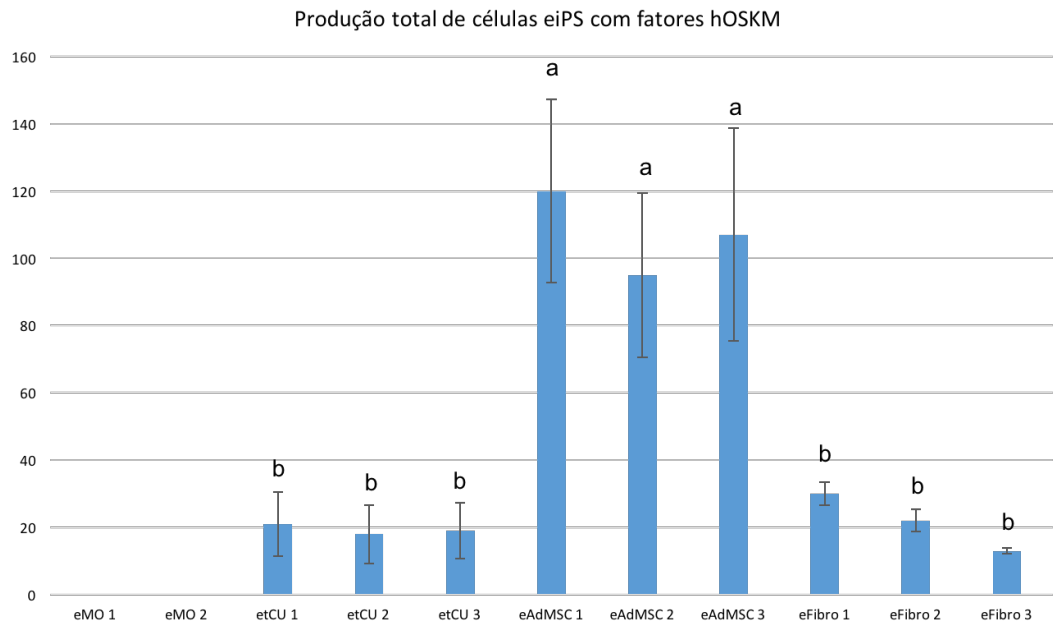
Figura 12 - Células eiPS produzidas com os fatores de reprogramação murinos



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônia gerada a partir da reprogramação de células eAdMSC com os fatores murinos, em aumento de 200x.

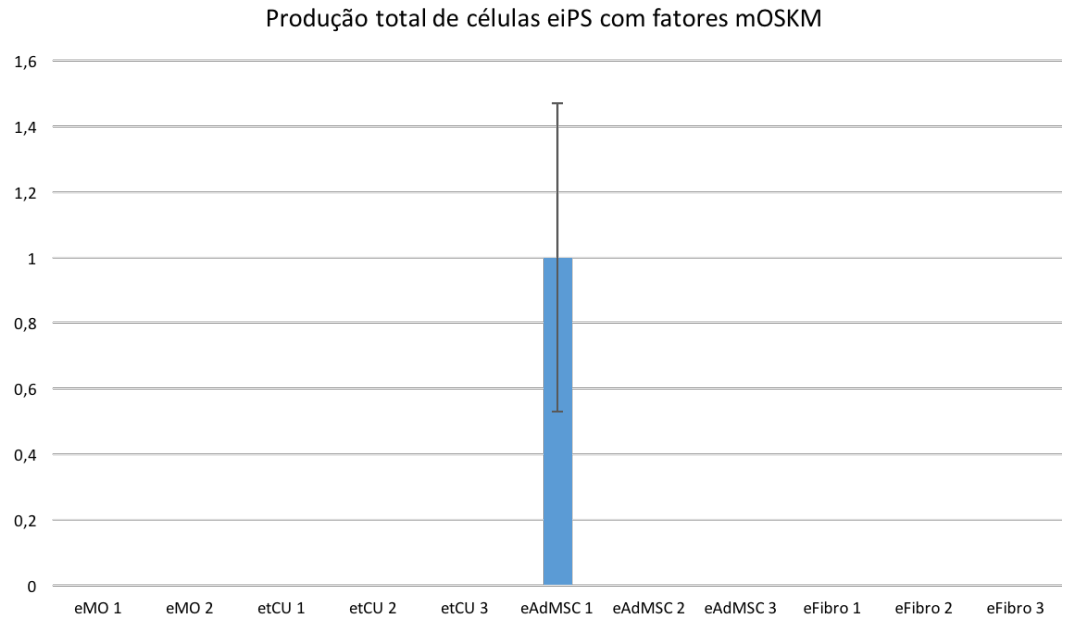
Compararmos o comportamento dos fatores de transcrição hOSKM e mOSKM perante o processo de reprogramação, dentro de cada linhagem celular. Enquanto os fatores murinos produziram apenas uma linhagem de células iPS derivadas de eAdMSC, os fatores de reprogramação humanos foram capazes de produzir variadas linhagens de células iPS derivadas de eAdMSC, etCU e eFibro ($P<0.05$; Figuras 13 e 14).

Figura 13 - Gráfico mostrando produção total de células eiPS com fatores hOSKM



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Média da produção total de células eiPS das diferentes linhages, usando os fatores de reprogramação humanos.

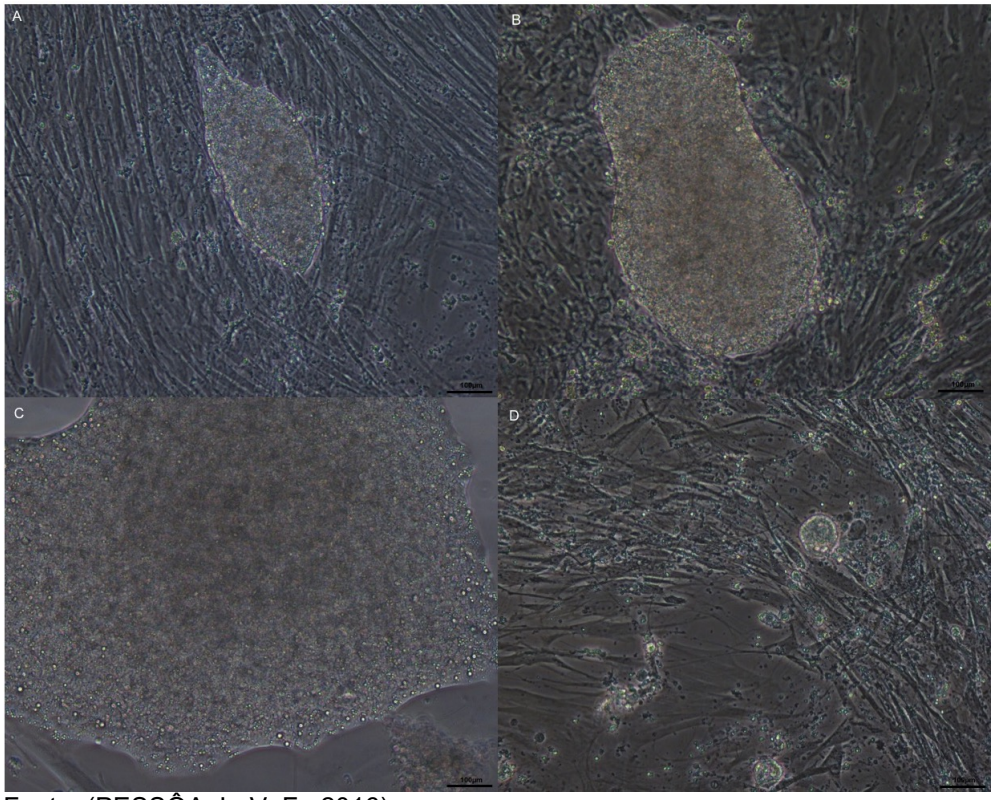
Figura 14 - Gráfico mostrando a produção total de células eiPS com fatores mOSKM



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Média da produção total de células eiPS das diferentes linhages, usando os fatores de reprogramação mirinos.

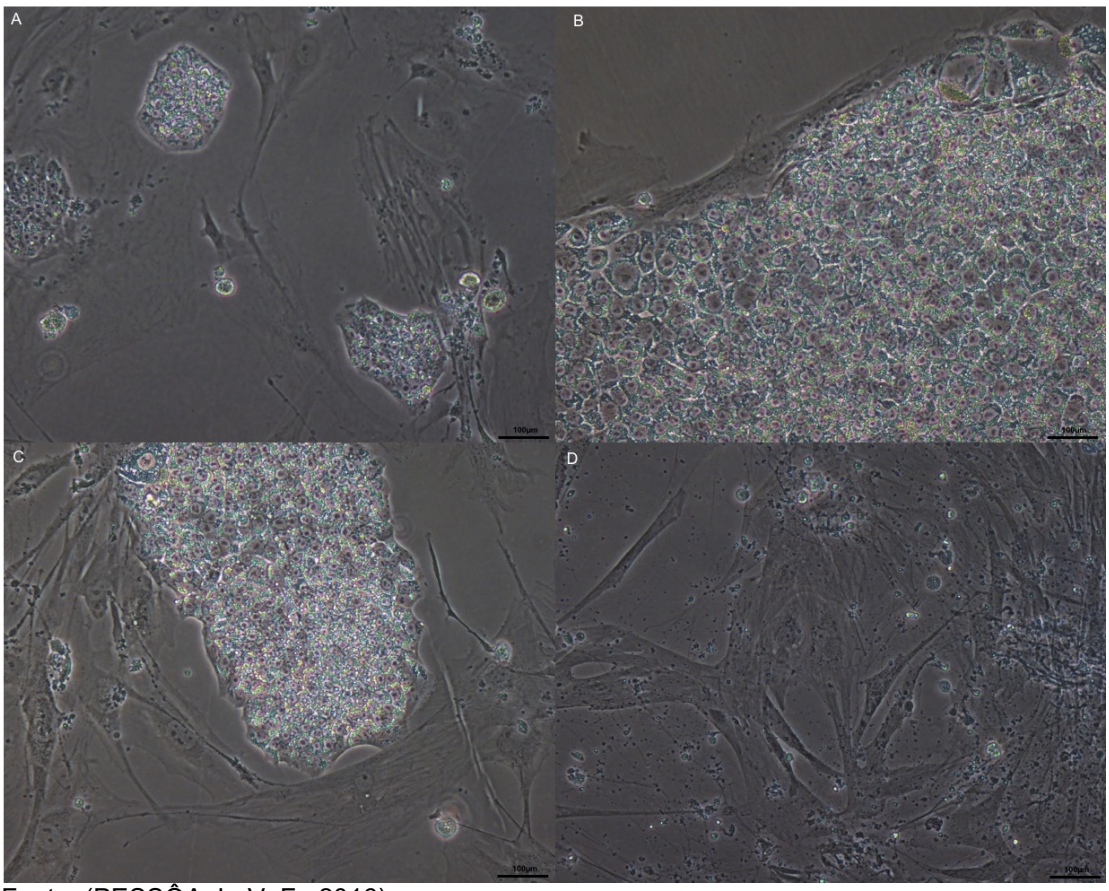
Avaliando a formação de colônias para as linhagens celulares estudadas e produzidas em todos as repetições, nota-se maior eficiência para células derivadas de eAdMSC (322, P<0.01) do que para células derivadas de eFibro (65) e etCU (58), que não diferiram (P=0.95) e ausência de células iPS geradas a partir das linhagens de eMO (Figuras 15 e 16).

Figura 15 - Colônias de iPS equinas no dia 18 depois da infecção



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônias de iPS equina no dia 18 depois da infecção, para as linhagens de Fibroblasto (A), eAdMSC (B), etCU (C) e ausência das mesmas para as células de eMO (D), em aumento de 200x.

Figura 16 - Colônias de iPS equinas no dia 31 depois da infecção



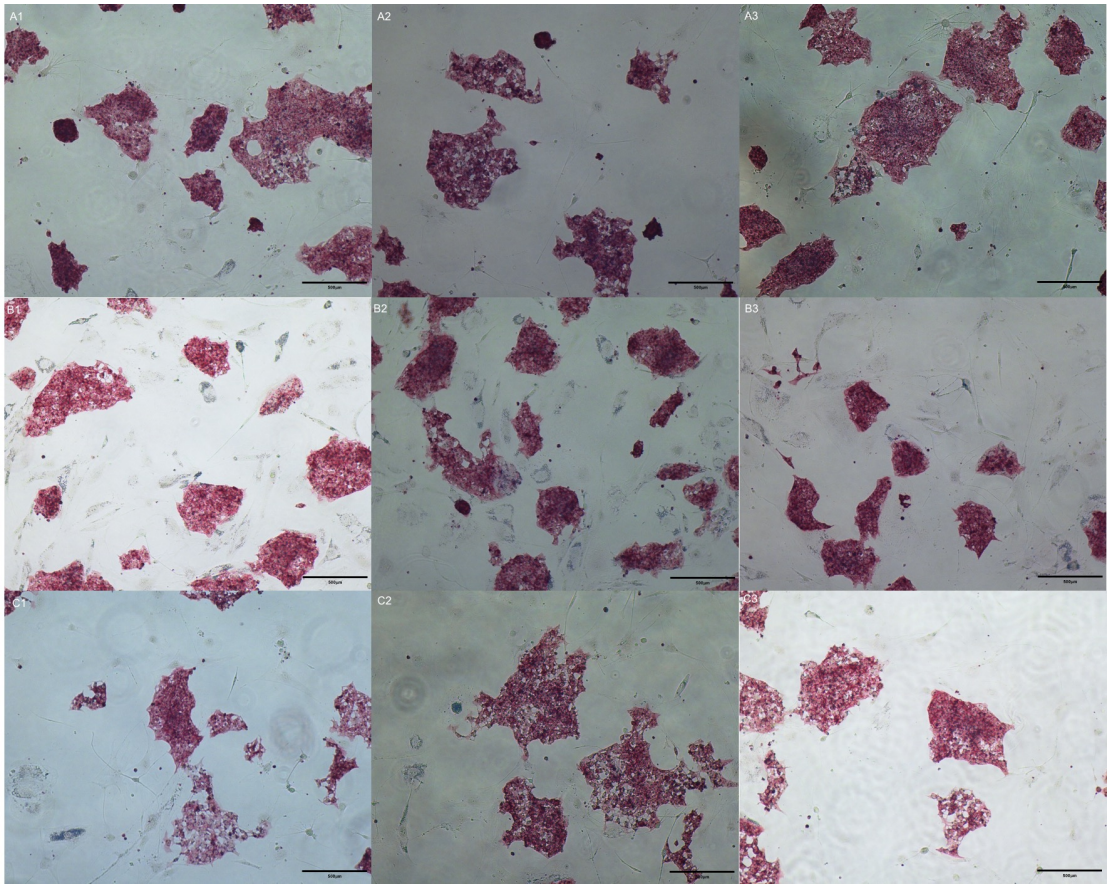
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônias de eiPS já na segunda passagem, para as linhagens de Fibroblasto (A), eAdMSC (B), etCU (C), células de eMO (D) no momento em que foram descartadas, no dia 31 depois da infecção, ainda sem apresentar colônias, em aumento de 200x.

Também analisamos as células geradas no dia 15, quando somente as células de medula óssea não apresentavam colônias, e no dia 20, época em que é feito o primeiro repique das células eiPS. No dia 15, a produção de colônias foi maior para as células derivadas de tecido de tecido adiposo, em média 33±4, seguida por cordão umbilical, em média 9±3 colônias, as linhagens de fibroblasto apresentaram 0,5±0,2 colônias ($P<0.05$). Enquanto no dia 20, foram observadas em média 47 ±6 colônias para as células eiPS derivadas de eAdMSC; 8 ±3 colônias para as células eiPS derivadas de etCU e 7 ±1 colônias para as células eiPS derivadas de fibroblastos ($P<0.05$).

As colônias clonais testadas das linhagens eiPS derivadas de eAdMSC, eFibro e etCU apresentaram-se positivas para detecção de fosfatase alcalina (Figura 17), formação de corpos embrióides (Figura 18), foram testadas para diferenciação espontânea *in vitro* (Figura 19), detecção imunocitoquímica de OCT4 (Figura 20), e

as células eiPS derivadas de fibroblastos e de células mesenquimais de tecido adiposo foram positivas para detecção de NANOG (Figura 21), TRA1-60 (Figura 22), algumas células das colônias derivadas de eFibro e as colônias derivadas de eAdMSC foram positivas para detecção de TRA1-81 (Figura 23). Enquanto as células eiPS-eFibro foram negativas para detecção de SSEA1, as eiPS-eAdMSC foram positivas (Figura 24) e eiPS-eFibro e eiPS-eAdMSC foram negativas para detecção de SSEA4 (Figura 25). Devido a problemas por contaminação, não pudemos testar as células eiPS derivadas de células mesenquimais de tecido de cordão umbilical para estes marcadores. As células foram produzidas em variadas rotinas e cultivadas por cerca de 20 passagens antes de serem criopreservadas.

Figura 17 - Colônias de iPS equina positivas para detecção de fosfatase alcalina

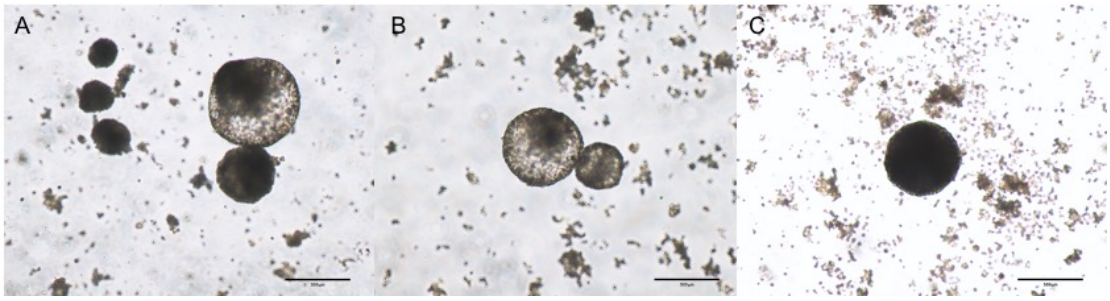


Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônias de iPS equina positivas para a fosfatase alcalina. A, B e C foram induzidas a partir de 3 linhagens de células de tecido de cordão umbilical equino (passagem 23), 3 linhagens de células mesenquimais de tecido adiposo (passagem 25) e 3 linhagens de fibroblastos equinos (passagem 24) respectivamente, em aumento de 100x.

