UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

MARIA FLORENCIA TELLECHEA

Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de células de pacientes com anemia aplástica adquirida

Ribeirão Preto

2016

MARIA FLORENCIA TELLECHEA

Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de células de pacientes com anemia aplástica adquirida

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração em Genética.

Orientador: **Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues**

Ribeirão Preto

2016

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Tellechea, Maria Florencia.

Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de células de pacientes com anemia aplástica adquirida – Ribeirão Preto, 2016.

102 p.: il. ;30 cm

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

Orientador: Calado, Rodrigo do Tocantis.

1. Anemia aplástica adquirida 2. iPSCs 3. Telômeros

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Capes (Bolsa de mestrado)- março/2013 a fevereiro/2015.
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Bolsa de Treinamento Técnico (TT3)- abril/2015- atual.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto.
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Células-Tronco e Terapia Celular (INCTC).
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA – HCFMRP – USP).

Tellechea, M. F. **Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de células de pacientes com anemia aplástica adquirida.** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Rodrigo T. Calado**, agradeço pela oportunidade, suporte e confiança que sempre depositou em mim.

À **Flávia S. Donaires** e **Sílvia Sanchez** pela ajuda incondicional nos momentos mais difíceis. **Flávia**, tua experiência e ensinamentos foram fundamentais para a realização do trabalho.

À, **Helder Freitas, Bruno Sangiorgi, Josiane Schiavinato, Vitor Leão e Ildercílio Lima**, por me socorrer sempre que precisei.

À **Dra. Maristela Orellana** e a todas as funcionárias do **Laboratório de Terapia Celular**, pelo constante auxílio nas salas de cultura.

Aos médicos **Renato Cunha** e **Marcos Oltramari**, pela realização das biópsias dos pacientes.

À **Luiza Junqueira**, pela ajuda e dicas na técnica de reprogramação episomal.

À **Dra. Fabiana Bressan**, pela amabilidade e disponibilidade para ajudar com a produção de vírus.

A **Fernanda Gutierrez**, pela colaboração e disponibilidade na realização do flow-FISH.

À querida **Dra. Bárbara Santana** pela ajuda, ensinamentos e paciência, por me receber sempre com um sorriso toda vez que precisei dela.

A todos os funcionários do **Laboratório de Hematologia**, em especial a **Ana Silvia**, , **Ritinha, Priscila** e **Adriana**, sempre dispostas a ajudar.

Às queridas integrantes do **Laboratório de Citogenética**, especialmente a **Fernanda Borges, Diva, Virginia** e **Ivana** pela ajuda nas técnicas de citogenética.

Aos meus queridos colegas e amigos do laboratório: **Larissa Cândido, Mariana Benício, Lilian Figueiredo, Gustavo Borges, João Paulo da Silva, Fernanda Gutierrez, Raquel Melo, André Pinto, Juliana Poltronieri, Isabela Lopes, Ana Paula Alves, Jaqueline Fernandes, Hudson Bezerra, Sarah Blima e Felipe**, pela convivência e ensinamentos diários, por muitas vezes dividir comigo as angustias e problemas e risadas.

À minha família, pelo apoio e carinho de sempre.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Anemia aplástica	11
1.2. Telômeros e anemia aplástica.....	12
1.3. Células-tronco pluripotentes	15
1.4. Células de pluripotência induzida (iPSCs)	16
1.5. Métodos para geração de iPSCs.....	18
1.6. Dinâmica dos telômeros nas iPSCs	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. METODOLOGIA	25
3.1. Casuística	26
3.2. Plasmídeos.....	26
3.3. Linhagens celulares.....	26
3.4. Cultivo e manutenção de linhagens celulares aderentes	26
3.4.1. Contagem de células em câmara de Neubauer:.....	27
3.4.2. Descongelamento:.....	27
3.4.3. Repique:	27
3.4.4. Congelamento:.....	28
3.4.5. Teste de detecção de micoplasma:	28
3.5. Reprogramação de fibroblastos humanos com lentivírus	29
3.5.1. Obtenção e cultivo de fibroblastos humanos.....	29
3.5.2. Obtenção e cultivo de fibroblastos embrionários murinos (MEFs)	29
3.5.3. Inativação mitótica de MEFs por raios X	30
3.5.4. Preparação de meio condicionado	30
3.5.5. Produção de lentivírus	31
3.6. Reprogramação de eritroblastos humanos com plasmídeos episomais	36
3.6.1. Clonagem e digestão dos plasmídeos episomais	36
3.6.2. Separação de células mononucleares (MNCs)	36
3.6.3. Expansão de eritroblastos.....	37
3.6.4. Reprogramação de eritroblastos em iPSCs.....	37

3.6.5.	Cultivo e manutenção de iPSCs em MEFs e Matrigel	38
3.6.6.	Medida do comprimento telomérico de iPSCs pela técnica de citometria de fluxo associada à hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (flow-FISH)	39
3.7.	Caracterização das iPSCs	40
3.7.1.	Fosfatase alcalina.....	40
3.7.2.	Citometria de fluxo para marcadores de pluripotência.....	41
3.7.3.	Imunocitoquímica para marcadores de pluripotência.....	41
3.7.4.	Ensaio de diferenciação <i>in vitro</i> : formação de corpos embrioides	42
3.7.5.	Cariotipagem: bandeamento G.....	43
4.	RESULTADOS.....	44
4.1.	Reprogramação de fibroblastos humanos com lentivírus	45
4.1.1.	Obtenção e cultivo de fibroblastos	45
4.1.2.	Obtenção e cultivo de MEFs.....	45
4.1.3.	Inativação mitótica de MEFs por raios X	46
4.1.4.	Produção de lentivírus.....	47
4.1.4.1.	Produção de lentivírus: Metodologia A.....	47
4.1.4.2.	Produção de lentivírus: Metodologia B	50
4.2.	Reprogramação de eritroblastos humanos com plasmídeos episomais.....	51
4.2.1.	Clonagem e digestão dos plasmídeos episomais	51
4.2.2.	Reprogramação de eritroblastos em iPSCs.....	52
4.2.3.	Medição do comprimento telomérico das iPSCs por flow-FISH	54
4.3.	Caracterização das iPSCs	56
4.3.1.	Fosfatase alcalina.....	56
4.3.2.	Citometria de fluxo para marcadores de pluripotência.....	56
4.3.3.	Imunocitoquímica para marcadores de pluripotência.....	61
4.3.4.	Ensaio de diferenciação <i>in vitro</i> : formação de corpos embrioides	69
4.3.5.	Cariotipagem: bandeamento G.....	71
5.	DISCUSSÃO	72
6.	CONCLUSÕES	84
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
	ANEXOS	96

RESUMO

Tellechea, M. F. **Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de células de pacientes com anemia aplástica adquirida.** 2016. 102 p. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A anemia aplástica (AA) é uma doença hematológica rara caracterizada pela hipocelularidade da medula óssea, o que provoca pancitopenia. Esta pode ser de origem genética (associada a encurtamento telomérico) ou adquirida (não-associada a desgaste excessivo dos telômeros). Na forma adquirida, a ativação anormal de linfócitos T provoca a destruição das células hematopoéticas. O mecanismo que leva a essa destruição ainda não foi elucidado. Um dos tratamentos mais eficazes para repovoar a medula óssea hipocelular é o transplante com células-tronco hematopoéticas (CTHs). Porém, uma grande porcentagem de pacientes não se beneficia de nenhum tratamento, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas para terapia. A geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de células somáticas (reprogramação) representa uma ferramenta promissora para o estudo de doenças e para o desenvolvimento de possíveis terapias paciente-específicas, como transplantes autólogos. Neste trabalho, avaliamos a capacidade de reprogramação de fibroblastos e eritroblastos de pacientes com AA adquirida. Metodologias de reprogramação utilizando lentivírus ou plasmídeos episomais não integrativos foram testadas em células de quatro pacientes e de um controle saudável. Eritroblastos dos quatro pacientes e do controle foram reprogramados utilizando os plasmídeos não integrativos. As iPSCs geradas apresentaram-se similares a células-tronco embrionárias quanto à morfologia, expressão dos marcadores de pluripotência OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4, Tra-1-60 e Tra-1-81, e capacidade de diferenciação *in vitro* em corpos embrioides (EBs). A dinâmica telomérica das células pré- e pós-reprogramação foi avaliada em diferentes passagens utilizando a técnica de flow-FISH. O comprimento telomérico foi aumentado nas iPSCs quando comparado às células parentais o que indica que a célula foi completamente reprogramada. No presente trabalho, células de pacientes com AA adquirida foram reprogramadas a um estado de pluripotência por meio de um método não integrativo. As iPSCs geradas serão essenciais para futuros ensaios de diferenciação hematopoética, o que poderá contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa doença. Além disso, a diferenciação dessas células livres de transgenes poderá servir como uma alternativa terapêutica para os pacientes com AA como, por exemplo, em transplantes autólogos.

Palavras-chave: anemia aplástica adquirida, iPSCs, telômeros.