As linhagens que de células eiPS produzidas (eFibro, eAdMSC e etCU) foram capazes de produzir corpos embrióides (Figura 24). Os CEs produzidos foram

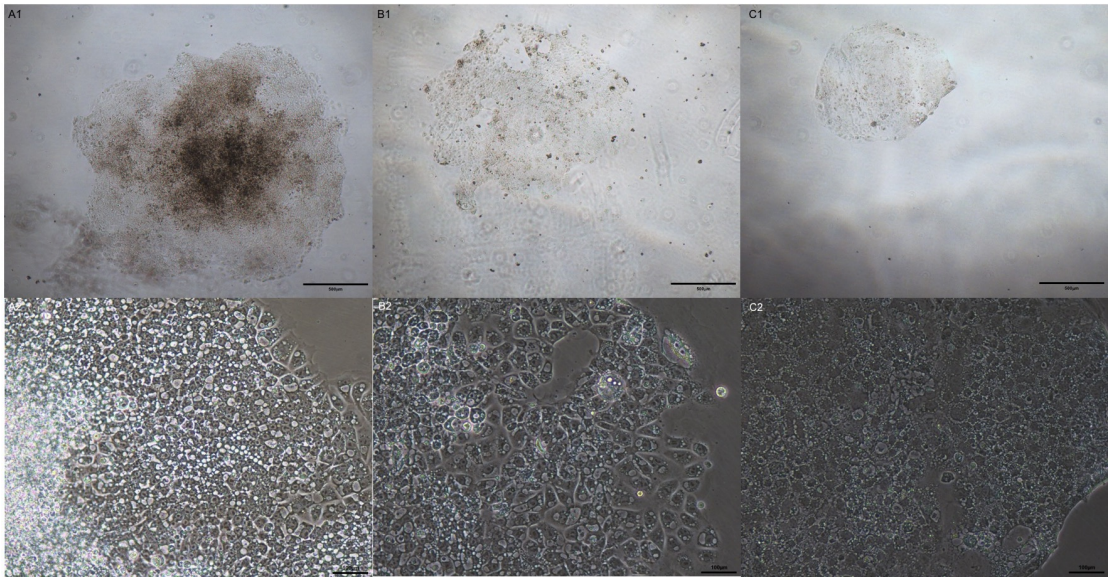
posteriormente dissociados mecanicamente e cultivados em placas de 35 mm de diâmetro em condição padrão da estufa, para diferenciação espontânea (Figura 25), por pelo menos 10 dias.

Figura 18 - Produção de corpos embrióides a partir das células eiPS



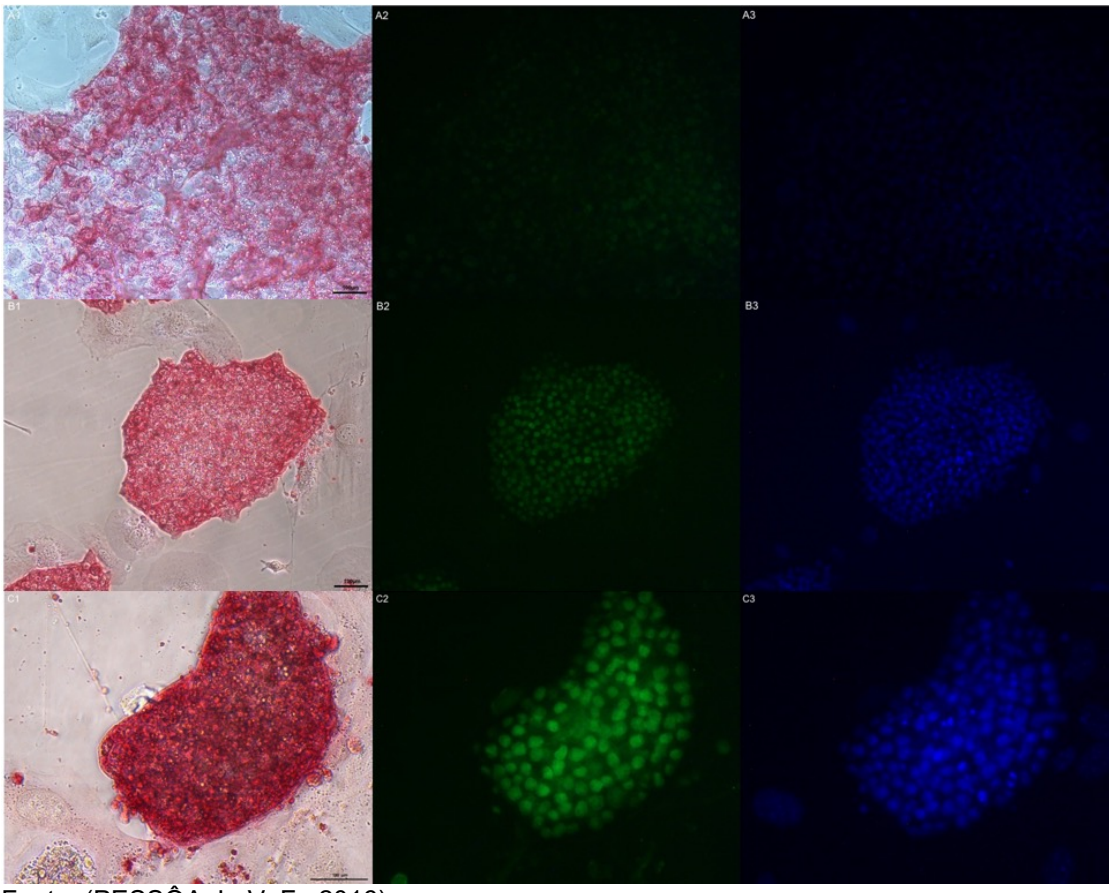
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Corpos embrióides produzidos a partir de colônias de eiPS induzidas a partir de Fibroblastos (A), tecido de cordão umbilical (B) e tecido adiposo (C), no dia 4, aumento de 100x.

Figura 19 - Diferenciação espontânea dos corpos embrióides



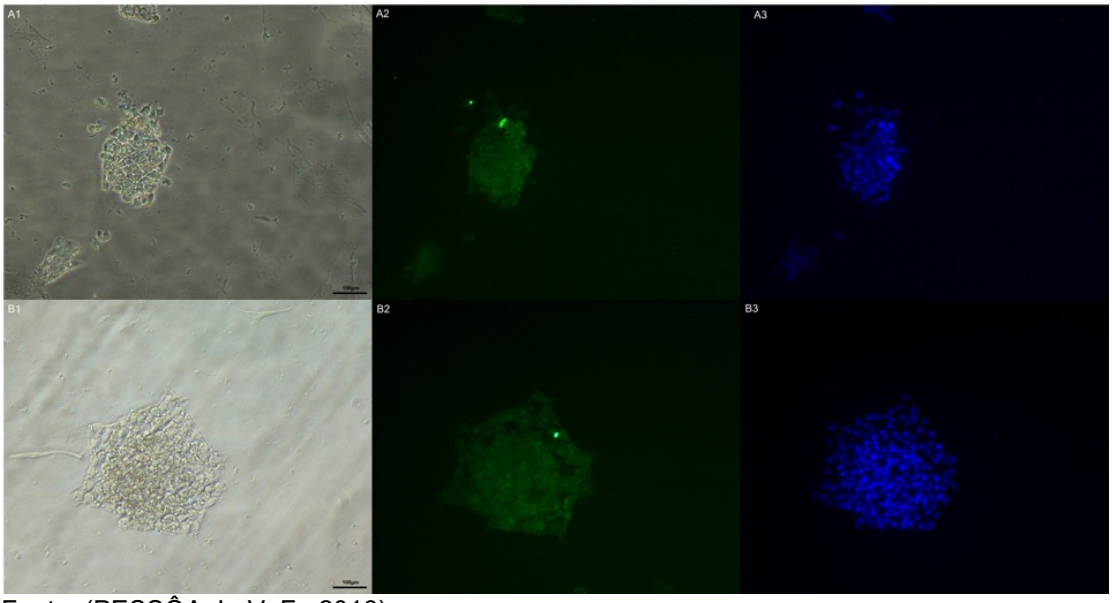
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Corpos embrióides de eiPS induzidas a partir de células de tecido adiposo (A), de tecido de cordão umbilical (B) e fibroblastos (C) foram dissociados mecanicamente e plaqueados em cultivo com meio IMDM por 10 dias para diferenciação espontânea *in vitro.* (1) em aumento de 100x e (2) em aumento de 200x.

Figura 20 - Detecção imunocitoquímica de OCT4 das células eiPS



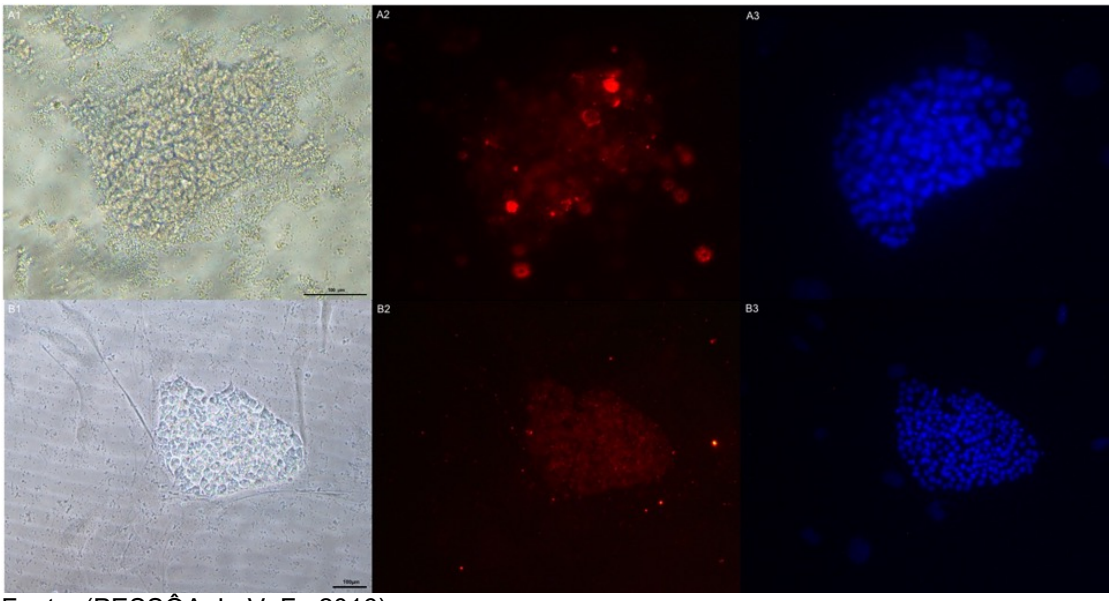
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônias de eiPS derivadas de etCU (A) em aumento de 100x, eAdMSC (B) em aumento de 100x e eFibro (C) em aumento de 200x, positivas para detecção de fosfatase alcalina (1) positivas para Oct4/FITC (2) e Hoechst (3).

Figura 21 - Detecção imunocitoquímica de NANOG das células eiPS



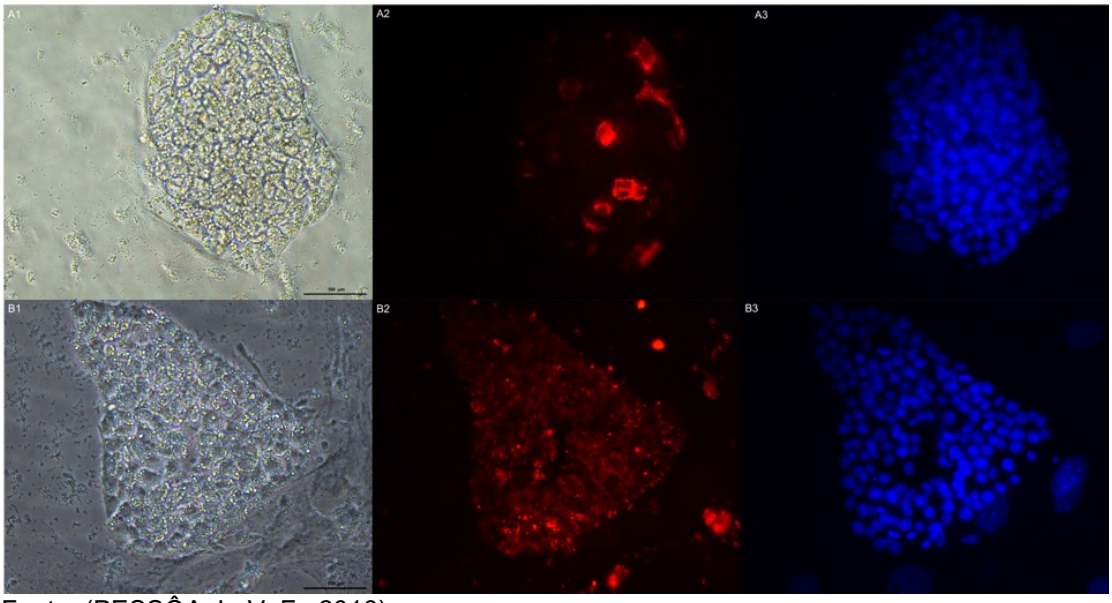
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônias de eiPS derivadas de eFibro (A) e eAdMSC (B) positivas para expressão de Nanog/FITC (2) e Hoechst (3), em aumento de 100x.

Figura 22 - Detecção imunocitoquímica de TRA1-60 das células eiPS



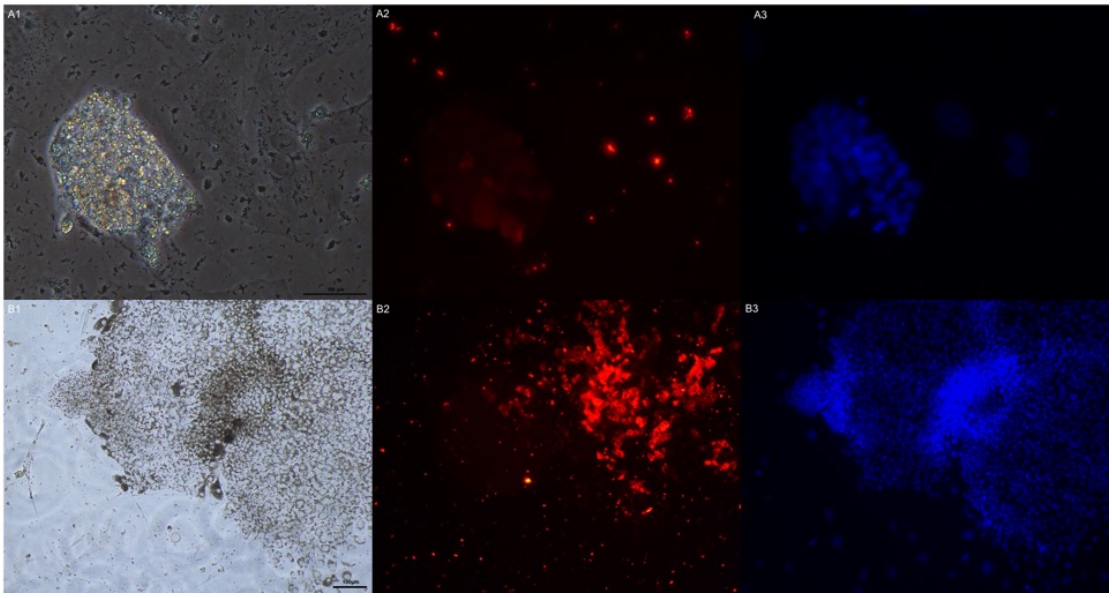
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônias de eiPS derivadas de eFibro (A) em aumento de 200x, e eAdMSC (B) em aumento de 100x positivas para detecção de TRA1-60/PE (2) e Hoechst (3).

Figura 23 - Detecção imunocitoquímica de TRA1-81 das células eiPS



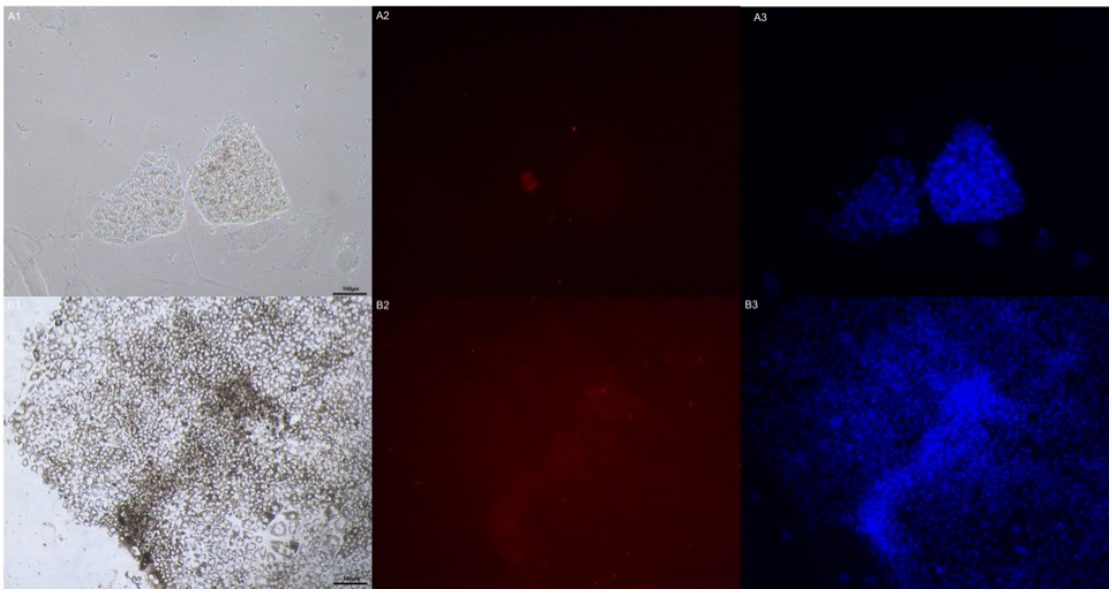
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônias de eiPS derivadas de eFibro (A), apresentando algumas células positivas para detecção deTRA-81 e eAdMSC (B) positivas para detecção de TRA1-81/PE (2) e Hoechst (3), em aumento de 200x.

Figura 24 - Detecção imunocitoquímica de SSEA1 das células eiPS



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônias de eiPS derivadas de eFibro (A), negativas para detecção de SSEA1 e eAdMSC (B) positivas para detecção de SSEA1/PE (2) e Hoechst (3), em aumento de 100x.

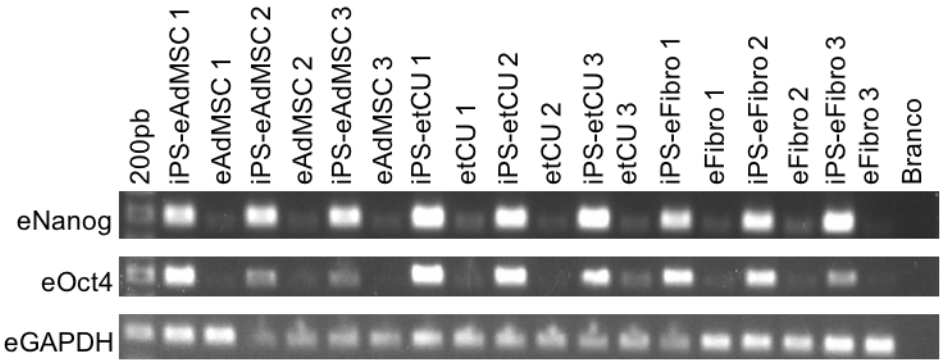
Figura 25 - Ausência de detecção imunocitoquímica de SSEA4 das células eiPS



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Colônias de eiPS derivadas de eFibro (A) e eAdMSC (B) negativas para expressão de SSEA4/PE (2) e Hoechst (3), em aumento de 100x.

Analisamos a expressão dos fatores de transcrição NANOG e OCT4 para as linhagens celulares estudadas após a reprogramação celular. Observamos por PCR convencional, que após a indução à pluripotência, foram detectados transcritos para os genes NANOG e OCT4 para todas as linhagens de células reprogramadas. Após a reprogramação houve um nítido aumento da expressão destes fatores (Figura 26), e o aumento na expressão de NANOG nestas células é um importante indício da reprogramação celular, já que a expressão deste fator é endógena em nosso sistema.

Figura 26 - Expressão de Oct4, Nanog e do endógeno GAPDH nas células equinas pré e pós indução a pluripotência



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Expressão dos transcritos NANOG, OCT4 e do endógeno GAPDH em células equinas derivadas de tecido adiposo (eAdMSC), tecido de cordão umbilical (etCU) e fibroblastos (eFibro) antes e depois da indução a pluripotência (iPS). É possível notar baixa expressão dos transcritos nas células pré indução e alta expressão após a reprogramação celular.

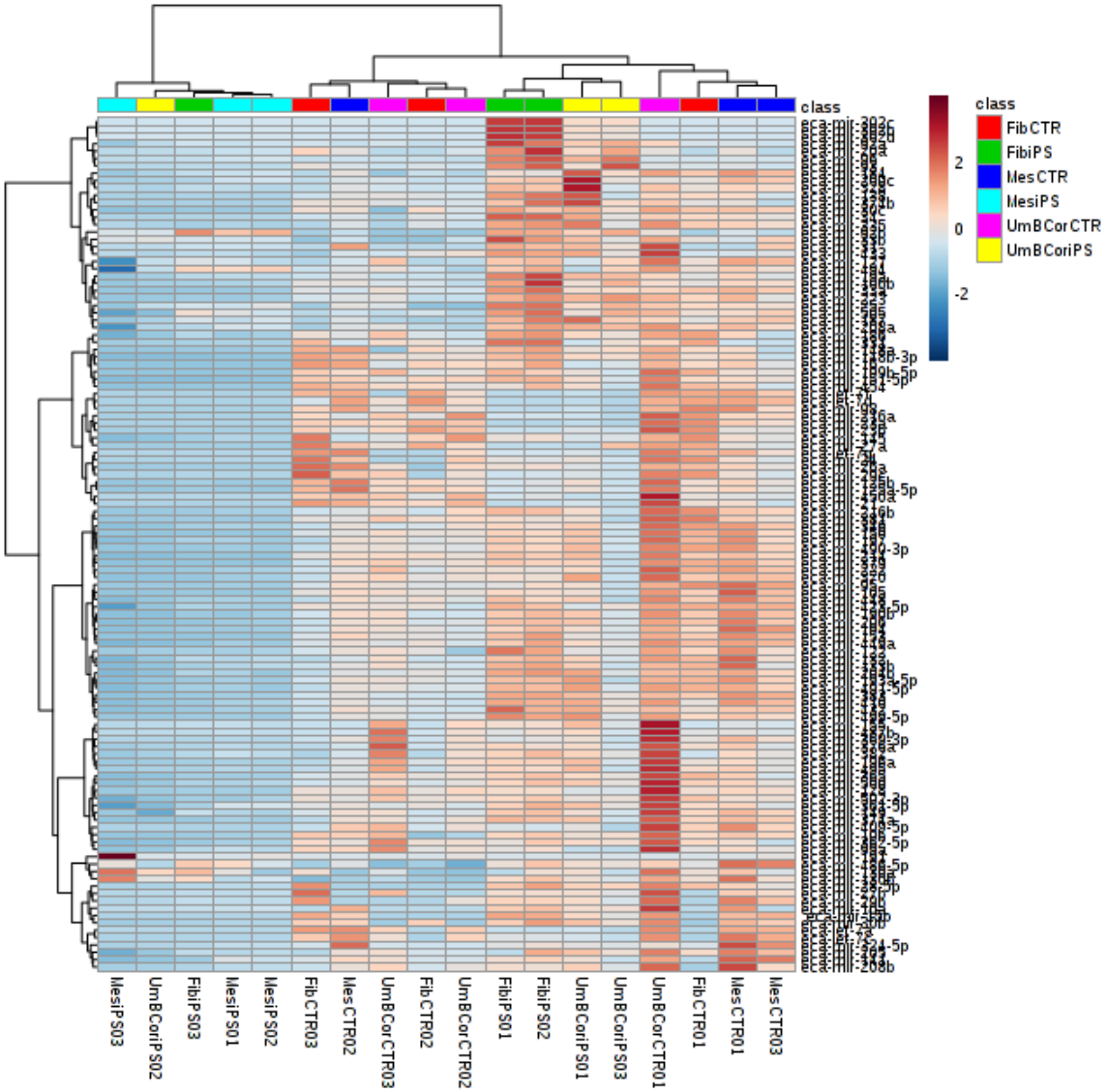
3.4.2 Análise do perfil global de miRNAs após o processo de indução à pluripotência

A indução a pluripotência é alcançada através da inserção dos fatores exógenos OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC nos genomas alvo da célula. Entretanto, após a indução, os eventos subsequentes são estocásticos e dependem da eficiência de cada fator para estimular a reprogramação celular. Para avaliar os eventos moleculares associados à indução, nós investigamos os níveis relativos de miRNAs em fibroblastos, células mesenquimais de cordão umbilical e tecido adiposo pré e após indução a pluripotência.

Análises não supervisionadas demonstraram diminuição para parte dos miRNAs nas células eiPS investigadas, quando comparadas aos controles, já que há uma tendência de agrupamento entre linhagens de células não pluripotentes e linhagens de células pluripotentes (Figura 27). Este mesmo efeito foi observado quando feita a análise de componente principal (PCA) destas linhagens celulares, onde ocorreu um agrupamento de acordo com suas semelhanças e diferenças (Figura 28). É possível notar que duas linhagens de células iPS derivadas de eFibro e etCU formaram grupos separados das demais células iPS e próximos aos controles (Figura 27). Deste modo, o padrão de miRNA expresso nas células antes e

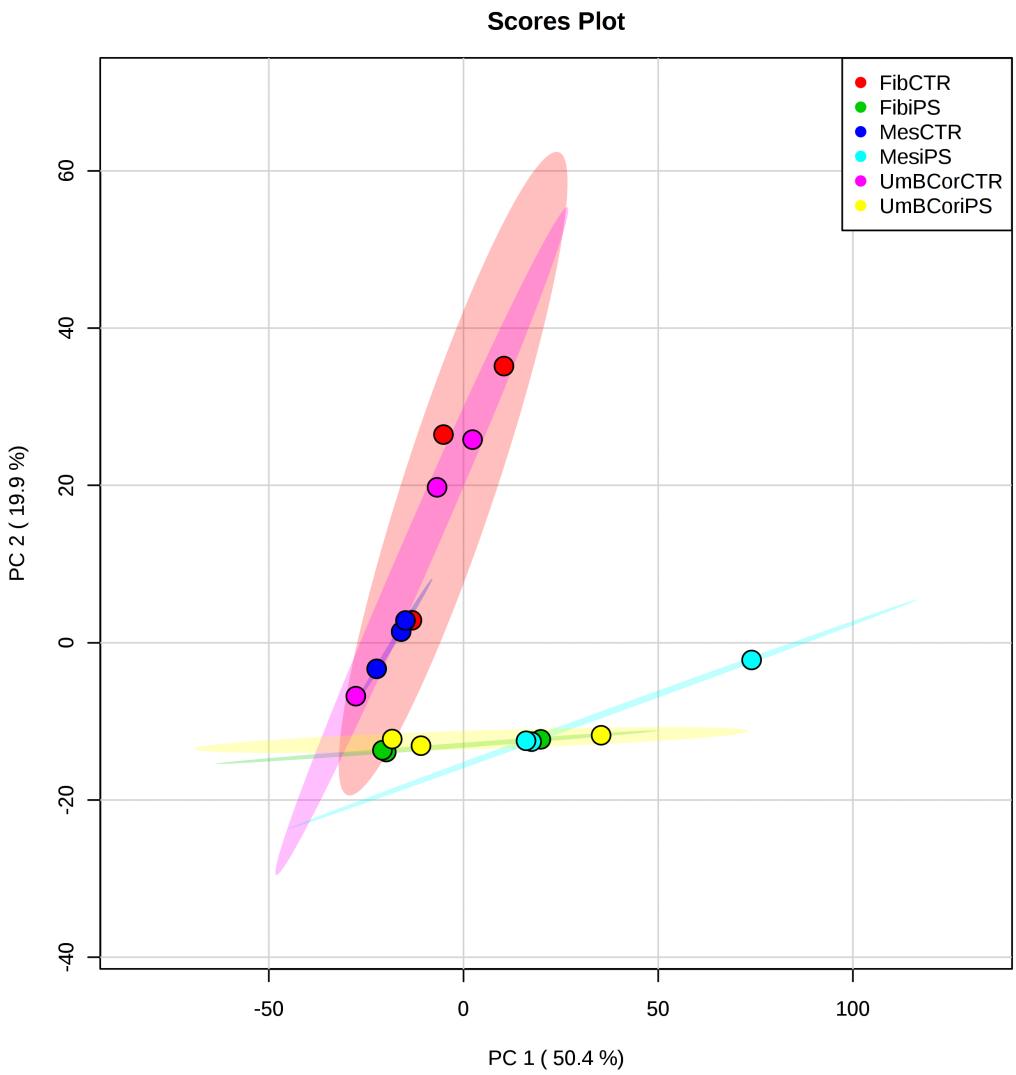
depois da indução é diferente, todavia, algumas linhagens de células eiPS não apresentam padrões completamente semelhantes, o que sugere uma reprogramação heterogênea em cada linhagem de eiPS.

Figura 27 - Heatmap da análise do perfil de miRNA das células eiPS e controle



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: *Heatmap* da análise do perfil de miRNA das células antes e após a indução a pluripotência, mostrando o agrupamento das células eiPS e controle derivada das linhagens de eAdMSC, etCU e eFibro.

Figura 28 - Score plot da análise do perfil de miRNA das células eiPS e controle



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: *Score plot* representativo da análise PCA de miRNAs das células eiPS derivadas de células mesenquimais de cordão umbilical, de tecido adiposo e fibroblastos e células controle mesenquimais de cordão umbilical, de tecido adiposo e fibroblastos. Este gráfico apresenta as diferenças ou similaridades entre os perfis de miRNAs das linhagens analisadas, quanto mais agrupados ou distantes uns dos outros observa-se maior ou menor similaridade respectivamente.

3.4.2.1 Análise bioinformática do perfil de miRNAs para identificação de vias reguladas nas células eiPS derivadas de fibroblastos

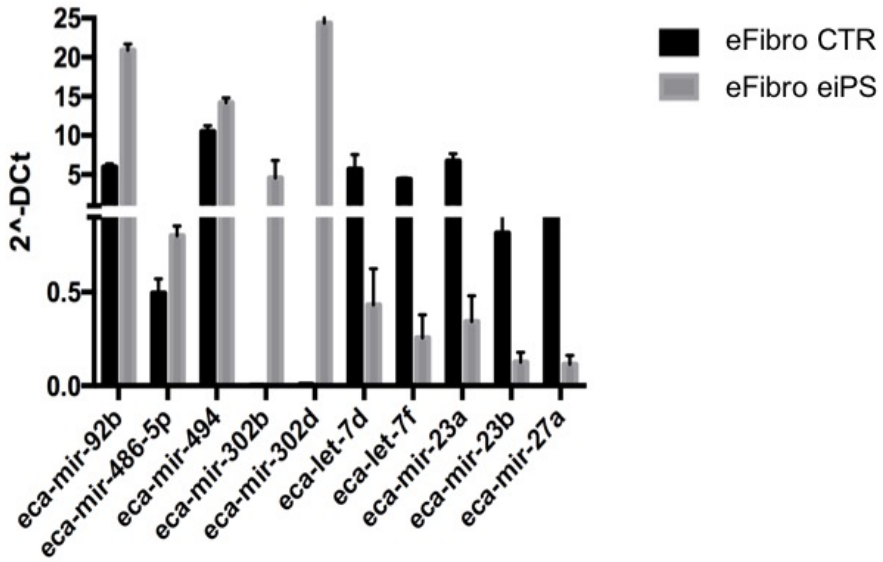
Inicialmente foram investigados os níveis de 125 miRNAs equinos em fibroblastos antes e após a indução a pluripotência e, foram identificados 117 miRNAs presentes em ambos os grupos. Destes 117 miRNAs, 10 estavam diferentemente expressos entre os fibroblastos controle e as células eiPS. Cinco

apresentaram níveis aumentados nas eiPS: eca-miR-92b, eca-miR-486-5p, eca-miR-494, eca-miR-302b e eca-miR-302d, quando comparadas aos controles (Figura 29). Entre estes miRNAs destacam-se os integrantes da família miR-302-367, conhecida por regular os níveis de marcadores de pluripotência (SANDMAIER; TELUGO, 2015) e o eca-miR-92. Estes miRNAs também apresentam expressão aumentada em CTE e iPS humanas (Wilson et al., 2009; Sharma; Wu, 2013). A análise de bioinformática identificou um total de 24 vias preditas como reguladas por miRNAs com níveis aumentados nas iPS (Apêndice B), entre elas, a via de regulação da pluripotência em células tronco (Anexo A).

Ao mesmo tempo outros 5 apresentavam níveis diminuídos nas células eiPS: eca-let-7d, eca-miR-23a, eca-miR-23b e eca-miR-27a, em comparação aos controles (Figura 29). A análise destes miRNAs identificou que eles regulam 56 vias (Apêndice B). Entre estas vias, é predito que o controle de pluripotência em células tronco seja regulado por miRNAs expressos diferentemente em células eiPS-eFibro e fibroblastos controle. Os miRNAs aumentados nas células eiPS controlam apenas 41 genes associados a via de regulação da pluripotência em células tronco (Anexo A), enquanto 67 genes são regulados por miRNAs de expressão aumentada nas células controle (Apêndice B), também associados à via da pluripotência. É interessante notar que *POU5F* e *MYC* são preditos por serem controlados por miRNAs presentes em células controle e não em células eiPS, desta forma, estes resultados demonstram que a reprogramação celular é capaz de alterar níveis de miRNA relacionados a pluripotência em células eiPS derivadas de fibroblastos.

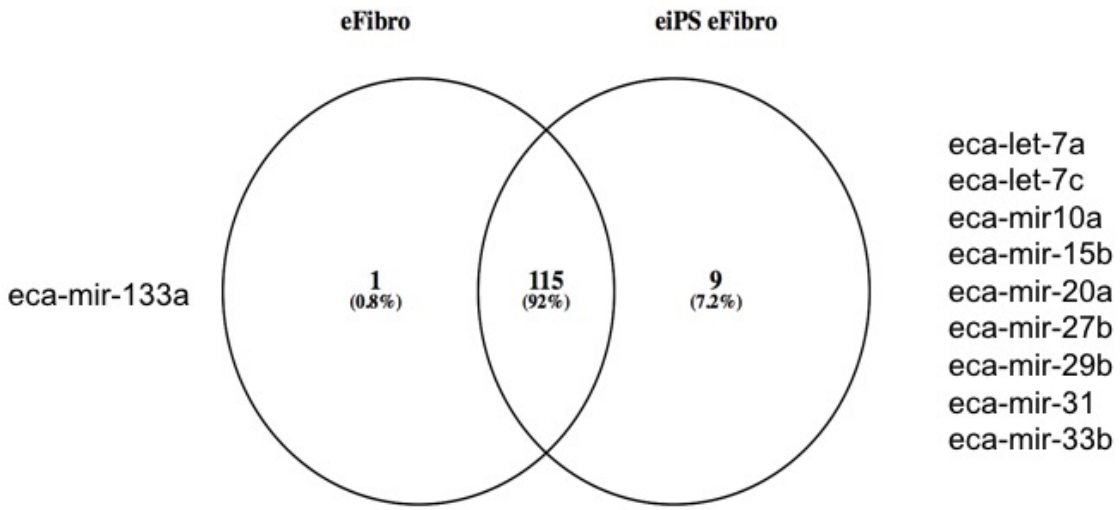
Foi ainda avaliado o número de miRNAs identificados exclusivamente em cada tipo celular (Figura 30). Destes, foi identificado o total de 608 genes envolvidos em 18 vias e regulados por miRNAs exclusivamente detectados em células eiPS-eFibro, entre elas a via de sinalização regulando a pluripotência em células tronco, controlada por cinco miRNAs reguladores de 58 genes. Já o eca-miR-133a, exclusivamente detectado em células eFibro, regula 23 genes envolvidos em cinco vias (Apêndice C).

Figura 29 - Análise do perfil de miRNA das células eiPS eFibro e controle



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: níveis de expressão dos miRNA diferentemente expressos entre as células eiPS e os fibroblastos controle.

Figura 30 - Diagrama de Venn mostrando os miRNAs expressos em cada grupo



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: MiRNAs exclusivamente expressos em cada grupo das células controle e eiPS-eFibro.

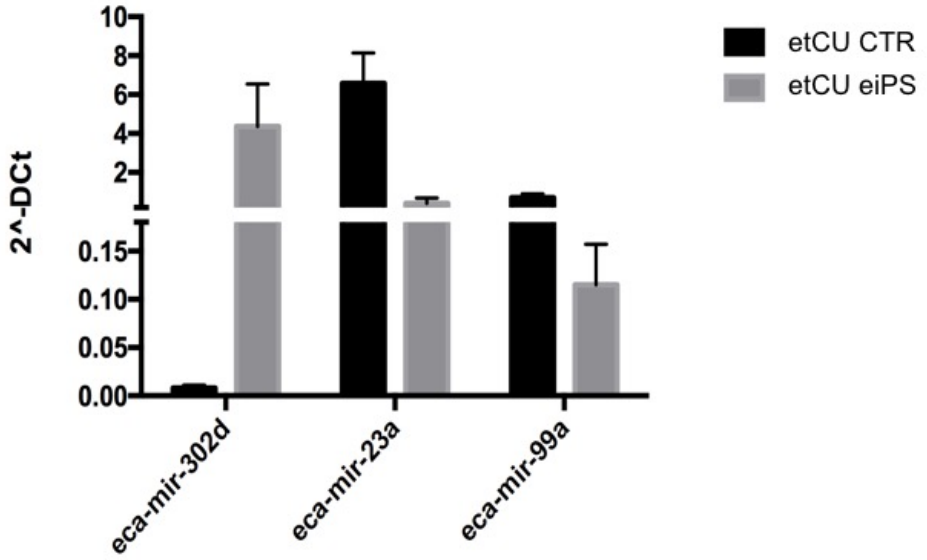
3.4.2.2 Análise bioinformática do perfil de miRNAs para identificação de vias reguladas nas células eiPS derivadas de mesenquimais de cordão umbilical

A análise dos 125 miRNAs das células mesenquimais de cordão umbilical antes e após a indução à pluripotência mostrou a presença de cinco miRNAs exclusivamente detectados nas células eiPS-etCU enquanto 120 miRNAs foram comumente detectados entre os dois grupos celulares.