ABSTRACT

Tellechea, M. F. **Induced pluripotent stem cells (iPSCs) generation from acquired aplastic anemia patients.** 2016. 102 p. Dissertation (Master degree)-Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Aplastic anemia (AA) is a rare hematological disease characterized by bone marrow hypocellularity that leads to pancytopenia. Its origin can be genetic (associated with telomere shortening) or acquired (non-associated with telomere shortening). The acquired form exhibit T lymphocytes abnormal activation, which leads to hematopoietic cells destruction. The mechanisms behind this phenomenon are still unclear. One of the most effective treatments for hypocellular bone marrow repopulation is hematopoietic stem cell (HSCs) transplantation. However, a large percentage of patients do not benefit from any of the available treatments. This highlights the need to develop new therapeutic strategies. The generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from somatic cells (reprogramming) represents a powerful tool for disease modeling and for the development of patient-specific therapies such as autologous transplants. In this study, we evaluate the capacity of reprogramming acquired AA patients' fibroblasts and erythroblasts. Reprogramming methods using lentivirus or non-integrative episomal plasmids were tested in four patients' cells and in cells from one healthy donor. Erythroblasts from these four patients and healthy donor were reprogrammed using non-integrative plasmids. The iPSCs resembled human embryonic stem cells in morphology, in the expression of pluripotent markers such as OCT4, SOX2, NANOG, SSEA-4, Tra-1-60 and Tra-1-81, and in in vitro differentiation (capacity to form embryoid bodies). The telomere dynamics of the cells before and after reprogramming was assessed along passaging using flow-FISH. The telomere length in the iPSCs was increased when compared to the parental cells. Thus, acquire AA patients' cells could be reprogrammed to a pluripotent state by a non-integrative method. The iPSCs will be essential for future hematopoietic differentiation assays that could contribute to the understanding of the mechanisms involved in the disease development. Furthermore, the differentiation of transgene-free cells may serve as an alternative therapy for patients with AA such as autologous transplants.

Key words: acquired aplastic anemia, induced pluripotent stem cells, telomeres.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Anemia aplástica

A anemia aplástica (AA) encontra-se no grupo das doenças hematológicas caracterizadas por falhas no funcionamento da medula óssea. Essa doença, descrita pela primeira vez por Ehrlich em 1888, caracteriza-se por apresentar escassas células-tronco e progenitoras hematopoéticas (CTHs e CPHs) na medula óssea, o que provoca falha na manutenção da hematopoese e consequente diminuição na contagem das células sanguíneas (pancitopenia) (Ehrlich, 1888).

A medula óssea é constituída pelo compartimento do estroma medular e o compartimento das células hematopoiéticas. O primeiro possui um conjunto de células adiposas, fibroblastos, células estromais, células endoteliais, macrófagos e vasos sanguíneos distribuídos no interior do tecido ósseo trabecular. O segundo compartimento consiste em CTHs e CPHs, células-tronco mesenquimais (CTMs) e células progenitoras endoteliais (CPEs) e de angioblastos. As CTHs mantêm a hematopoese devido à sua elevada capacidade proliferativa e de diferenciação, sendo produzidas aproximadamente 10^9 células por hora (Metcalf, 1988). Por sua vez, as CTMs providenciam a estrutura física do microambiente para as CTHs, além de secretarem citocinas para promover a hematopoese. Esse microambiente preserva as CTHs em um balanço dinâmico entre auto-renovação e diferenciação. Qualquer destruição das células progenitoras resultará em falência da medula óssea (Li *et al.*, 2010), como o que ocorre na AA.

O diagnóstico convencional da AA é definido pela presença de pelo menos duas citopenias: hemoglobina $<10\text{g/dL}$, neutrófilos $<1000/\mu\text{L}$ e/ou plaquetas $<50.000/\mu\text{L}$. Além disso, a biopsia de medula óssea deve confirmar esta depleção celular e excluir outras doenças como mielodisplasia, mielofibrose e leucemias. Dependendo dos resultados obtidos, a AA pode adquirir diferentes graus de complexidade, podendo ser muito grave, grave ou moderada (Bacigalupo *et al.*, 1988; Camitta *et al.*, 1976; Rosenfeld *et al.*, 2003).

Segundo o trabalho epidemiológico realizado pelo *International Aplastic Anemia and Agranulocytosis Study* na Europa e Israel no início de 1980, a incidência global da AA é de 2-6 casos/ 10^6 habitantes/ano. Maior incidência foi observada em mulheres do que em homens (2,3

casos/ 10^6 /ano e 1,2 casos/ 10^6 /ano, respectivamente) com aumento de casos nas idades de 15 a 25 anos e acima dos 60 anos. No Brasil foi determinada uma incidência de 2,1 casos/ 10^6 /ano, com base em uma população estudada apenas no Paraná (Pasquini e Bitencourt, 2004).