Dos 120, três miRNAs foram diferentemente detectados entre as células controle e eiPS. O eca-miR-302d, predito que esteja relacionado à regulação de genes de 11 vias, entre elas a via de sinalização da Wnt (Apêndice D), encontrou-se aumentado em células eiPS quando comparado ao etCU controle. Já os eca-miR-23a e eca-miR-99a, estavam aumentados em etCU em comparação às células eiPS (Figura 31). Após a análise dos miRNAs mir-23a e miR-99a, pudemos relaciona-los à regulação de 20 vias (Apêndice D). Dentre as vias envolvidas, duas reguladas pelos miRNAs diferentemente expressos grupos eiPS e etCU controle parecem ter papel interessante por estarem envolvidas no controle da sinalização da Wnt e da biossíntese de ácidos graxos. Portanto, tais resultados sugerem diferentes mecanismos controlando a indução a pluripotência dentro das linhagens celulares. Contudo, é importante ressaltar que o baixo número de miRNAs diferentemente expressos entre essas duas linhagens celulares pode sugerir um processo de indução a pluripotência incompleto.

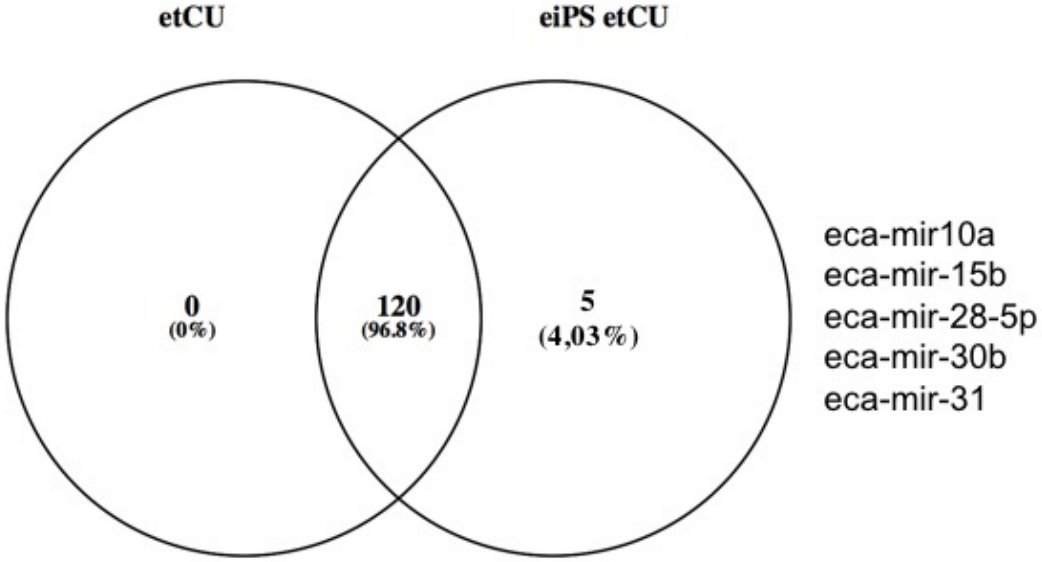
Já os cinco miRNAs exclusivamente detectados nas células eiPS-etCU (Figura 32) regulam 837 genes relacionados a 35 vias, entre elas a via de sinalização regulando a pluripotência em células tronco (Anexo A), controlada por cinco miRNAs responsáveis pela regulação de 38 genes (Apêndice E).

Figura 31 - Análise do perfil de miRNA das células eiPS etCU e controle



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Níveis de expressão dos miRNA diferentemente expressos entre as células eiPS e as células mesenquimais de cordão umbilical controle.

Figura 32 - Diagrama de Venn os miRNAs expressos em cada grupo



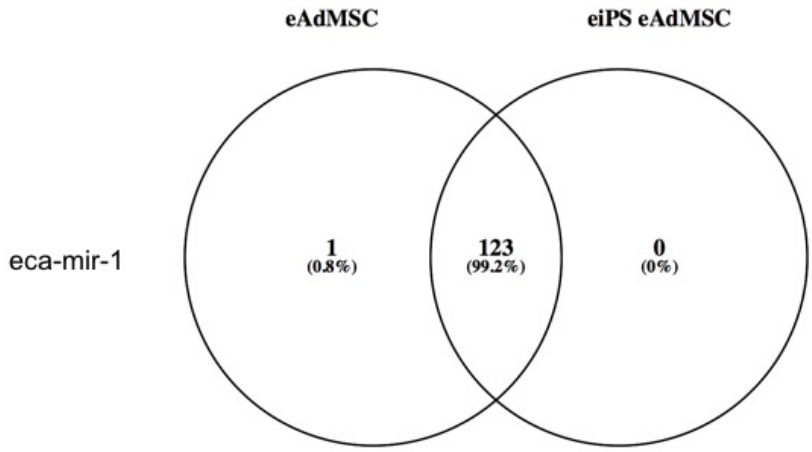
Fonte: (PESSÔA, L.V.F., 2016)
Legenda: MiRNAs exclusivamente expressos em cada grupo das células controle e eiPS-etCU.

3.4.2.3 Análise bioinformática do perfil de miRNAs para identificação de vias reguladas nas células eiPS derivadas de mesenquimais de tecido adiposo

Inicialmente foram investigados os níveis de 124 miRNAs em células mesenquimais de tecido adiposo antes e após a indução à pluripotência. Nossas análises revelaram um total de 123 miRNAs comuns entre as células eiPS e as células mesenquimais de tecido adiposo do grupo controle, e um miRNA (eca-miR-1), exclusivamente expresso nas células eAdMSC (Figura 33). O eca-miR-1 regula 72 genes relacionados a 8 vias sem correlação direta com mecanismos para aquisição e/ou manutenção de pluripotência (Apêndice F). Dentre os 124 miRNAs avaliados, 48 miRNAs detectados apresentaram expressão aumentada nas células eAdMSC controle, quando comparadas as células eiPS (Figura 34). Análises destes 48 miRNAs predizem que eles estejam envolvidos na regulação de 68 vias (Apêndice G).

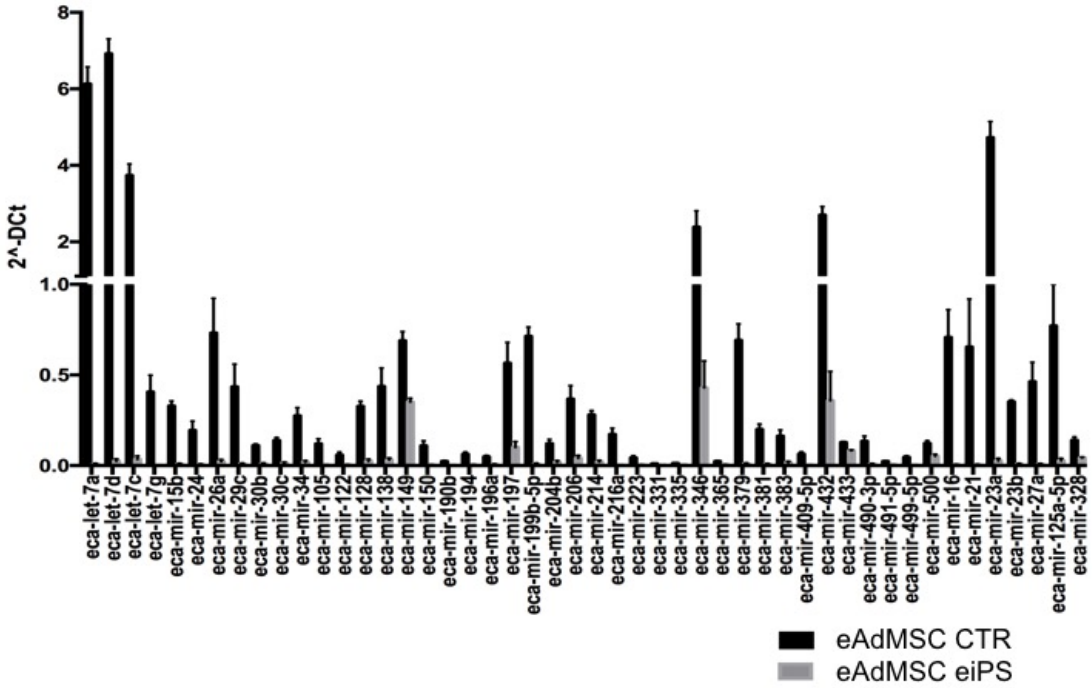
Entre estas vias, foram identificados 119 alvos pertencentes a vias reguladoras de pluripotência em células tronco (Anexo A). Como esperado, miRNAs de expressão aumentada nas células do grupo controle regulam genes como *SOX2*, *NANOG*, *POU5F* assim como de resposta das células eiPS como, *PCGF2*, *FGF2*, *TGF3*, *SKIL*, *REST*, *KAT6A*, *LEFTY2*, *PAX6*, *HOXB1*, *HAND1*, *NEUROG1* e *ISL1*. Esta expressão diminuída destes 48 miRNAs nas células eiPS derivadas de eAdMSC indicam que houve uma diminuição no controle da expressão dos fatores de pluripotência, sugerindo um processo de reprogramação eficiente. Entretanto, a família miR-302 não está diferentemente expressa na linhagem eiPS-eAdMSC, como nas demais linhagens de eiPS estudadas. Como mostra a figura 35, tais miRNAs estão expressos neste grupo, porém existe uma variação entre as linhagens, que provavelmente fez com que não houvesse diferenças estatísticas.

Figura 33 - Diagrama de Venn mostrando os miRNAs expressos em cada grupo



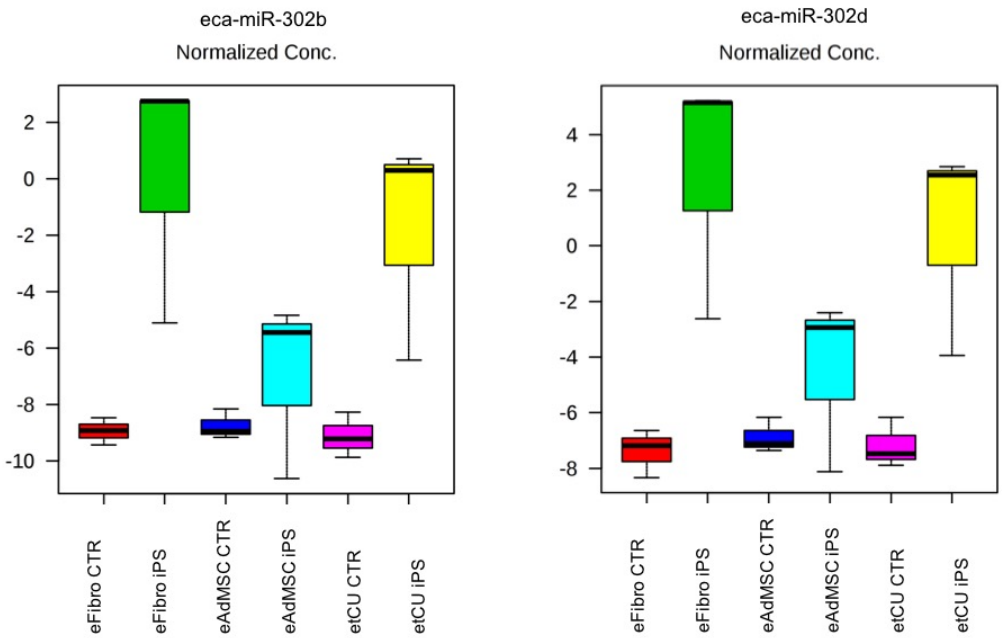
Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: MiRNAs expressos exclusivamente em cada grupo das células controle e eiPS-eAdMSC.

Figura 34 - Análise do perfil de miRNA das células eiPS eAdMSC e controle



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Níveis de expressão dos miRNA diferentemente expressos entre as células eiPS e as células mesenquimais de tecido adiposo controle.

Figura 35 - Níveis de expressão da família eca-miR-302 nas eiPS e controle



Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: Expressão dos miRNAs associados a manutenção da pluripotência da família miR-302. É possível notar a expressão dos miRNAs desta família em todas as células eiPS, apesar da mesma não ser significativa estatisticamente nas células eiPS-eAdMSC.

3.4.3 Discussão

As células iPS equinas já foram produzidas por alguns grupos (NAGY et al., 2011; KHODADADI et al., 2012; BRETON et al., 2013; SHARMA et al., 2014 WHITWORTH et al., 2014; LEE et al., 2016 no prelo)[6], seguindo diferentes metodologias a partir de fibroblastos equinos derivados de fetos, de animais jovens e adultos, a partir de queratinócitos e de células mesenquimais de tecido adiposo.

Como descrito anteriormente, células eiPS foram produzidas a partir de fibroblastos fetais por Nagy et al. (2011), com um sistema de *PiggyBac-transposon* associado à tetraciclina. Fibroblastos de equinos adultos foram induzidos a eiPS por Khodadadi et al. (2012), através da transdução retroviral dos fatores OCT4, KLF4 e SOX2 humanos, dispensando assim o uso de c-MYC. Ainda usando fibroblastos de equinos adultos e os fatores hOSKM, Whitworth et al. (2014), produziram eiPS dependentes de LIF. Enquanto Breton et al. (2013) obtiveram sucesso na produção

[6] LEE, E. M.; KIM, A.Y.; LEE, E. J.; PARK, J. K.; PARK, S. I.; CHO, S. G.; KIM, H. K.; KIM, S. Y.; JEONG, K. S. Generation of equine induced pluripotent stem cells and analysis of their therapeutic potential for muscle injuries. **Cell Transplantation**, 2016. (no prelo)

de eiPS a partir de fibroblastos de potros e vetores virais contendo os fatores OSKM murinos e mais tarde, o mesmo grupo produziu, com o mesmo sistema, eiPS a partir de queratinócitos (SHARMA et al., 2014). Recentemente, Lee et al. (2016 no prelo)[7] produziu eiPS a partir de células mesenquimais de tecido adiposo de um cavalo jovem, usando um vetor lentiviral induzível TetO contendo os fatores de reprogramação mOSKM. Todas as linhagens descritas acima são dependentes de suplementação com LIF.

Primeiramente nosso grupo obteve sucesso na produção de células iPS equinas a partir de células mesenquimais de tecido adiposo, por meio da introdução dos fatores OCT4, SOX2, KLF4 e c-MYC humanos através de vetores lentivirais policistrônicos excisáveis STEMCCA (SOMMER et al., 2009), cultiváveis em MEFs ou matrigel e independentes de suplementação com LIF, 2i ou a combinação de ambos, sendo dependentes unicamente de bFGF (BRESSAN, 2013). Neste trabalho, fomos capazes de aplicar a mesma técnica em células de outras fontes, como mesenquimais de tecido de cordão umbilical e fibroblastos adultos, e a partir dos fatores OSKM murinos introduzidos em células mesenquimais derivadas de tecido adiposo (Tabela 2). As células eiPS produzidas neste estudo são morfologicamente mais semelhantes às células iPS humanas.

Entre as linhagens de células iPS produzidas, as derivadas de células de tecido de cordão umbilical foram as que mais rapidamente apresentaram colônias, as primeiras, 11 dias após a infecção com hOSKM, as eiPS derivadas de tecido adiposo apresentaram colônias 13 dias depois da infecção e as colônias derivadas de fibroblastos surgiram 15 dias após a infecção.

O comportamento diferenciado entre linhagens celulares reprogramadas era esperado, uma vez que já foi demonstrado que mesmo após a reprogramação, as células iPS mantém uma “memória epigenética residual” que pode afetar sua capacidade de reprogramação e diferenciação (KIM et al., 2010). Miura et al. (2009) também relataram que as linhagens utilizadas para produção de células iPS de camundongo também influenciam a capacidade de formação de teratomas. Estes dados nos levaram a crer que as diferentes linhagens deste projeto estão sujeitas a esse tipo de efeito. Uma vez que as células mesenquimais de tecido adiposo e de

---

[7] LEE, E. J.; PARK, J. K.; PARK, S. I.; CHO, S. G.; KIM, H. K.; KIM, S. Y.; JEONG, K. S. Generation of equine induced pluripotent stem cells and analysis of their therapeutic potential for muscle injuries. **Cell Transplantation**, 2016. (no prelo)

cordão umbilical são menos diferenciadas que os fibroblastos (HACKETT et al., 2012), esperávamos que as mesmas fossem reprogramadas com maior eficiência. Ainda, existem relatos de que fibroblastos humanos apresentam baixa eficiência de reprogramação resultando em uma formação de colônias tardia quando comparada a outros tipos celulares (RAAB et al., 2014) e o mesmo foi confirmado por Sharma et al. (2014) que obtiveram maior eficiência na produção de eiPS a partir de queratinócitos do que de fibroblastos.

Quanto à resposta das linhagens celulares em relação ao processo de reprogramação induzida a partir dos fatores hOSKM e mOSKM após 15 e 20 dias de cultivo, foram observados diferentes comportamentos entre as linhagens e fatores de reprogramação. Não houve formação de colônias no D15 quando utilizamos os fatores murinos. Entretanto, quando usados os fatores humanos a linhagem de células derivadas de eAdMSC apresentou o maior número de colônias, seguido pelas células derivadas de etCU e, por último, as células eiPS derivadas de fibroblastos.

Este resultado foi repetido no D20, quando pudemos observar que as células eiPS derivadas de eAdMSC apresentaram maior número de colônias, seguidas pelas células eiPS derivadas de etCU e novamente, com o menor número de colônias, as eiPS derivadas de fibroblastos ($P<0.05$).

Em relação a comparação entre todas as linhagens para os sistemas de indução humano e murino, encontramos diferenças entre todas as linhagens ($P<0.05$). Era esperada uma eficiência superior do hOSKM aos fatores mOSKM, uma vez que fatores equinos são mais similares aos fatores humanos do que os fatores murinos. Entretanto, quando comparamos fatores de transcrição hOSKM e mOSKM com os bovinos, notamos que a maior similaridade também é entre os fatores bovinos e hOSKM, porém, em nosso laboratório, a produção das iPS bovinas foi possível somente a partir de mOSKM (BRESSAN, 2013). Neste contexto, é importante ressaltar que a similaridade pode não ser o fator principal que acarreta uma reprogramação adequada, por outro lado, estudos específicos sobre a interação destes fatores de transcrição e seus alvos nas diferentes espécies ainda são necessários. Também é importante ressaltar que a baixa eficiência de reprogramação relacionada aos fatores de reprogramação murinos pode estar associada à ausência de suplementação com LIF, presente nos demais trabalhos que utilizaram com sucesso este sistema de indução a pluripotência.

Em células embrionárias e iPS humanas, o fator de crescimento de fibroblasto (bFGF ou FGF2) é essencial para a manutenção do fenótipo de indiferenciação (DING et al., 2010) através da ativação, via receptores de FGF (FGFR) das vias MAPK, MEK, ERK e PI3K, sendo importante para manutenção da autorrenovação nestas células (ONUMA et al., 2015). Já em camundongos, é sabido que a função do FGF é antagônica a função exercida em humanos, uma vez que foi mostrado que FGF é necessário para que as células embrionárias saiam do estado de autorrenovação e comecem a se diferenciar (KUNATH et al., 2007) e que a inibição da via do FGF melhora a eficiência das células tronco embrionárias murinas (LANNER; ROSSANT, 2010).

Sabe-se que o LIF é essencial a manutenção da capacidade de autorrenovação e indiferenciação de células tronco embrionárias murinas em cultivo *in vitro,* sem monocamada de fibroblastos (SMITH et al., 1988; WILLIAMS et al., 1988; NIWA et al., 1998). Também já se sabe que LIF é necessário para a obtenção e manutenção de células iPS murinas (XU et al., 2010). O LIF, assim como os demais membros de sua família (*Interleukin-6 cytokine)* ativam fatores de transcrição (STAT3) que são conhecidos por exercer papel importante na proliferação de células tronco (ONISHI; ZANDSTRA, 2015). O mesmo já não pode ser dito para células tronco embrionárias humanas, já que o LIF não é capaz de manter seu estado de indiferenciação, devido a baixa expressão do receptor de LIF (DAHÉRON et al., 2004; WEI et al., 2005).

Quanto à falha na indução à pluripotência das células derivadas de medula óssea, existem relatos na literatura que mostram que a eficiência de reprogramação à pluripotência em células humanas, assim como a manutenção desta pluripotência e da autorrenovação destas células, está diretamente relacionada a altas taxas de proliferação celular, e que há um aumento da taxa de reprogramação quando há estimulo desta proliferação (RUIZ et al., 2011). Sendo assim, considerando que as células mesenquimais de medula óssea apresentaram a menor taxa de proliferação entre os tipos celulares analisados neste estudo, este pode ser um dos fatores que geraram a ineficiência de reprogramação das células eMO.

Todas as linhagens de células eiPS testadas foram positivas para expressão de fosfatase alcalina, para produção de corpos embrióides, detecção imunológica de OCT4, e as células eiPS derivadas de fibroblastos e de células mesenquimais de tecido adiposo foram positivas para detecção de NANOG e TRA1-61. Algumas

células eiPS-eFibro e as colônias eiPS-eAdMSC foram positivas para detecção de TRA1-81. As linhagens foram negativas para detecção de SSEA4 e as células eiPS-eFibro foram negativas para detecção de SSEA1, enquanto as eiPS-eAdMSC foram positivas. Os resultados encontrados não corroboram completamente com o observado na literatura para as demais células eiPS, uma vez que as células eiPS se apresentam positivas para estes marcadores (NAGY et al., 2011; KHODADADI et al., 2012; BRETON et al., 2013; SHARMA et al., 2014 WHITWORTH et al., 2014; LEE et al., 2016 no prelo)[8]. Novos testes serão realizados para confirmar os resultados, entretanto, este pode ser um sinal de que as células eiPS-eFibro foram apenas parcialmente reprogramadas.

Foi analisada a presença de transcritos para os genes NANOG e OCT4 em células eAdMSC, etCU e eFibro antes e após a indução a pluripotência. Esteves et al. (2014) mostraram após análise de expressão gênica de variados tecidos equinos (embriões em fase inicial, células eiPS, tecido de testículo, células mesenquimais de medula óssea, tecido adiposo e queratinócitos), que os únicos marcadores exclusivos de pluripotência para equinos são LIN28A, TRET e REX1. Os demais genes analisados no trabalho (OCT4, NANOG, SOX2, DNMT3B) apresentam variados níveis de expressão nos tecidos analisados: queratinócitos não expressam NANOG e OCT4; tecido adiposo e de medula óssea não apresentam SOX2 e todos os tecidos analisados possuem expressão de DNMT3B. Lee et al. (2016 no prelo)[9], também encontraram baixa expressão de OCT4, SOX2, NANOG, LIN28 e REX1 em células mesenquimais de tecido adiposo equinas antes da indução a pluripotência. A expressão de NANOG também foi detectada em humanos, em diferentes tipos celulares diferenciados, sugerindo que baixos níveis de expressão de NANOG sejam necessários para a manutenção da função celular, mesmo em células já diferenciadas (AMBADY et al., 2010). Esses resultados corroboram com os encontrados em nosso estudo, uma vez que os grupos pré indução a pluripotência apresentaram expressão baixa de NANOG. Todas as linhagens de eiPS apresentaram alta expressão dos dois marcadores de pluripotência analisados, quando comparadas à expressão das células pré indução, como o encontrado pelos demais grupos de pesquisa que desenvolveram células iPS equinas (NAGY et al.,

---

[8, 9] LEE, E. J.; PARK, J. K.; PARK, S. I.; CHO, S. G.; KIM, H. K.; KIM, S. Y.; JEONG, K. S. Generation of equine induced pluripotent stem cells and analysis of their therapeutic potential for muscle injuries. **Cell Transplantation**, 2016. (no prelo)

2011; KHODADADI et al., 2012; BRETON et al., 2013; SHARMA et al., 2014 WHITWORTH et al., 2014; LEE et al., 2016 no prelo)[10].

Os miRNAs são pequenas sequências de RNA não-codificante, altamente preservados entre as espécies que possuem papel importante na regulação da expressão gênica, seja por clivagem, por repressão translacional ou por sequestro do mRNA, dependendo do grau de complementariedade entre as sequências (BARTEL, 2004; VALENCIA-SANCHEZ et al., 2006; SANDMAIER; TELUGO, 2015), controlando mais de 33% dos genes codificadores de proteínas humanos, em nível pós-transcricional (BENTWICH et al., 2005). Têm importante papel na manutenção de uma célula, controlando funções essenciais como proliferação e morte, podendo ainda atuar como oncogenes, como supressores de tumor ou ainda como ambos (LEE; DUTTA, 2009; ROMANO et al., 2012; SANDMAIER; TELUGO, 2015). O perfil de miRNAs de células iPS já foi analisado em outras espécies como humanos (WILSON et al., 2009; RAZAK et al., 2013; SHARMA; WU, 2013; GREENE et al., 2014; WANG et al., 2015), murinos (PORCIUNCULA et al., 2013) e suínos (ZHANG et al., 2016).

Uma vez que existem indicações de que eles possuem papel na manutenção da pluripotência em células tronco embrionárias (HOUBAVIY et al., 2003), já foram utilizados em associação aos fatores de reprogramação OCT4, SOX2 e KLF4 para melhorar a eficiência de produção de células iPS murinas (JUDSON et al., 2009; WANG et al., 2013) e até mesmo gerar células iPS humanas e de camundongos, sem os demais fatores de reprogramação (LIN et al., 2008; ANOKYE-DANSO et al., 2012).

Considerando que miRNAs são expressos de uma maneira tecido-específica (LEE; DUTTA, 2009), analisamos o perfil de miRNAs nas diferentes linhagens de células eiPS produzidas para tentar compreender mais a fundo o processo de reprogramação celular. Nossas análises mostraram alguns miRNAs com a expressão alterada que foram brevemente descritos a seguir, assim como alguns dos miRNAs intimamente relacionados aos genes envolvidos no processo de reprogramação celular, listados na tabela 4.

---

[10] LEE, E. J.; PARK, J. K.; PARK, S. I.; CHO, S. G.; KIM, H. K.; KIM, S. Y.; JEONG, K. S. Generation of equine induced pluripotent stem cells and analysis of their therapeutic potential for muscle injuries. **Cell Transplantation**, 2016. (no prelo)

Tabela 4 - Lista dos miRNAs relacionados a regulação dos genes envolvidos no processo reprogramação à pluripotência em humanos

OCT4	NANOG	SOX2
miR-34**a-**5**p**	**miR-**34**a-**5**p**	**miR-**21-5**p**
miR-128-3**p**	**miR-**34**b-**3**p**	**miR-**34**a-**5**p**
miR-145-5p	**miR-**128-3**p**	**miR-**34**b-**5**p**
miR-355-5p	miR-134-5p	**miR-**34**c-**5**p**
	miR-145-5p	**miR-**122-5**p**
	miR-181-3p	miR-126-3p
	miR-302**a-**3**p**	**miR-**128-3**p**
	miR-320a	miR-140-5p
		miR-145-5p
		miR-340-5p
		miR-429
		miR-522-3p
		miR-625-5p
		miR-638
		miR-1181

Fonte: (PESSÔA, L. V. F., 2016)
Legenda: MiRNAs relacionados a regulação dos genes envolvidos no processo de indução a pluripotência, destacados em negrito os que são diferentemente expressos nas células analisadas neste estudo.

Sabe-se que alguns grupos de miRNAs, como miR-302 e miR-209 são essenciais para processos celulares-chave em células tronco embrionárias, como conservação da pluripotência, diferenciação e proliferação celular (BAR et al., 2008; MORIN et al., 2008; BARROSO-DEL JESUS et al., 2009; STADLER et al., 2010; MATHIEU; RUOHOLA-BAKER., 2013). A família miR-302-367 é conhecida por atuar no retardamento do processo de diferenciação celular e, consequentemente, na manutenção da pluripotência em células tronco embrionárias humanas (BARROSO-DEL JESUS et al., 2011) e é sabidamente a família mais abundante em células iPS e tronco embrionárias humanas (LIN et al., 2008; WILSON et al., 2009; KUO et al., 2012) por atuarem regulando os níveis de tradicionais marcadores de pluripotência, como OCT4, SSEA3/3, SOX2 e NANOG (SANDMAIER; TELUGO, 2015).

O grupo miR-209 foi relacionado à transferência celular da fase G1 para a fase S, consequentemente promovendo proliferação celular em células tronco embrionárias (WANG et al., 2008). Além disso, existem indícios de que esta família previna a diferenciação de CTE murinas *in vitro*, através do controle da via Dkk-1, que inibe a via Wnt (ZOVOILIS et al., 2009). O miR-432 é um supressor de tumor que regula vários pontos da cascata de sinalização Wnt/β-catenina, controlando a proliferação, crescimento e sobrevivência celular (JIANG et al., 2015).

A família de miRNA let-7 é conhecida por ser uma das primeiras famílias miRNAs identificadas e mais intensamente estudados em humanos, é um grupo de miRNAs pró-diferenciação e alterações na sua expressão estão associadas a canceres agressivos (ROUSH; SLACK, 2008; SU et al., 2012; PORCIUNCULA et al., 2013). A família miR-17/92 é conhecida por estar associada a uma variedade de tipos de câncer, uma vez que é importante para proliferação, apoptose e ciclo celular (MOGILYANSKY; RIGOUTSOS, 2013). Assim como o oncomir miR-494, que apresenta uma relação inversa com a proteína BIM, que atua promovendo a apoptose de células cancerosas (ROMANO et al., 2012), além dos miRNAs miR-23 a-3p, miR-23 b-3p e miR-149-5p, que regulam a expressão das proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (DP5 e PUMA – GRIECO et al., 2016 no prelo)[11], o oncomir miR-197, que foi associado a câncer de pulmão (FIORI et al., 2014) e o oncomir miR-21 é intimamente associado a glioblastomas (CIAFRÉ et al., 2005).

Variados miRNAs apresentam funções supressoras de tumor, como a família miR-29 é conhecida por suas funções pró-apoptóticas (KRIEGEL et al., 2012), o miR-486 é um supressor de tumor, cujo aumento de expressão leva a diminuição da proliferação celular, apoptose e paralização do ciclo celular (PENG et al., 2013) assim como a família miR-99, que é composta por miR-99 a, miR-99 b e miR-100, em variados tipos de câncer em humanos (SUN et al., 2011; ZHANGa et al., 2016), o grupo miR-15/16, regula variados oncogenes (AQEILAN; CALIN; CROCE, 2010), o miR-199b-5p regula a expressão de proteínas associadas a leucemia mieloide aguda (FAVREAU; CROSS; SATHYANARAYANA, 2012), a família miR-379/miR 656, miR-122, miR-128-3p e miR-145-5p, que tem sua expressão diminuída em variados tipos de câncer em humanos (LADDHA et al.,

[11] GRIECO, F. A.; SEBASTIANI, G.; JUAN-MATEU, J.; VILLATE, O.; MARROQUI, L.; LADRIÈRE, L.; TUGAY, K.; REGAZZI, R.; BUGLIANI, M.; MARCHETTI, P.; DOTTA, F.; EIZIRIK, D. L. MicroRNAs miR-23a-3p, miR-23b-3p and miR-149-5p **regulate the expression of pro-apoptotic BH3-Only proteins DP5 and PUMA in human pancreatic beta cells**. **Diabetes,** Oct. 2016. (no prelo)

2013; DONZELLI et al., 2015; ERGÜN et al., 2015; HUANG et al., 2015) e a família miR-34, que controla proliferação, migração e invasão celular, além de reprimir metástases em variados tipos de câncer (ROKAVEC et al., 2014).

Já os miRNAs miR-26, miR-27 a-3p e miR-125 podem apresentar função oncogênica ou supressora de tumor, dependendo do tipo de tumor (GAO; LIU, 2011; SUN; LIN; CHEN, 2013; ZHAO et al., 2016). Os miR-21-5p, miR-346 e miR-138 foram descritos em células de câncer de cérvix em humanos. Foi descoberto que eles apresentam funções antagônicas: os primeiros promovem a proliferação em células cancerosas enquanto o último funciona como um supressor tumoral (HAN et al., 2015; SONG et al., 2015).

Wilson et al. (2009) e Sharma e Wu (2013), compararam CTE, iPS e fibroblastos humanos e encontraram nas células iPS e CTEs aumento dos miRNAs da família miR-302/367 e miR-92, enquanto os miRNAs miR-23, miR-27, miR-30 e a família let-7 estavam aumentados nos fibroblastos controle. Expressões semelhantes foram encontradas nas células eiPS estudadas neste trabalho e em seus respectivos controles.

Já Zhang et al. (2016) compararam fibroblastos e células iPS suínas, encontrando expressão aumentada, entre outros miRNAs, de miR-21, miR-23 e miR-206 em fibroblastos suínos, assim como os resultados encontrados em nossas células controle. Ainda, notaram que as células iPS suínas que apresentavam maior expressão da família miR-302, apresentavam maior eficiência de reprogramação.

Porciuncula et al. (2013) observaram em células iPS murinas produzidas a partir de fibroblastos, níveis elevados dos grupos de miRNAs miR-290/295 e miR-302/367, acompanhada da baixa expressão da família let-7, que se apresentou alta nos fibroblastos controle, assim como as famílias miR-10/100 e miR-196, associadas a tecidos diferenciados.

As análises de perfil de miRNA das células estudadas neste trabalho (Figura 27) mostram uma segregação entre as células iPS geradas a partir de eAdMSC, a linhagem de células iPS geradas de fibroblasto (eiPSe-Fibro 3) e a linhagem de iPS gerada a partir de etCU (eiPS-etCU 2), quando comparada as demais linhagens de iPS e células dos grupos controle (Figura 28). Esses resultados vão de encontro às observações feitas durante o cultivo e caracterização destas células. As linhagens de eiPS derivadas de eAdMSC foram as que melhor responderam ao processo de reprogramação. Já as células eiPS derivadas de cordão umbilical e fibroblasto que

ficaram agrupadas com as células eiPS-eAdMSC foram as que apresentaram maior eficiência de formação de corpos embrióides em seus respectivos grupos, o que é um forte indicio de reprogramação. Este pode ser um sinal de que as células eiPS agrupadas com as células controle estejam apenas parcialmente reprogramadas ou que suas colônias apresentem níveis de reprogramação mais heterogêneos que as demais linhagens.

Também podemos notar a presença de miRNAs que regulam genes relacionados a pluripotência nas células após indução (Figuras 29, 31 e 34). É interessante observar que os miRNAs da família miR-302/367 estão aumentados nas células iPS derivadas de fibroblastos e tecido de cordão umbilical, porém não nas células iPS derivadas de tecido adiposo. Esta provavelmente é uma consequência da grande variação apresentada pelas células eiPSe-AdMSC, como é possível observar na figura 35. Enquanto que os miRNAs miR-21, miR-122, miR-128 e da família miR-34, todos reguladores de expressão dos genes OCT4, NANOG e SOX2 (Tabela 4), estão aumentados nas células mesenquimais de tecido adiposo controle, diferentemente do encontrado nas células eiPS-eAdMSC derivadas deste mesmo tipo celular. Este resultado condiz com o encontrado por Porciuncula et al. (2013) em células de camundongo, o que denota o processo de reprogramação pelo qual as células induzidas a pluripotência foram submetidas. Também é possível observar nas células dos grupos controles aumento dos miRNAs miR-23, miR-27 e a família let-7, exatamente como observado por Wilson et al. (2009) em suas células diferenciadas, e a diminuição destes miRNAs nas células eiPS é um indício da reprogramação. A família let-7 é considerada um grupo de miRNAs pró-diferenciação e também foi observado nos fibroblastos estudados por Porciuncula et al. (2013).

É importante ressaltar que os miRNAs não só são relevantes para a regulação da reprogramação e manutenção da pluripotência, como podem apresentar padrões de expressão variados, de acordo com diferentes estados de pluripotência (ZHANG et al., 2016).

3.5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Podemos concluir que é possível produzir células eiPS a partir de células equinas derivadas de tecido adiposo, tecido de cordão umbilical e fibroblastos, usando um sistema baseado em fatores de transcrição interespecíficos relacionados à pluripotência, e que a utilização dos fatores humanos gera maior eficiência em comparação aos fatores murinos.

A utilização de células mesenquimais de tecido adiposo para indução à pluripotência apresentou maior eficiência quando comparada as taxas de geração de células eiPS a partir de células mesenquimais de tecido de cordão umbilical e fibroblastos. As células eiPS-eAdMSC ainda apresentaram detecção do maior número de marcadores de pluripotência. Não foi possível induzir as células de medula óssea à reprogramação celular utilizando o sistema padronizado em nosso laboratório. Estes resultados corroboram com a hipótese que a deferentes tipos celulares podem responder de maneira distinta ao processo de reprogramação, afetando a pluripotencialidade das células iPS geradas.

Concluímos a partir da análise dos perfis de miRNAS das células induzidas à pluripotência que as células eiPS-eAdMSC apresentam um perfil de miRNAs mais homogêneo que as células eiPS-eFibro e eiPS-etCU, o que sugere uma reprogramação heterogênea nas linhagens de eiPS estudadas neste trabalho.

Ainda, no nosso conhecimento, este é o primeiro relato de produção de células eiPS unicamente dependentes de bFGF, sem necessidade de suplementação com LIF.

REFERÊNCIAS

AMBADY, S.; MALCUIT, C.; KASHPUR, O.; KOLE, D.; HOLMES, W.F.; HEDBLOM, E.; PAGE, R.L.; DOMINKO, T. Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated anddifferentiated human cells. **International Journal of Developmental Biology**. v. 54, n. 11-12, p. 1743-54, 2010.

ANOKYE-DANSO, F.; TRIVEDI, C. M.; JUHR, D.; GUPTA, M.; CUI, Z.; TIAN, Y.; ZHANG, Y.; YANG, W.; GRUBER, P. J.; EPSTEIN, J. A.; MORRISEY, E. E. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 8, p. 376-88, April. 2011. Erratum in: **Cell Stem Cell**. v. 7, n. 11, p. 853, Dec. 2012.

AQEILAN, R. I.; CALIN, G. A.; CROCE, C. M. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. **Cell Death Differentiation**, v. 17, n. 2, p. 215-220, Feb. 2010.

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 Res**, v. 21, n. 4, p. 600-608, 2011.

BAR, M.; WYMAN, S. K.; FRITZ, B. R.; QI, J.; GARG, K. S.; PARKIN, R. K.; KROH, E. M.; BENDORAITE, A.; MITCHELL, P. S.; NELSON, A. M.; RUZZO, W. L.; WARE, C.; RADICH, J. P.; GENTLEMAN, R.; RUOHOLA-BAKER, H.; TEWARI, M. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. **Stem Cells**, v. 26, n. 10, p. 2496–2505, 2008.