Dois tipos de AA foram descritos: hereditária e adquirida (Epstein *et al.*, 1997). Na primeira, há uma associação a determinadas doenças genéticas como, por exemplo, a anemia de Fanconi, disceratose congênita, síndrome de Diamond-Blackfan e síndrome de Shwachman-Diamond (Shimamura, 2006). Diferentemente destes distúrbios que apresentam mecanismos genéticos, a AA adquirida é considerada uma doença autoimune em que o tecido hematopoético é alvo de um processo de expansão oligoclonal de células T citotóxicas tipo I. Essas células secretam interferon- γ e fator de necrose tumoral α , causando apoptose das células hematopoéticas (Young *et al.*, 2008). Embora a AA adquirida tenha sido associada à exposição a diferentes agentes químicos, biológicos ou radioativos, na maioria dos casos não foi identificada uma causa concreta (Young *et al.*, 2006). O mecanismo de ativação das células T não é totalmente compreendido, porém alguns fatores genéticos como polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) nos genes do fator de necrose tumoral α (Demeter *et al.*, 2002; Peng *et al.*, 2003) e do interferon- γ (Dufour *et al.*, 2004) poderiam contribuir ao processo (Savage e Bertuch, 2010).

Contudo, não existem testes diagnósticos diferenciais para a AA imunomediada, sendo que a distinção entre a forma adquirida e hereditária influencia diretamente no prognóstico, terapia e aconselhamento dos pacientes (Savage e Bertuch, 2010). Clinicamente, tanto a forma adquirida quanto a hereditária levam ao desenvolvimento de um quadro de falência medular e pancitopenia grave. Uma ferramenta importante para auxiliar no diagnóstico diferencial é a medição do comprimento dos telômeros (Gadalla e Savage, 2011).

1.2. Telômeros e anemia aplástica

Telômeros são estruturas nas extremidades dos cromossomos lineares constituídas por centenas a milhares de sequências nucleotídicas hexaméricas em tandem (TTAGGG) associadas a

um conjunto de proteínas (*shelterin*) (Blackburn, 2001; De Lange, 2005). Essas estruturas têm a função de proteger o DNA contra degradação, fusão cromossômica e recombinação, já que propiciam distinção entre as extremidades dos cromossomos e as quebras de fita dupla no DNA. Em decorrência da incapacidade da DNA polimerase de reproduzir a extremidade 3' da molécula linear, um segmento de DNA das extremidades cromossômicas é perdido a cada ciclo de divisão mitótica (Cong *et al.*, 2002). Com isso, há o encurtamento progressivo dos telômeros com as divisões celulares mitóticas (Counter *et al.*, 1992; Harley *et al.*, 1990; Hastie *et al.*, 1990; Levy *et al.*, 1992; Lindsey *et al.*, 1991). O encurtamento crítico dos telômeros resulta em um déficit de proliferação celular seguido de senescência e apoptose, assim como instabilidade genômica das células (Stewart e Weinberg, 2000). A integridade dos telômeros é mantida em células com alta capacidade proliferativa, como células-tronco e progenitores, pelo complexo ribonucleoproteico telomerase. O complexo da telomerase é constituído pela enzima telomerase transcriptase reversa (TERT) e por um molde de RNA (TERC), além de outras proteínas que estabilizam o complexo (Cong *et al.*, 2002; Harrington, 2003). Uma pequena região de TERC é copiada por TERT em DNA telomérico estendendo, assim, a porção 3' do cromossomo (Lingner *et al.*, 1997; Pogacic *et al.*, 2000).

A elevada taxa de proliferação das células hematopoéticas faz com que doenças associadas aos telômeros se manifestem marcadamente na medula óssea. Assim, fica evidente que telômeros curtos causam defeitos quantitativos e nas CTHs, provocando a depleção das mesmas (Parry *et al.*, 2011).

Dentre as doenças associadas a AA de origem genético, são mais comuns a anemia de Fanconi e a disceratose congênita (Young e Alter, 1994) esta última causada pela mutação do gene *DKC1* que codifica uma proteína associada ao complexo da telomerase (Heiss *et al.*, 1998). Os telômeros desses pacientes são curtos e a atividade telomerase é diminuída (Mitchell *et al.*, 1999) e também foram reportados casos de mutações em *TERC* (Vulliamy *et al.*, 2001). Telômeros curtos também são evidentes em 1/3 dos pacientes com AA adquirida, com maior incidência em aqueles que não respondem a tratamento imunossupressor (Brümmendorf *et al.*, 2001). Embora as mutações em *TERC* não sejam frequentes, (Calado *et al.*, 2002) já foram encontradas em pacientes

diagnosticados com anemia aplástica aparente (Fogarty *et al.*, 2003).