BARROSO-DEL JESUS, A.; LUCENA-AGUILAR, G.; MENENDEZ, P. The miR-302-367 cluster as a potential stemness regulator in ESCs. **Cell Cycle,** v. 8, n. 3, p. 394–398, 2009.

BARROSO-DEL JESUS, A.; LUCENA-AGUILAR, G.; SANCHEZ, L.; LIGERO, G.; GUTIERREZ-ARANDA, I.; MENENDEZ, P. The Nodal inhibitor Lefty is negatively modulated by the microRNA miR-302 in human embryonic stem cells. **FASEB Journal**, v. 25, n. 5, p. 1497-1508, May. 2011.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell,** v. 116, n. 2, p. 281-297, Jan. 2004.

BENTWICH, I.; AVNIEL, A.; KAROV, Y.; AHARONOV, R.; GILAD, S.; BARAD, O.; BARZILAI, A.; EINAT, P.; EINAV, U.; MEIRI, E.; SHARON, E.; SPECTOR, Y.; BENTWICH, Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. **Nature Genetics,** v. 37, n. 7, p. 766-770, Jul. 2005.

BEISEL, C.; PARO, R. Dissection of gene regulatory networks in embryonic stem cells by means of high-throughput sequencing. **Biol Chem**, v. 390, n. 11, p. 1139-1144, 2009.

BOYER, L. A.; LEE, T. I.; COLE, M. F.; JOHNSTONE, S. E.; LEVINE, S. S.; ZUCKER, J. P.; GUENTHER, M. G.; KUMAR, R. M.; MURRAY, H. L.; JENNER, R. G.; GIFFORD, D. K.; MELTON, D. A.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947-956, 2005.

BRESSAN, F. F. Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência. 2013. 134 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

BRETON, A.; SHARMA, R.; DIAZ, A. C.; PARHAM, A. G.; GRAHAM, A.; NEIL, C.; WHITELAW, C. B.; MILNE, E.; DONADEU, F. X. Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. **Stem Cells and Development,** v. 22, n. 4, p. 611-621, Feb. 2013.

CIAFRÈ, S. A.; GALARDI, S.; MANGIOLA, A.; FERRACIN, M.; LIU, C. G.; SABATINO, G.; NEGRINI, M.; MAIRA, G.; CROCE, C. M.; FARACE, M. G. Extensive modulation of a set of microRNAs inprimary glioblastoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 4, p. 1351-1358, Sep. 2005.

DAHÉRON, L.; OPITZ, S. L.; ZAEHRES, H.; LENSCH, M. W.; ANDREWS, P. W.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; DALEY, G. Q. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. **Stem Cells,** v. 22, n. 5, p. 770-778., 2004.

CHANG, M. Y.; KIM, D.; KIM, C. H.; KANG, H. C.; YANG, E.; MOON, J. I.; KO, S.; PARK, J.; PARK, K. S.; LEE, K. A.; HWANG, D. Y.; CHUNG, Y.; LANZA, R.; KIM, K. S. Direct reprogramming of rat neural precursor cells and fibroblasts into pluripotent stem cells. **PLoS One,** v. 5, n. 3, p. e9838, Mar. 2010.

CHEN, L.; DALEY, G. Q. Molecular basis of pluripotency. **Human Molecular Genetics**, v. 17, n. R1, p. R23-27, 2008.

DING, V. M.; LING, L.; NATARAJAN, S.; YAP, M. G.; COOL, S. M.; CHOO, A. B. FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3beta signaling. **Journal Cell Physiology,** v. 225, n. 2, p. 417-428, Nov. 2010.

DONZELLI, S.; MORI, F.; BELLISSIMO, T.; SACCONI, A.; CASINI, B.; FRIXA, T.; ROSCILLI, G.; AURISICCHIO, L.; FACCIOLO, F.; POMPILI, A.; CAROSI, M. A.; PESCARMONA, E.; SEGATTO, O.; POND, G.; MUTI, P.; TELERA, S.; STRANO, S.; YARDEN, Y.; BLANDINO, G. Epigenetic silencing of miR-145-5p contributes to brain metastasis. **Oncotarget,** v. 6, n. 34, p. 35183-201, Nov. 2015.

ERGÜN, S.; ULASLI, M.; IGCI, Y. Z.; IGCI, M.; KIRKBES, S.; BORAZAN, E.; BALIK, A.; YUMRUTAŞ, Ö.; CAMCI, C.; CAKMAK, E. A.; ARSLAN, A.; OZTUZCU, S. The association of the expression of miR-122-5p and its target ADAM10 with human breast cancer. **Molecular Biology Reports,** v. 42, n. 2, p. 497-505, Feb. 2015.

ESTEVES, C. L.; SHARMA, R.; DAWSON, L.; TAYLOR, S. E.; PEARSON, G.; KEEN, J. A.; MCDONALD, K.; AURICH, C.; DONADEU, F. X. Expression of putative markers of pluripotency in equine embryonic and adult tissues. **Veterinary Journal,** v. 202, n. 3, p. 533-535, Dec. 2014.

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 Biological Chemistry**, v. 284, n. 26, p. 17634-17640, 2009.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature,** v. 292, p. 154-156, 1981.

FAVREAU, A. J.; CROSS, E. L.; SATHYANARAYANA, P. miR-199b-5p directly targets PODXL and DDR1 and decreased levels of miR-199b-5p correlate with elevated expressions ofPODXL and DDR1 in acute myeloid leukemia. **American Journal of Hematology,** v. 87, n. 4, p. 442-6, Apr. 2012.

FIORI, M.E.; BARBINI, C.; HAAS, T.L.; MARRONCELLI, N.; PATRIZII, M.; BIFFONI, M.; DE MARIA, R. Antitumor effect of miR-197 targeting in p53 wild-type lung cancer. **Cell Death Differentiation.** v. 21, n. 5, p. 774-82, May. 2014.

GAO, J.; LIU, Q. G. The role of miR-26 in tumors and normal tissues (Review). **Oncology Letters,** v. 2, n. 6, p. 1019-1023, Nov. 2011.

GREENE, W. A.; MUÑIZ, A.; PLAMPER, M. L.; KAINI, R. R.; WANG, H. C. MicroRNA expression profiles of human iPS cells, retinal pigment epithelium derived from iPS, andfetal retinal pigment epithelium. **Journal of Visualized Experiments,** v. 24, n. 88, p. e51589, Jun. 2014.

HACKETT, C. H.; GREVE, L.; NOVAKOFSKI, K. D.; FORTIER, L. A. Comparison of gene-specific DNA methylation patterns in equine induced pluripotent stem cell lines with cells derived from equine adult and fetal tissues. **Stem Cells and Development,** v. 21, n. 10, p. 1803-1811, Jul. 2012.

HAN, J. W.; YOON, Y. S. Induced pluripotent stem cells: emerging techniques for nuclear reprogramming. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 7, p. 1799-1820, 2011.

HAN, Y.; XU, G.X.; LU, H.; YU, D.H.; REN, Y.; WANG, L.; HUANG, X.H.; HOU, W.J.; WEI, Z.H.; CHEN, Y.P.; CAO, Y.G.; ZHANG, R. Dysregulation of miRNA-21 and their potential as biomarkers for the diagnosis of cervical cancer. **International Journal Clinical Experimental Pathology,** v. 8, n. 6, p. 7131-9, Jun. 2015

HOUBAVIY, H.B.; MURRAY, M.F.; SHARP, P.A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. **Developmental Cell.** v. 5, n. 2, p. 351-8, Aug. 2003.

IVANOVA, N.; DOBRIN, R.; LU, R.; KOTENKO, I.; LEVORSE, J.; DECOSTE, C.; SCHAFER, X.; LUN, Y.; LEMISCHKA, I. R. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. **Nature**, v. 442, n. 7102, p. 533-538, 2006.

JIANG, N.; CHEN, W. J.; ZHANG, J. W.; XU, C.; ZENG, X. C.; ZHANG, T.; LI, Y.; WANG, G. Y. Downregulation of miR-432 activates Wnt/β-catenin signaling and promotes human hepatocellular carcinoma proliferation. **Oncotarget,** v. 6, n. 10, p. 7866-79, Apr. 2015.

JUDSON, R. L.; BABIARZ, J. E.; VENERE, M.; BLELLOCH, R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. **Nature Biotechnology,** v. 27, n. 5, p. 459-61, May. 2009

KIM, K.; DOI, A.; WEN, B.; NG, K.; ZHAO, R.; CAHAN, P.; KIM, J.; ARYEE, M. J.; JI, H.; EHRLICH, L. I.; YABUUCHI, A.; TAKEUCHI, A.; CUNNIFF, K. C.; HONGGUANG, H.; MCKINNEY-FREEMAN, S.; NAVEIRAS, O.; YOON, T. J.; IRIZARRY, R. A.; JUNG, N.; SEITA, J.; HANNA, J.; MURAKAMI, P.; JAENISCH, R.; WEISSLEDER, R.; ORKIN, S. H.; WEISSMAN, I. L.; FEINBERG, A. P.; DALEY, G. Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature,** v. 467, n. 7313, p. 285-90, Sep. 2010.

KHODADADI, K.; SUMER, H.; PASHAIASL, M.; LIM, S.; WILLIAMSON, M.; VERMA, P. J. Induction of pluripotency in adult equine fibroblasts without c-MYC. **Stem Cells**, v. 2012, p. 429160, Mar. 2012.

KOH, S.; PIEDRAHITA, J. A. Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from adult canine fibroblasts. **Methods in Molecular Biology,** v. 1330, p. 69-78, 2015.

KRIEGEL, A. J.; LIU, Y.; FANG, Y.; DING, X.; LIANG, M. The miR-29 family: genomics, cell biology, and relevance to renal and cardiovascular injury. **Physiological Genomics,** v. 44, n. 4, p. 237-44, Feb. 2012.

KUNATH, T.; SABA-EL-LEIL, M. K.; ALMOUSAILLEAKH, M.; WRAY, J.; MELOCHE, S.; SMITH, A. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. **Development**, v. 134, p. 2895-2902, 2007.

KUO, C. H.; DENG, J. H.; DENG, Q.; YING, S. Y. A novel role of miR-302/367 in reprogramming. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** v. 417, n. 1, p. 11-6, Jan. 2012.

LADDHA, S. V.; NAYAK, S.; PAUL, D.; REDDY, R.; SHARMA, C.; JHA, P.; HARIHARAN, M.; AGRAWAL, A.; CHOWDHURY, S.; SARKAR, C.; MUKHOPADHYAY, A. Genome-wide analysis revealsdownregulation of miR-379/miR-656 cluster in human cancers. **Biology Direct**, v. 8, p. 10, Apr. 2013.

LANNER, F.; ROSSANT, J. The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. **Development,** v. 137, n. 20, p. 3351-60, Oct. 2010.

LAURENT, L. C.; ULITSKY, I.; SLAVIN, I.; TRAN, H.; SCHORK, A.; MOREY, R.; LYNCH, C.; HARNESS, J. V.; LEE, S.; BARRERO, M. J.; KU, S.; MARTYNOVA, M.; SEMECHKIN, R.; GALAT, V.; GOTTESFELD, J.; IZPISUA BELMONTE, J. C.; MURRY, C.; KEIRSTEAD, H. S.; PARK, H. S.; SCHMIDT, U.; LASLETT, A. L.; MULLER, F. J.; NIEVERGELT, C. M.; SHAMIR, R.; LORING, J. F. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. **Cell Stem Cell**, v. 8, n. 1, p. 106-18, Jan. 2011.

LEE, Y. S.; DUTTA, A. MicroRNAs in câncer. **Annual Review of Pathology,** v. 4, p. 199–227, 2009.

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.; 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.

LIN, S. L.; CHANG, D. C.; CHANG-LIN, S.; LIN, C. H.; WU, D. T.; CHEN, D. T.; YING, S. Y. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. **RNA,** v. 14, n. 10, p. 2115-24, Oct. 2008.

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.

LIU, Z.; WAN, H.; WANG, E.; ZHAO, X.; DING, C.; ZHOU, S.; LI, T.; SHUAI, L.; FENG, C.; YU, Y.; ZHOU, Q.; BEAUJEAN, N. Induced pluripotent stem-induced cells show better constitutive heterochromatin remodeling and developmental potential after nuclear transfer than their parental cells. **Stem Cells Development**, v. 21, n. 16, p. 3001-3009, 2012.

MALAVER-ORTEGA, L. F.; TAHERI-GHAHFAROKHI, A.; SUMER, H. Inducing Pluripotency in Cattle. **Methods in Molecular Biology**, v. 1330, p. 57-68, 2015.

MANN, M. R.; BARTOLOMEI, M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. **Genome Biology**, v. 3, n. 2, p. 1-4, 2002. REVIEWS1003.

MAHERALI, N.; SRIDHARAN, R.; XIE, W.; UTIKAL, J.; EMINLI, S.; ARNOLD, K.; STADTFELD, M.; YACHECHKO, R.; TCHIEU, J.; JAENISCH, R.; PLATH, K.; HOCHEDLINGER, K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 55-70, 2007.

MATHIEU, J.; RUOHOLA-BAKER, H. Regulation of stem cell populations by microRNAs.**Advances in Experimental Medicine and Biology,** v. 786, p. 329–51, 2013.

MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MARUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell,** v. 113, n. 5, p. 631-42, May. 2003

MIURA, K.; OKADA, Y.; AOI, T.; OKADA, A.; TAKAHASHI, K.; OKITA, K.; NAKAGAWA, M.; KOYANAGI, M.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; OGAWA, D.; IKEDA, E.; OKANO, H.; YAMANAKA, S. Variation in thesafety of induced pluripotent stem cell lines. **Nature Biotechnology,** v. 27, n. 8, p. 743-5, Aug. 2009.

MOGILYANSKY, E.; RIGOUTSOS, I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. **Cell Death Differentiation,** v. 20, n. 12, p. 1603-14, Dec. 2013

MORIN, R. D.; O'CONNOR, M. D.; GRIFFITH, M.; KUCHENBAUER, F.; DELANEY, A.; PRABHU, A. L.; ZHAO, Y.; MCDONALD, H.; ZENG, T.; HIRST, M.; EAVES, C. J.; MARRA, M. A. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. **Genome Research,** v. 18, n. 4, p. 610–21, 2008.

MUNSIE, M. J.; MICHALSKA, A. E.; O'BRIEN, C. M.; TROUNSON, A. O.; PERA, M. F.; MOUNTFORD, P. S. Isolation of pluripotent embryonic stem cells from reprogrammed adult mouse somatic cell nuclei. **Current Biology**, v. 10, n. 16, p. 989-992, 2000.

NAFEE, T. M.; FARRELL, W. E.; CARROLL, W. D.; FRYER, A. A.; ISMAIL, K. M. Epigenetic control of fetal gene expression. **BJOG**, v. 115, n. 2, p. 158-168, 2008.

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.

NAKAGAWA, M.; KOYANAGI, M.; TANABE, K.; TAKAHASHI, K.; ICHISAKA, T.; AOI, T.; OKITA, K.; MOCHIDUKI, Y.; TAKIZAWA, N.; YAMANAKA, S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 101-106, 2008.

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHÖLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell,** v. 95, n. 3, p. 379-91, 1998.

NIWA, H.; BURDON, T.; CHAMBERS, I.; SMITH, A. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. **Genes Development**. v. 12, n. 13, p. 2048–60, 1998.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics,** v. 24, p. 372-376, 2000.

OHGANE, J.; YAGI, S.; SHIOTA, K. Epigenetics: the DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions in cells. **Placenta,** p. S29-35, Mar. 2008. Supplement.

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

ONISHI, K.; ZANDSTRA, P. W. LIF signaling in stem cells and development. **Development,** v. 142, n. 13, p. 2230-6, Jul. 2015.

ONUMA, Y.; HIGUCHI, K.; AIKI, Y.; SHU, Y.; ASADA, M.; ASASHIMA, M.; SUZUKI, M.; IMAMURA, T.; ITO, Y. A stable chimeric fibroblast growth factor (FGF) can successfully replace basic FGF in human pluripotent stem cell culture. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0118931, Apr. 2015.

PENG, Y.; DAI, Y.; HITCHCOCK, C.; YANG, X.; KASSIS, E.S.; LIU, L.; LUO, Z.; SUN, H.L.; CUI, R.; WEI, H.; KIM, T.; LEE, T. J.; JEON, Y. J.; NUOVO, G. J.; VOLINIA, S.; HE, Q.; YU, J.; NANA-SINKAM, P.; CROCE, C. M. Insulin growth factor signaling is regulated by microRNA-486, na underexpressed microRNA in lung cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 110, n. 37, p. 15043-8, Sep. 2013.

PORCIUNCULA, A.; ZAPATA, N.; GURUCEAGA, E.; AGIRRE, X.; BARAJAS, M.; PROSPER, F. MicroRNA signatures of iPSCs and endoderm-derived tissues. **Gene Expression Patterns**, v. 13, n. 1-2, p. 12-20, Jan-Feb. 2013.

RAAB, S.; KLINGENSTEIN, M.; LIEBAU, S.; LINTA, L. A Comparative View on Human Somatic Cell Sources for iPSC Generation. **Stem Cells International,** v. 2014, p. 768391, 2014.

RAZAK, S. R.; UENO, K.; TAKAYAMA, N.; NARIAI, N.; NAGASAKI, M.; SAITO, R.; KOSO, H.; LAI, C. Y.; MURAKAMI, M.; TSUJI, K.; MICHIUE, T.; NAKAUCHI, H.; OTSU, M.; WATANABE, S. Profiling ofmicroRNA in human and mouse ES and iPS cells reveals overlapping but distinct microRNA expression patterns. **PLoS One,** v. 8, n. 9, p. e73532, Sep. 2013.

ROKAVEC, M.; LI, H.; JIANG, L.; HERMEKING, H. The p53/miR-34 axis in development and disease. **Journal of Molecular Cell Biology,** v. 6, n. 3, p. 214-30,

Jun. 2014.

ROMANO, G.; ACUNZO, M.; GAROFALO, M.; DI LEVA, G.; CASCIONE, L.; ZANCA, C.; BOLON, B.; CONDORELLI, G.; CROCE, C.M. MiR-494 is regulated by ERK1/2 and modulates TRAIL-induced apoptosis in non-small-cell lung cancer through BIM down-regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 109, n. 41, p.1 6570-5, Oct. 2012.

ROSSANT, J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. **Stem Cells,** v. 19, n. 6, p. 477-82. 2001.

ROUSH, S.; SLACK, F. J. The let-7 family of microRNAs. **Trends in Cell Biology,** v. 18, n. 10, p. 505-516, Oct. 2008.

RUIZ, S.; PANOPOULOS, A. D.; HERRERÍAS, A.; BISSIG, K. D.; LUTZ, M.; BERGGREN, W. T.; VERMA, I. M.; IZPISUA BELMONTE, J. C. A high proliferation rate is required for cell reprogramming and maintenance of human embryonic stem cell identity. **Current Biology,** v. 21, n. 1, p. 45-52, Jan. 2011.

SANDMAIER, S. E.; TELUGU, B. P. MicroRNA-Mediated reprogramming of somatic cells into induced pluripotent stem cells. **Methods in Molecular Biology,** v. 1330, p. 29-36. 2015.

SHARMA, R.; LIVESEY, M. R.; WYLLIE, D. J.; PROUDFOOT, C.; WHITELAW, C. B.; HAY, D. C.; DONADEU, F. X. Generation of functional neurons from feeder-free, keratinocyte-derived equine induced pluripotent stem cells. **Stem Cells and Development,** v. 23, n. 13, p. 1524-1534, Jul. 2014.

SHARMA, A.; WU, J. C. MicroRNA expression profiling of human-induced pluripotent and embryonic stem cells. **Methods in Molecular Biology**, v. 936, p. 247-256, 2013.

SILVEIRA, J. C.; RAO, D. N.; VEERAMACHANENI, Q. A.; CARNEVALE, W. E. M.; BOUMA, G. J. Cell-Secreted Vesicles in Equine Ovarian Follicular Fluid Contain miRNAs and Proteins: A Possible New Form of Cell Communication Within the Ovarian Follicle. **Biology of Reproduction,** v. 86, n. 71, p. 1–10, 2012.

SMITH, A. G.; HEATH, J. K.; DONALDSON, D. D.; WONG, G. G.; MOREAU, J.; STAHL, M.; ROGERS, D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides**. Nature**, v. 336, n. 6200, p. 688–690, 1988.
SOMMER, C. A.; STADTFELD, M.; MURPHY, G. J.; HOCHEDLINGER ,K.; KOTTON, D. N.; MOSTOSLAVSKY, G. Induced pluripotent stem cell generation

using a single lentiviral stem cell cassette. **Stem Cells,** v. 27, n. 3, p. 543-549, Mar. 2009.

SONG, G.; WANG, R.; GUO, J.; LIU, X.; WANG, F.; QI, Y.; WAN, H.; LIU, M.; LI, X.; TANG, H. miR-346 and miR-138 competitively regulate hTERT in GRSF1- and AGO2-dependent manners, respectively. **Scientific Reports,** v. 28, n. 5, p. 15793, Oct. 2015.

STADLER, B.; IVANOVSKA, I.; MEHTA, K.; SONG, S.; NELSON, A.; TAN, Y.; MATHIEU, J.; DARBY, C.; BLAU, C. A.; WARE, C.; PETERS, G.; MILLER, D. G.; SHEN, L.; CLEARY, M. A.; RUOHOLA-BAKER, H. Characterization of microRNAs involved in embryonic stem cell states. **Stem Cells and Development,** v. 19, n. 7, p. 935–950, 2010.

SU, J. L.; CHEN, P. S.; JOHANSSON, G.; KUO, M. L. Function and regulation of let-7 family microRNAs. **MicroRNA,** v. 1, n. 1, p. 34-39, 2012

SUN, D.; LEE, Y. S.; MALHOTRA, A.; KIM, H. K.; MATECIC, M.; EVANS, C.; JENSEN, R. V.; MOSKALUK, C. A.; DUTTA, A. miR-99 family of MicroRNAs suppresses the expression of prostate-specific antigen and prostate cancer cell proliferation. **Cancer Research,** v. 71, n. 4, p. 1313-1324, Feb. 2011.

SUN, Y. M.; LIN, K. Y.; CHEN, Y. Q. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. **Journal of Hematology and Oncology,** v.15, n.6, p.1-6, Jan. 2013.

TAI, D.; LIU, P.; GAO, J.; JIN, M.; XU, T.; ZUO, Y.; LIANG, H.; LIU, D. Generation of Arbas Cashmere Goat Induced Pluripotent Stem Cells Through Fibroblast Reprogramming. **Cell Reprogram,** v. 17, n. 4, p. 297-305, Aug. 2015.

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.

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. 861-872, 2007.

VALENCIA-SANCHEZ, M. A.; LIU, J.; HANNON, G. J.; PARKER, R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. **Genes Development,** v. 20, n. 5, p. 515-524, Mar. 2006.

WANG, Y.; BASKERVILLE, S.; SHENOY, A.; BABIARZ, J. E.; BAEHNER, L.; BLELLOCH, R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. **Nat Genetics**, v. 40, n. 12, p. 1478-1483, Dec. 2008.

WANG, G.; GUO, X.; HONG, W.; LIU, Q.; WEI, T.; LU, C.; GAO, L.; YE, D.; ZHOU, Y.; CHEN, J.; WANG, J.; WU, M.; LIU, H.; KANG, J. Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. **Proceedings of the National Academy of Sciences,** v. 110, n. 8, p. 2858-2863, Feb. 2013.

WANG, L.; SU, W.; DU, W.; XU, Y.; WANG, L.; KONG, D.; HAN, Z.; ZHENG, G.; LI, Z. Gene and MicroRNA Profiling of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived EndothelialCells. **Stem Cell Reviews,** v.11, n.2, p.219-227. Apr, 2015.

WEI, C. L.; MIURA, T.; ROBSON, P.; LIM, S. K.; XU, X. Q.; LEE, M. Y.; GUPTA, L.; STANTON, L.; LUO, Y.; SCHMITT, J.; THIES, S.; WANG, W.; KHREBTUKOVA, I.; ZHOU, D.; LIU, E. T.; RUAN, Y. J.; RAO, M.; LIM, B. Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state. **Stem Cells,** v. 23, n. 2, p. 166-185, 2005.

WERNIG, M.; MEISSNER, A.; FOREMAN, R.; BRAMBRINK, T.; KU, M.; HOCHEDLINGER, K.; BERNSTEIN, B. E.; JAENISCH, R. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. **Nature**, v. 448, n. 7151, p. 318-324, 2007.

WHITWORTH, D. J.; OVCHINNIKOV, D. A.; SUN, J.; FORTUNA, P. R.; WOLVETANG, E. J. Generation and characterization of leukemia inhibitory factor-dependent equine induced pluripotent stem cells from adult dermal fibroblasts. **Stem Cells and Developmentelopment**, v. 23, n. 13, p. 1515-1523, Jul. 2014.

WILLIAMS, R. L.; HILTON, D. J.; PEASE, S.; WILLSON, T. A.; STEWART, C. L.; GEARING, D. P.; WAGNER, E. F.; METCALF, D.; NICOLA, N. A.; GOUGH, N. M. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. **Nature,** v. 336, n. 6200, p. 684–687, Dec. 1988.
WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.

WILSON, K. D.; VENKATASUBRAHMANYAM, S.; JIA, F.; SUN, N.; BUTTE, A. J.; WU, J. C. MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. **Stem Cells and Developmentelopment,** v.18, n. 5, p. 749-758, Jun. 2009.

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 Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 46-54, 2009.

YANG, X.; SMITH, S. L.; TIAN, X. C.; LEWIN, H. A.; RENARD, J. P.; WAKAYAMA, T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. **Nature Genetics**, v. 39, n. 3, p. 295-302, 2007.

YU, J.; HU, K.; SMUGA-OTTO, K.; TIAN, S.; STEWART, R.; SLUKVIN, II; THOMSON, J. A. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 797-801, 2009.

YU, P.; LU, Y.; JORDAN, B.J.; LIU, Y.; YANG, J.Y.; HUTCHESON, J. M.; ETHRIDGE, C. L.; MUMAW, J. L.; KINDER, H. A.; BECKSTEAD, R. B.; STICE, S. L.; WEST, F. D. Nonviral minicircle generation of induced pluripotent stem cells compatible with production of chimeric chickens. **Cell Reprogramming**, v. 16, n. 5, p. 366-378, Oct. 2014.

XU, J.; WANG, F.; TANG, Z.; ZHAN, Y.; ZHANG, J.; YAN, Q.; XIONG, Y.; XIE, X.; WU, J.; ZHANG, S. Role of leukaemia inhibitory factor in the induction of pluripotent stem cells in mice. **Cell Biology International**, v. 34, n. 8, p. 791-797, Aug. 2010.

ZHANGa, M.; GUO, Y.; WU, J.; CHEN, F.; DAI, Z.; FAN, S.; LI, P.; SONG, T. Roles of microRNA-99 family in human glioma. **Onco Targets Therapy**. v. 20, n. 9, p. 3613-3619, Jun. 2016.

ZHANG, W.; ZHONG, L.; WANG, J.; HAN, J. Distinct MicroRNA expression signatures of porcine induced pluripotent stem cells under mouse and human ESC culture conditions. **PLoS One**, v. 6, n. 11, p. 0158655, Jul. 2016.

ZHAO, N.; SUN, H.; SUN, B.; ZHU, D.; ZHAO, X.; WANG, Y.; GU, Q.; DONG, X.; LIU, F.; ZHANG, Y.; LI, X. miR-27a-3p suppresses tumor metastasis and VM by down-regulating VE-cadherin expression and inhibiting EMT: an essential role for Twist-1 in HCC. **Scientific Reports,** v. 16, n. 6, p. 23091, Mar. 2016.

ZOVOILIS, A.; SMORAG, L.; PANTAZI, A.; ENGEL, W. Members of the miR-290 cluster modulate in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. **Differentiation,** v. 78, n. 2-3, p. 69-78, Sep-Oct. 2009.

APÊNDICES

Apêndice A- Primers utilizados para análise de perfil de miRNA em células eiPS

Continua

miRNA	Sequência	Número de pares de base
eca-let-7a	ugagguaguagguuguauaguu	22
eca-let-7c	ugagguaguagguuguaugguu	22
eca-let-7d	agagguaguagguugcauaguu	22
eca-let-7f	ugagguaguagauuguauaguu	22
eca-let-7g	ugagguaguaguuuguacaguu	22
eca-mir-1	uggaauguaaagaaguauguau	22
eca-mir-10a	uacccuguagauccgaauuugug	23
eca-mir-10b	uacccuguagaaccgaauuugug	23
eca-mir-15b	uagcagcacaucaugguuuaca	22
eca-mir-19a	ugugcaaaucuaugcaaaacuga	23
eca-mir-20a	uaaagugcuuauagugcagguag	23
eca-mir-24	uggcucaguucagcaggaacag	22
eca-mir-25	cauugcacuugucucggucuga	22
eca-mir-26a	uucaaguaauccaggauaggcu	22
eca-mir-27b	uucacaguggcuaaguucugc	21
eca-mir-28-5p	aaggagcucacagucuauugag	22
eca-mir-29b	uagcaccauuugaaaucaguguu	23
eca-mir-29c	uagcaccauuugaaaucgguua	22
eca-mir-30b	uguaaacauccuacacucagcu	22
eca-mir-30c	uguaaacauccuacacucucagc	23
eca-mir-31	aggcaagaugcuggcauagcu	21
eca-mir-33a	gugcauuguaguugcauugca	21
eca-mir-33b	gugcauugcuguugcauugc	20
eca-mir-34	uggcagugucuuagcugguugu	22

Continuação

miRNA	Sequência	Número de pares de base
eca-mir-92a	uauugcacuugucccggccugu	22
eca-mir-92b	uauugcacucgucccggccucc	22
eca-mir-95	uucaacgggucuuuauugagca	22
eca-mir-96	uuuggcacuagcacauuuuugcu	23
eca-mir-98	ugagguaguaaguuguauuguu	22
eca-mir-99b	cacccguagaaccgaccuugcg	22
eca-mir-105	ucaaaugcucagacuccuguggu	23
eca-mir-106b	uaaagugcugacagugcagau	21
eca-mir-122	uggagugugacaaugguguuug	22
eca-mir-125b	ucccugagacccuaacuuguga	22
eca-mir-127	ucggauccgucugagcuuggcu	22
eca-mir-128	ucacagugaaccggucucuuu	21
eca-mir-130a	cagugcaauguuaaaagggcau	22
eca-mir-130b	cagugcaaugaugaaagggcau	22
eca-mir-132	uaacagucuacagccauggucg	22
eca-mir-133a	uuuggucccuucaaccagcug	22
eca-mir-133b	uuuggucccuucaaccagcua	22
eca-mir-135a	uauggcuuuuuauuccuauguga	23
eca-mir-135b	uauggcuuuucauuccuauguga	23
eca-mir-137	uuauugcuuaagaauacgcguag	23
eca-mir-138	agcuggugugaaucaggccg	23
eca-mir-141	uaacacugucugguaaagaugg	22
eca-mir-145	guccaguuuucccaggaaucccu	23
eca-mir-148a	ucagugcacuacagaacuuugu	22
eca-mir-148b-3p	ucagugcaucacagaacuuugu	22

Continuação

miRNA	Sequência	Número de pares de base
eca-mir-149	ucuggcuccgugucuucacuccc	23
eca-mir-150	ucucccaacccuuguaccagug	22
eca-mir-151-5p	ucgaggagcucacagucuagu	21
eca-mir-153	uugcauagucacaaaagugauc	22
eca-mir-155	uuaaugcuaaucgugauaggggu	23
eca-mir-184	uggacggagaacugauaagggu	22
eca-mir-186	caaagaauucuccuuuugggcu	22
eca-mir-187	ucgugucuuguguugcagccgg	22
eca-mir-190	ugauauguuugauauauuaggu	22
eca-mir-190b	ugauauguuugauauuggguu	21
eca-mir-191	caacggaaucccaaaagcagcug	23
eca-mir-193a-5p	ugggucuuugcgggcgagauga	22
eca-mir-194	uguaacagcaacuccaugugga	22
eca-mir-196a	uagguaguuucauguuguuggg	22
eca-mir-197	uucaccaccuucuccacccagc	22
eca-mir-199b-5p	cccaguguuuagacuaucuguuc	23
eca-mir-200c	uaauacugccggguaaugaugga	23
eca-mir-204b	uucccuuugucauccuaugccu	22
eca-mir-205	uccuucauuccaccggagucug	22
eca-mir-206	uggaauguaaggaagugugugg	22

Continuação

miRNA	Sequência	Número de pares de base
eca-mir-208a	auaagacgagcaaaaagcuugu	22
eca-mir-208b	auaagacgaacaaaagguuugu	22
eca-mir-214	acagcaggcacagacaggcagu	22
eca-mir-216a	uaaucucagcuggcaacuguga	22
eca-mir-216b	aaaucucugcaggcaaauguga	22
eca-mir-222	agcuacaucuggcuacugggu	21
eca-mir-223	ugucaguuugucaaauacccca	22
eca-mir-302b	uaagugcuuccauguuuuaguag	23
eca-mir-302c	uaagugcuuccauguuucagugg	23
eca-mir-302d	uaagugcuuccauguuuuagugu	23
eca-mir-324-5p	cgcauccccuagggcauuggugu	23
eca-mir-328	cuggcccucucugcccuuccgu	22
eca-mir-331	gccccugggccuauccuagaa	21
eca-mir-335	ucaagagcaauaacgaaaaaugu	23
eca-mir-346	ugucugcccgcaugccugccucu	23
eca-mir-361-5p	uuaucagaaucuccagggguac	22
eca-mir-362-5p	aauccuuggaaccuaggugugagu	24
eca-mir-365	uaaugccccuaaaaauccuuau	22
eca-mir-369-3p	aauaauacaugguugaucuuu	21
eca-mir-370	gccugcugggguggaaccuggu	22
eca-mir-374a	uuauaauacaaccugauaagug	22
eca-mir-374b	auauaauacaaccugcuaagug	22
eca-mir-376a	aucauagaggaaaauccacgu	21
eca-mir-377	aucacacaaaggcaacuuuugu	22
eca-mir-379	ugguagacuauggaacguagg	21
eca-mir-381	uauacaagggcaagcucucugu	22
eca-mir-382	gaaguuguucgugguggauucg	22
eca-mir-383	agaucagaaggugauuguggcu	22
eca-mir-409-5p	agguuacccgagcaacuuugcau	23

Conclusão

miRNA	Sequência	Número de pares de base
eca-mir-410	aauauaacacagauggccugu	21
eca-mir-423-5p	ugaggggcagagagcgagacuuu	23
eca-mir-432	ucuuggaguaggucauugggugg	23
eca-mir-433	aucaugaugggcuccucggugu	22
eca-mir-448	uugcauauguaggauguccau	22
eca-mir-449a	uggcaguguauuguuagcuggu	22
eca-mir-450a	uuuugcgauguguuccuaauau	22
eca-mir-450b-5p	uuuugcaauauguuccugaaua	22
eca-mir-454	uagugcaauauugcuuauagggu	23
eca-mir-486-5p	uccuguacugagcugccccgag	22
eca-mir-487b	aaucguacagggucauccacuu	22
eca-mir-490-3p	caaccuggaggacuccaugcug	22
eca-mir-491-5p	agugggaacccuuccaugagg	22
eca-mir-494	ugaaacauacacgggaaaccuc	22
eca-mir-495	aaacaaacauggugcacuucuu	22
eca-mir-499-5p	uuaagacuugcagugauguuu	21
eca-mir-500	uaauccuugcuaccugggugaga	23
eca-mir-502-3p	aaugcaccugggcaaggauuca	22
eca-mir-505	cgucaacacuugcugguuuccu	22
eca-mir-16	uagcagcacguaaauauuggcg	22
eca-mir-21	uagcuuaucagacugauguuga	22
eca-mir-23a	aucacauugccagggauuucc	21
eca-mir-23b	aucacauugccagggauuacc	21
eca-mir-27a	uucacaguggcuaaguuccgc	21
eca-mir-93	caaagugcuguucgugcagguag	23
eca-mir-99a	aacccguagauccgaucuugug	22
eca-mir-125a-5p	ucccugagacccuuuaaccuguga	24

Apêndice B- Vias reguladas por miRNAs aumentados em fibroblastos controle e eiPS

Pathways regulated by miRNAs increased in Fibroblast CTR	Genes number	miRNAs number
Proteoglycans in cancer	111	5
Adherens junction	52	5
TGF-beta signaling pathway	49	5
Hipoo signaling pathway	75	5
Hepatitis B	79	5
Prion diseases	15	5
Viral carcinogenesis	102	5
Lysine degradation	28	5
Glioma	40	5
Thyroid hormone signaling pathway	67	5
Pathways in cancer	189	5
ECM-receptor interaction	34	5
Oocyte meiosis	64	5
Renal cell carcinoma	39	5
Chronic myeloid leukemia	45	5
Cell cycle	70	5
Protein processing in endoplasmic reticulum	87	5
FoxO signaling pathway	75	5
Bacterial invasion of epitelial cells	44	5
Ubiquitin mediated proteolysis	76	5
Transcriptional misregulation in cancer	82	5
AMPK signaling pathway	66	5
Fatty acid biosynthesis	4	5
mTor signaling pathway	38	5
Prostate cancer	51	5
Focal adhesion	103	5
Blader cancer	27	5
Estrogen signaling pathway	49	5
Endocytosis	95	5
Neurotrophin signaling pathway	63	5
Thyroid cancer	18	5
Shigellosis	37	5
Colorectal cancer	34	5
Endometrial cancer	29	5
p53 signaling pathway	38	5
HIF-1 signaling pathway	55	5
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	67	5
Insulin signaling pathway	69	5
Small cell lung cancer	45	5
Regulation of actin cytoskeleton	93	5
ErbB signaling pathway	45	5
Phosphatidylinositol signaling system	41	5
Pancreatic cancer	36	5
Non-small cell lung cancer	30	5
Wnt signaling pathway	63	5
Sphingolipid signaling pathway	56	5
GnRH signaling pathway	45	5
Inositol phosphate metabolism	28	5
Melanoma	34	5
Acute myelois leukemia	29	5
Central carbono metabolismo in cancer	31	5
Progesterone-mediated oocyte maturation	44	5
HTLV-I signaling pathway	112	5
PI3K-Akt signaling pathway	142	5
TNF signaling pathway	53	5
MAPK signaling pathway	104	5
Apoptosis	38	5
Gap junction	40	5