Portanto, a principal aplicação da medida do comprimento telomérico na AA é a distinção entre suas formas (adquirida e hereditária). Na AA hereditária, o desenvolvimento da doença é secundário a mutações em *TERC* ou *TERT* (Gadalla e Savage, 2011), sendo essencial considerar a disfunção telomérica como causa principal da aplasia medular. Indivíduos com AA, seja adquirida ou relacionada à disfunção telomérica, apresentam um quadro clínico semelhante. Contudo, para a forma adquirida, a primeira linha de tratamento é a terapia imunossupressora. No caso dos pacientes que não respondem à imunossupressão, o transplante de medula óssea é o único meio de tratamento (Gramatges e Bertuch, 2013). Por outro lado, encurtamento telomérico foi observado em células mononucleares e granulócitos em pelo menos um terço dos pacientes diagnosticados com AA adquirida, em especial naqueles que não respondem ao tratamento imunossupressor (Brümmendorf, Maciejewski *et al.*, 2001; Gramatges e Bertuch, 2013). Assim, há a necessidade de se estabelecer diagnósticos mais precisos de maneira a providenciar o tratamento mais adequado aos pacientes.

Em seu estado grave, a AA é quase sempre fatal quando não tratada, devido a infecções e complicações hemorrágicas. Atualmente, existem duas opções de tratamento que visam restaurar a hematopoese. O tratamento é escolhido de acordo com a idade do paciente, presença de doador histocompatível e comorbidades. No caso de crianças e adultos até 40 anos com doador compatível, recomenda-se o transplante alogênico de medula óssea (Scheinberg e Young, 2012). A unidade funcional do transplante é a CTH por possuir propriedades de autorrenovação, diferenciação em múltiplas linhagens, colonização de nichos hematopoéticos (fígado fetal e medula óssea adulta), assim como de reconstituir em longo prazo todas as linhagens sanguíneas após transplante (Ema *et al.*, 2006; Orkin e Zon, 2008). Contudo, as únicas fontes disponíveis de CTHs são medula óssea, sangue de cordão umbilical e periférico. Apesar deste tratamento apresentar mais de 80% de chance de sucesso, o mesmo é limitado a menos da metade dos pacientes devido à falta de doador compatível e idade. No entanto, em pacientes com mais de 40 anos, é preferível a terapia imunossupressora utilizando-se globulina antitimocítica (*horse*-ATG) e ciclosporina (CsA). Não obstante resposta hematológica seja observada em 60 a 70% dos

pacientes, é sabido que 30 a 40% dos que tiveram resposta apresentam recaída. Ademais, existe a possibilidade de acontecer evolução clonal maligna para mielodisplasia e leucemia aguda (Scheinberg *et al.*, 2014; Scheinberg e Young, 2012; Young, Calado *et al.*, 2006). Assim, uma porcentagem significativa de pacientes não se favorece dos tratamentos disponíveis, o que sugere que novas alternativas de tratamento devam ser desenvolvidas.

1.3. Células-tronco pluripotentes

As células-tronco embrionárias (CTEs) são derivadas da massa celular interna de blastocistos de mamíferos. As CTEs são pluripotentes, ou seja, possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos de células somáticas e germinativas, exceto tecidos extraembrionários. Outra propriedade importante das CTEs é a sua capacidade replicativa ilimitada *in vitro*, equivalente às células tumorais, sem apresentar alterações no cariótipo (Thomson *et al.*, 1998). As CTEs foram extraídas de blastocistos de camundongo pela primeira vez em 1981 (Evans e Kaufman, 1981) e estabilizadas em cultura em 1998 por Thomson e colaboradores (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998). Essas células cultivadas *in vitro* apresentam núcleos maiores do que o citoplasma, nucléolos aumentados e crescimento em colônias (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998). As CTEs podem ser diferenciadas *in vitro* em diversos tipos celulares derivados dos três folhetos embrionários: mesoderme, ectoderme e endoderme (Pereira, 2006). Embora sejam consideradas fontes promissoras para terapia celular por apresentarem um estado pluripotente, restrições éticas são associadas às CTEs já que sua obtenção envolve a destruição de embriões humanos. Além disso, outros fatores como rejeição tecidual pós-transplante, possibilidade de formação de tumores e instabilidade cromossômica são considerados pontos negativos no uso das CTEs como fonte de células para terapia (Pereira, 2006). O estado de pluripotência que apresentam as CTEs é regulado por vários fatores de transcrição (FT) encarregados de reprimir a diferenciação (Chambers *et al.*, 2003). Dentre os fatores considerados mais importantes nessa função, *NANOG* (*Nanog homeobox*), *OCT4* (*Octamer-binding transcription fator 4*) e *SOX2* (*SRY-related high-mobility group (HMG)-box-2*) são considerados fatores chave na manutenção do estado indiferenciado das

CTEs. Os três fatores interagem para manter seus níveis de expressão regulados, sendo capazes de ativar genes envolvidos na manutenção da pluripotência e reprimir a expressão de genes relacionados à diferenciação (Jung *et al.*, 2010; Macarthur *et al.*, 2009). Conforme o desenvolvimento embrionário avança, o perfil de expressão gênica das CTEs é alterado e há diminuição ou inibição da expressão dos genes relacionados à pluripotência e autorrenovação, o que causa uma redução progressiva do potencial de diferenciação dessas células (Chambers, Colby *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003).

Além da expressão dos fatores de transcrição acima descritos, as CTEs apresentam marcadores de superfície característicos do seu estado pluripotente tais como *stage-specific embryonic antigen* (SSEA)-3, SSEA-4, e os antígenos keratan sulfato TRA-1-60, TRA-1-81 (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998).

1.4. Células de pluripotência induzida (iPSCs)

Em 2006, a indução de pluripotência em fibroblastos embrionários e adultos de camundongo foi demonstrada pela primeira vez através da transdução mediada por retrovírus de quatro fatores de transcrição *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* e *MYC* e (*Kruppel-like factor-4*), referidos como OKSM. Estas células foram denominadas iPSCs, do inglês *induced Pluripotent Stem Cells* (células-tonco pluripotentes induzidas). As iPSCs assemelham-se às CTEs em morfologia, expressão de genes de pluripotência e a capacidade de se diferenciarem em células dos três folhetos germinativos *in vitro* e *in vivo* (Takahashi e Yamanaka, 2006). A indução da superexpressão dos genes foi realizada através de vetores retrovirais, que são capazes de se integrar no material genético da célula-alvo e permitem a expressão estável dos transgenes. As primeiras iPSCs humanas foram geradas pouco tempo depois, utilizando os mesmos genes descritos para as células murinas (OKSM) (Park, Zhao, *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*, 2007) e, também a partir de um novo conjunto de genes (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG* e *LIN28*) (Yu *et al.*, 2007), sugerindo que diferentes fatores são capazes de promover a reprogramação. A partir desses trabalhos, diversas estratégias para a geração de iPSCs foram desenvolvidas por vários grupos combinando genes envolvidos na manutenção da

pluripotência em diferentes células somáticas (Aoi *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008).

A reprogramação de células somáticas para um estado pluripotente a partir da superexpressão de FT representou uma grande promessa para a terapia celular já que essa técnica superou algumas das limitações que as CTEs apresentavam como, por exemplo, a utilização de embriões (Hochedlinger e Jaenisch, 2006). Além de não enfrentar as questões éticas envolvidas no uso de embriões humanos, esta tecnologia permitiu o desenvolvimento de células pluripotentes a partir de células somáticas do próprio paciente apenas com o uso de genes exógenos.

O potencial terapêutico das iPSCs tem sido demonstrado por vários grupos de pesquisa (Narazaki *et al.*, 2008; Park, Arora, *et al.*, 2008; Tateishi *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009). Hanna e colaboradores mostraram que camundongos com anemia falciforme podiam ser tratados com células hematopoéticas produzidas a partir de iPSCs autólogas. O defeito genético foi previamente reparado por recombinação homóloga e logo as células foram diferenciadas *in vitro* em progenitoras hematopoéticas. Quando transplantadas em camundongos, diminuíram os sintomas da anemia (Hanna *et al.*, 2007). Também foi demonstrado o uso terapêutico de iPSCs em doença de Parkinson, onde fibroblastos reprogramados foram diferenciados em células neuronais e gliais. Após estas células serem transplantadas em cérebros de fetos de camundongo, integraram-se em várias regiões do cérebro. Foram também gerados neurônios dopaminérgicos provenientes de iPSCs os quais, quando transplantados no cérebro de ratos adultos, diminuíram alguns dos sintomas do Parkinson (Wernig, Zhao *et al.*, 2008). Apesar das iPSCs representarem uma grande fonte de células para terapia, diversos obstáculos que inviabilizam sua aplicação clínica devem ser superados. Dentre eles, está o uso de vetores virais no procedimento de transdução gênica, e o consequente risco de mutagênese insercional ou reativação de oncogenes como *MYC* (Scheper e Copray, 2009).