Pathways regulated by miRNAs increased in Fibroblast iPS	Gene number	MiRNAs number
Fatty acid biosynthesis	3	2
Lysine degradation	17	5
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	41	5
Proteoglycans in cancer	46	5
TGF-beta signaling pathways	25	5
Colorectal cancer	21	5
Fatty acid metabolism	9	3
Oocyte meiosis	27	5
FoxO signaling pathway	36	5
Adherens junction	22	5
Pathways in cancer	71	5
Wnt signaling pathway	33	5
Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	2	2
Hippo signaling pathway	38	5
Chronic myeloid leukemia	20	5
Cell clycle	29	5
Endocytosis	39	5
Endometrial cancer	15	5
Non-small cell lung cancer	14	5
Focal adhesion	47	5
Prostae cancer	22	5
Thyroid cancer	8	5
p53 signaling pathway	18	5
Prolactin signaling pathway	17	5

Apêndice C- Vias reguladas por miRNAs exclusivos em fibroblastos controle e eiPS

Pathways regulated by miRNAs exclusive to Fibroblast CTR	Genes number	miRNAs number
ECM-receptor interaction	5	1
Sulfur relay system	1	1
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	8	1
Amphetamine addiction	6	1
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy	3	1

Pathways regulated by miRNAs exclusive to Fibroblast iPS	Genes number	miRNAs number
Fatty acid biosynthesis	4	2
ECM-receptor interaction	35	5
Amoebiasis	24	3
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	58	5
Glioma	29	5
Protein digestion and absorption	26	2
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	16	3
Lysine degradation	9	4
Mucin type O-Glican biosynthesis	77	3
Focal adhesion	7	1
Fatty acid metabolism	61	3
Proteoglicans in cancer	76	4
PI3K-Akt signaling pathways	5	2
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate/heparin	20	2
Melanoa	25	2
TGF-beta signaling pathway	37	4
Pathways in cancer	67	2
Prostate cancer	27	2

Apêndice D- Vias reguladas por miRNAs aumentados em etCU controle e eiPS

Pathways regulated by miRNA Increased in umbilical CTR	Gene number	MiRNAs number
Prion deseases	9	2
Fatty acid biosynthesis	1	1
Proteoglycans in cancer	51	2
Adherens junction	21	2
p53 signaling pathway	23	2
Viral carcinogenesis	45	2
Fatty acid metabolism	7	2
Glycosphingolipid biosynthesis – lacto and neolacto series	4	2
Phosphatidylinositol signaling system	20	2
Glioma	18	2
HIF-1 signaling pathway	28	2
Pathways in cancer	76	2
mTor signaling pathway	18	2
Renal cell carcinoma	17	2
Thyroid hormonesignaling pathway	30	2
Non-small cell lung cancer	15	2
Central carbon metabolism in cancer	16	2
Cell cycle	29	2
Focal adhesion	45	2
Regulation of actin cytoskeleton	44	2

Pathways regulated by miRNA Increased in umbilical iPS (eca-mir-302d)	Gene number	MiRNAs number
Lisine degradation	4	1
Wnt signaling pathway	8	1
Mucin type O-Glyan biosynthesis	2	1
Hippo signaling pathway	11	1
Proteoclicans in cancer	8	1
Prolactin signaling pathway	4	1
Oocyte meiosis	5	1
Endocytosis	6	1
Non-small cell lung cancer	2	1
Pathways in cancer	7	1
Colorectal cancer	3	1

Apêndice E- Vias reguladas por miRNAs exclusivos em etCU eiPS

Pathways regulated by miRNAs exclusive to etCU iPS	Genes number	miRNAs number
Fatty acid biosynthesis	4	2
Mucin type O-Glican biosynthesis	7	3
Long term depression	19	3
Gap junction	21	4
Fatty acid metabolism	10	4
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	38	5
Ubiquitin mediated proteolysis	39	5
Proteoglicans in cancer	44	5
Glioma	18	4
Neurotrophin signaling pathway	35	5
FoxO signaling pathway5	34	4
Axon guidance	35	5
Non-smal cell lung cancer	17	5
cGMP-PKG signaling pathway	40	5
Lysine degradation	11	3
Cocaine addiction	13	4
Prolactin signaling pathway	18	5
Prostate cancer	23	3
AMPK signaling patway	30	5
oocyte meiosis	29	5
p53 signaling pathways	20	5
Progesterone-mediated oocyte maturation	24	5
Ras signaling pathway	46	5
mTOR signaling pathway	18	4
Melanoma	19	3
Glycerophospholipid metabolism	21	4
TGF-beta signaling pathway	17	4
Regulation of actin cytoskeleton	46	5
Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate/heparin	4	2
B cell receptor signaling pathway	19	3
Rap1 signaling pathway	45	5
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	31	5
Amphetamine addiction	15	5
Focal adhesion	44	5
Long-term potentation	18	5

Apêndice F- Vias reguladas por miRNAs exclusivos em eAdMSC controle

Pathways regulated by miRNAs exclusive to eAdMSC CTR	Genes number	miRNAs number
Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	2	1
Morphine addiction	9	1
Lysine degradation	5	1
Gap junction	7	1
MicroRNAs in cancer	15	1
Transcriptional misregulation in cancer	17	1
Bacterial invasion of epthelial cells	10	1
Cocaine addiction	7	1

Apêndice G- Vias reguladas por miRNAs aumentados em eAdMSC controle

Continua

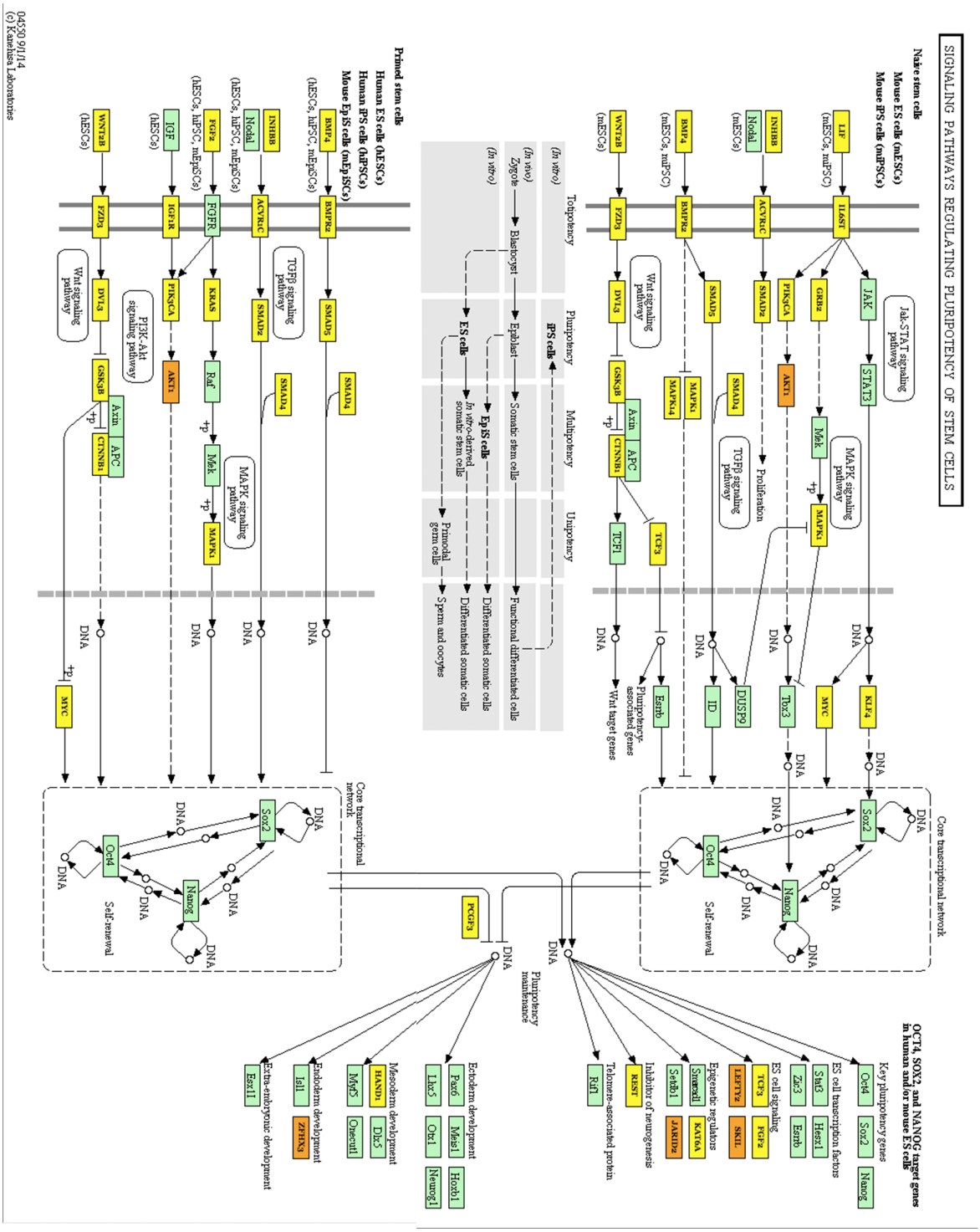
Pathways regulated by miRNAs increased in Mesenquimal CTR	Gene number	MiRNAs number
MiRNAs in cancer	155	47
Proteoglycans in cancer	185	47
Pathways in cancer	339	48
Renal cell carcinoma	65	46
Glioma	62	45
ECM-receptor interaction	73	39
TGF-beta signaling pathway	76	45
Hippo signaling pathway	134	45
Hepatitis B	123	46
Pancreatic cancer	63	45
Cell cycle	113	47
Focal adhesion	186	47
Non-small cell lung cancer	52	42
Other types O-glycan biosynthesis	29	29
Transcriptional misregulation in cancer	151	48
Acute myeloid leukemia	55	41
Ubiquitin mediated proteolysis	122	46
Endocytosis	179	44
Protein processing in endoplasmic reticulum	146	43
PI3K-Akt signaling pathway	275	48
Prostae câncer	82	45
Chronic myeloid leucemia	71	44
N-Glycan biosynthesis	45	39
Insulin signaling pathway	124	44
ErbB signaling pathway	78	45
Melanoma	64	44
Adherens junction	68	46
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	119	45
Thyroid hormone signaling pathway	105	46
Endocmetrial cancer	49	43
Bacterial invasion of epithelial cells	69	45
Thyroid cancer	28	38
Steroid biosynthesis	19	30
p53 signaling pathway	64	43
Neurotrophin signaling pathway	106	44
Phosphatidylinositol signaling pathway	70	43
Axon guidance	106	43
FoxO signaling pathway	117	47
Prion deseases	28	35
Glycosaminoglycan biosynthesis – keratan sulfate	14	25
Small cell lung cancer	75	45
Lysine degradation	45	37
Glycosaminoglycan biosynthesis – chondroitin sulfate/ dermatan sulfate	17	26
Blader cancer	35	41
Colorectal cancer	59	44
Central carbon metabolismo in cancer	59	42
Estrogen signaling pathway	85	45
Spliceosome	109	46
Oocyte meiosis	93	45
Regulation of actin cytoskeleton	173	46
Circadian rhythm	29	31
mTor signaling pathway	56	44
Progesterone mediated oocyte maturation	76	44
RNA transport	139	47
Ras signaling pathway	181	46
Long-term potentation	58	42
Salmonella infection	67	41
Sphingolipid signaling pathway	100	45
Rap1 signaling pathway	169	46
Prolactin signaling pathway	61	44
Inositol phosphate metabolismo	53	41
Fatty acid elongation	20	30
Gap juntion	72	42
Wnt signaling pathway	116	45

Conclusão

Dorso-ventral axis formation	25	38
Ribosome	111	39
Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchor biosynthesis	22	25

ANEXOS

Anexo A- Vias de sinalização regulando pluripotência em células tronco



Fonte: KEGG PATHWAY Database

4 CAPÍTULO V: CONCLUSÕES GERAIS

4.1 CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos neste trabalho podemos concluir que foi possível gerar células pluripotentes induzidas equinas a partir das células isoladas de tecido adiposo, tecido de cordão umbilical e fibroblastos, utilizando fatores de reprogramação humanos. Também é possível concluir que, usando o sistema de indução padronizado em nosso laboratório, a utilização de fatores humanos na reprogramação direta gera uma maior eficiência na produção de células iPS equinas quando comparados com fatores murinos. Fato este observado devido à maior quantidade de colônias encontradas nas células reprogramadas por fatores humanos e a ausência de reprodutibilidade da produção de células eiPS a partir dos fatores murinos. Ainda, no nosso conhecimento, as células eiPS produzidas neste estudo são as primeiras unicamente dependentes de bFGF, sem necessidade de suplementação com LIF.

A utilização de células mesenquimais de tecido adiposo para reprogramação celular apresentou maior eficiência quando comparada às linhagens induzidas a partir de células mesenquimais de tecido de cordão umbilical e fibroblastos. Resultado este corroborado pela análise do perfil de miRNAs das linhagens estudadas, pré e pós reprogramação, que mostrou que duas linhagens de células eiPS-etCU e de eiPS-eFibro apresentavam um perfil mais semelhante aos seus controles do que as demais linhagens de células eiPS geradas, podendo ser um indício de linhagens parcialmente reprogramadas. Ainda, as células eiPS-eAdMSC apresentaram detecção de um número maior de marcadores de pluripotência, quando comparadas às demais células estudadas. Não foi possível induzir as células mesenquimais de medula óssea à pluripotência utilizando o sistema padronizado em nosso laboratório. Estes resultados estão em acordo com a hipótese que os tipos celulares estudados neste trabalho respondem de maneira diferente ao processo de reprogramação celular, efeito mostrado na eficiência de indução à pluripotência e nas características exibidas pelas linhagens de células eiPS geradas.

A utilização das células eiPS de maneira prática é desejável, porém ainda não é considerada uma realidade, uma vez que estas células apresentam, entre os fatores de reprogramação, genes associados à formação de tumores, que

representariam um risco para a saúde de pacientes. Portanto os próximos objetivos são novos estudos visando excisar a sequência do vetor STEMCCA, que contém os fatores de reprogramação das células eiPS, acompanhada da avaliação da manutenção de pluripotência, o que caminharia no sentido da utilização prática destas células.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

BRESSAN, F. F. Geração de células pluripotentes através da indução gênica e transferência de núcleo: modelo bovino de aquisição de pluripotência. 2013. 134 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

BRETON, A.; SHARMA, R.; DIAZ, A. C.; PARHAM, A. G.; GRAHAM, A.; NEIL, C.; WHITELAW, C. B.; MILNE, E.; DONADEU, F. X. Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts. **Stem Cells and Development**, v. 22, n. 4, p. 611-621, Feb. 2013.

CARRADE, D.D.; LAME, M.W.; KENT, M.S.; CLARK, K.C.; WALKER, N.J.; BORJESSON, D.L. Comparative Analysis of the Immunomodulatory Properties of Equine Adult-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Cell Medicine**. v. 4, n. 1, p 1-11, 2012.

DE VITA, B.; CAMPOS, L. L.; LISTONI, A. J.; MAIA, L.; FREITAS, N. P. P.; ALVARENGA, F.; PRESTES, N. C. Anexos fetais: uma fonte alternativa de células-tronco mesenquimais para a medicina veterinária equina **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, p. 008-022, 2012.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature,** v. 292, p. 154-156, 1981.

JAENISCH, R.; YOUNG, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. **Cell,** v. 132, n.4, p. 567-582, 2008.

KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; KLÜTER, H.; BIEBACK, K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. **Stem Cells,** v. 24, n. 5, p. 1294-301, May. 2006.

KHODADADI, K.; SUMER, H.; PASHAIASL, M.; LIM, S.; WILLIAMSON, M.; VERMA, P. J. Induction of pluripotency in adult equine fibroblasts without c-MYC. **Stem Cells,** v. 2012, p. 429160, Mar. 2012.

KIRCHHOF, N.; CARNWATH, J. W.; LEMME, E.; ANASTASSIADIS, E.; SCHÖLER, H.; NIEMANN, H. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 1698-1705, 2000.

LI, X.; ZHOU, S. G.; IMREH, M. P.; AHRLUND-RICHTER, L.; ALLEN, W. R. Horse embryonic stem cell lines from the proliferation of inner cell mass cells. **Stem Cells and Development,** v. 15, p. 523–31, 2006.

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

NICHOLS, J.; ZEVNIK, B.; ANASTASSIADIS, K.; NIWA, H.; KLEWE-NEBENIUS, D.; CHAMBERS, I.; SCHÖLER, H.; SMITH, A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 379-91, 1998.

NIWA, H.; MIYAZAKI, J.; SMITH, A. G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nature Genetics,** v. 24, p. 372-376, 2000.

PACINI, S.; SPINABELLA, S.; TROMBI, L.; FAZZI, R.; GALIMBERTI, S.; DINI, F.; CARLUCCI, F.; PETRINI, M. Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. **Tissue Engineering,** v. 13, n. 12, p. 2949-55, Dec. 2007.

PARIS, D. B.; STOUT, T. A. Equine embryos and embryonic stem cells: defining reliable markers of pluripotency. **Theriogenology,** v. 74, n. 4, p. 516-24,Sep. 2010.

SAITO, S.; UGAI, H.; SAWAI, K.; YAMAMOTO, Y.; MINAMIHASHI, A.; KUROSAKA, K.; KOBAYASHI, Y.; MURATA, T.; OBATA, Y.; YOKOYAMA, K. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro. **FEBS Letters,** v. 531, n. 3, p. 389-96, Nov. 2002.

SHARMA, R.; LIVESEY, M. R.; WYLLIE, D. J.; PROUDFOOT, C.; WHITELAW, C. B.; HAY, D. C.; DONADEU, F. X. Generation of functional neurons from feeder-free, keratinocyte-derived equine induced pluripotent stem cells. **Stem Cells and Development,** v. 23, n. 13, p. 1524-1534, Jul. 2014.

SOMMER, C. A.; STADTFELD, M.; MURPHY, G. J.; HOCHEDLINGER, K.; KOTTON, D. N.; MOSTOSLAVSKY, G. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. **Stem Cells,** v. 27, n. 3, p. 543-549, Mar. 2009.

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.

TOUPADAKIS, C. A.; WONG, A.; GENETOS, D. C.; CHEUNG, W. K.; BORJESSON, D. L.; FERRARO, G. L.; GALUPPO, L. D.; LEACH, J. K.; OWENS, S. D.; YELLOWLEY, C. E. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. **American Journal Veterinary Research,** v. 71, n. 10, p. 1237–1245, 2010.

WHITWORTH, D. J.; OVCHINNIKOV, D. A.; SUN, J.; FORTUNA, P. R.; WOLVETANG, E. J. Generation and characterization of leukemia inhibitory factor-dependent equine induced pluripotent stem cells from adult dermal fibroblasts. **Stem Cells and Developmentelopment**, v. 23, n. 13, p. 1515-1523, Jul. 2014.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.