A primeira aplicação clínica em humanos foi realizada em 2014, onde uma mulher japonesa de 70 anos com doença macular regenerativa foi transplantada com células de retina produzidas a partir dos próprios fibroblastos reprogramados em iPSCs. Este experimento pioneiro foi realizado a fim de testar possíveis rejeições por parte do sistema imune ou crescimento canceroso (Reardon S,

Cyranoski D. Japan stem-cell trial stirs envy. *Nature* 2014; 513: 287–288). Outros benefícios das iPSCs humanas incluem o entendimento dos mecanismos de doenças, o teste de tratamentos e de drogas. Entretanto, metodologias capazes de gerar iPSCs clinicamente seguras devem ser desenvolvidas para que essas células possam ser utilizadas em medicina regenerativa (Takahashi, Tanabe *et al.*, 2007).

1.5. Métodos para geração de iPSCs

O método convencional de geração de iPSCs é baseado na utilização de retrovírus (gama retrovírus ou lentivírus) para integrar os transegenes nas células alvo. Esse método é comumente escolhido por apresentar elevada eficiência de transdução. Porém, a técnica pioneira de reprogramação celular por gama retrovírus e lentivírus apresentam a desvantagem da integração de DNA exógeno no genoma das células parentais (Takahashi e Yamanaka, 2006; Yu, Vodyanik *et al.*, 2007).

Os vetores lentivirais são conformados de sequências derivadas do vírus da imunodeficiência humana HIV-1 contendo genes como *gag* (que expressa proteínas estruturais), *pol* (enzimas ligadas ao RNA de fita simples) e *env* (que codifica o envelope viral). Da mesma forma, há genes que expressam enzimas funcionais ao processo de replicação como a transcriptase reversa encarregada de transcrever o RNA viral em DNA, enzimas integrases que auxiliam a integração do DNA proviral no genoma da célula hospedeira, e proteases que clivam gag-pol (Escors e Breckpot, 2010; Katz e Skalka, 1994). As regiões regulatórias do genoma viral são constituídas por sequências LTR, do inglês, *Long Terminal Repeat*, responsáveis pela integração no DNA viral no genoma da célula hospedeira. O processo de infecção começa com a fusão do envelope viral à membrana da célula hospedeira. Logo após, o núcleo viral ingressa no citoplasma da célula hospedeira onde o RNA viral é transcrito e transportado para o núcleo e, com auxílio das integrases, inserido no DNA hospedeiro (Freed, 2001).

Embora a metodologia lentiviral seja integrativa, foi desenvolvida uma alternativa com o intuito de aumentar a eficiência da reprogramação através da utilização de sequências de expressão

policistrônica, capazes de expressar múltiplos genes simultaneamente. Para isso, foi desenvolvido um vetor lentiviral denominado STEMCCA (Sommer *et al.*, 2009) contendo um cassete de integração conformado pelos quatro FT OKSM separados por sequências de auto-clivagem 2-A e sequências IRES para ligação a ribossomos, dirigidas pelo promotor constitutivo EF-1 α . O STEMCCA, além de permitir uma alta eficiência de geração de iPSCs, diminui o número de integrações virais (Sommer, Stadtfeld *et al.*, 2009). Além disso, essa construção lentiviral pode ser excisada por meio de DNA recombinases (sistema Cre/LoxP). Assim, depois que as células somáticas são reprogramadas e as colônias de iPSCs são formadas, os transgenes são deletados do seu genoma (Soldner *et al.*, 2009; Sommer, Stadtfeld *et al.*, 2009).

Da mesma forma, outras estratégias de reprogramação tem sido desenvolvidas para superar o obstáculo da integração através de diferentes graus de manipulação no genoma. Estas metodologias consistem na utilização de vetores que não se integram no genoma, como o caso de repetidas transfecções com plasmídeos. Entretanto, a eficiência da técnica foi considerada muito baixa (Okita *et al.*, 2008). Vetores pequenos sem DNA bacterial foram utilizados atingindo alta eficiência de reprogramação (Jia *et al.*, 2010), assim como vírus não integrativos como adenovírus (Stadtfeld *et al.*, 2008), ou Sendai vírus (Fusaki *et al.*, 2009). Finalmente, métodos não genéticos como translocação de pequenas moléculas foram desenvolvidos, os quais são capazes de interferir em vias de sinalização (Huangfu *et al.*, 2008; Mikkelsen *et al.*, 2008), transfecção repetida com mRNA sintético (Yakubov *et al.*, 2010), ou uso de proteínas de reprogramação (Zhou *et al.*, 2009).

Embora a primeira metodologia de reprogramação com plasmídeos epissomais precisasse de vários ciclos de transfecção devido à sua incapacidade de replicação em células de mamíferos (Okita, Nakagawa *et al.*, 2008), posteriormente, foram desenvolvidos plasmídeos epissomais conformados pelo gene *EBNA1* e a sequência OriP do vírus Epstein-Barr (EBV) proporcionando aos plasmídeos autonomia de replicação (Lindner e Sugden, 2007). Mesmo assim, foi demonstrada uma eficiência de reprogramação baixa de 3-6/10⁶ fibroblastos humanos de neonato (Yu *et al.*, 2009). Além disso, são requeridos mais fatores do que os quatro convencionais (OKSM) (Chou *et al.*, 2011; Hu *et al.*, 2011; Yu, Hu *et al.*, 2009). Por outro lado, foi demonstrado que a eficiência de reprogramação epissomal pode ser aumentada utilizando-se células progenitoras do sangue como

alvo (Chou, Mali *et al.*, 2011; Hu e Slukvin, 2013; Hu, Yu *et al.*, 2011). O grupo de Linzhao (Chou, Mali *et al.*, 2011) conseguiu gerar iPSCs genômicamente íntegras utilizando cinco genes murinos de expressão poliestrônica (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *Myc* e *Lin28*) em um único plasmídeo EBNA1/OriP. As células reprogramadas foram CD34⁺ e eritroblastos de sangue periférico. O cultivo em meio específico para estimular a proliferação de determinadas subpopulações é preferível à utilização de células mononucleares (MNCs, do inglês *mononuclear cells*) em sua totalidade, já que a subpopulação de células T é a que mais abunda neste conjunto de células. As células T contêm rearranjos somáticos V(D)J nos *loci* dos receptores TCR do inglês (*T cell receptor*) e não se conhecem com exatidão os possíveis efeitos desses rearranjos nas iPSCs e nos processos de diferenciação (Serwold *et al.*, 2007; Yamanaka, 2010).

Novas combinações mais eficientes de plasmídeos foram reportadas baseadas em achados prévios que demonstraram que a repressão de p53 aumenta a eficácia da reprogramação e *L-MYC* é mais específico do que *C-MYC* (também conhecido como *MYC*) (Nakagawa *et al.*, 2010). Com isso, os genes utilizados por esse grupo foram *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28* e shRNA (do inglês, *short hairpin RNA*) para p53 em três plasmídeos; as células reprogramadas foram fibroblastos humanos e células de polpa dentária. Mais tarde, o mesmo grupo publicou a geração de iPSCs com um incremento na eficiência de reprogramação a partir de células CD34⁺ de sangue de cordão e periférico de doadores saudáveis. Este aumento na eficiência foi proporcionado pela adição do gene *EBNA1* que expressa a proteína a partir de seu próprio promotor viral. Esta proteína reconhece a sequência OriP e induz a amplificação do plasmídeo que coincide com a replicação da célula hospedeira, permitindo uma alta e duradoura expressão dos fatores de reprogramação. A eficiência da reprogramação obtida nesse trabalho foi maior que 0,1% (Okita *et al.*, 2013).

1.6. Dinâmica dos telômeros nas iPSCs

Células somáticas não expressam telomerase, levando ao encurtamento dos telômeros ao longo dos ciclos de divisão mitótica, as quais entram em senescência depois de um determinado número de divisões celulares (Hayflick e Moorhead, 1961). Já as CTEs expressam altos níveis de

telomerase (Thomson, Itskovitz-Eldor *et al.*, 1998). A expressão de telomerase é relacionada à imortalidade de linhagens celulares, e a reintrodução de telomerase em linhagens de células somáticas humanas prolonga a vida útil das mesmas (Bodnar *et al.*, 1998).

Durante o processo de reprogramação, foi observado que fibroblastos de camundongos adultos expressaram níveis de *Tert* e especialmente *Terc* desde o dia 5 ao dia 15 pós-transfecção. Entretanto, os genes de pluripotência *Sox2* e *Nanog* permanecem praticamente inexpressivos, *Klf4* se apresenta pouco induzido a partir do dia 5 e *Oct4* aumenta sua expressão a partir do dia 15, em comparação aos fibroblastos originais. Quando os níveis de expressão desses genes são comparados aos níveis de expressão em CTEs do mesmo *background* genético, esses níveis são menores nas células reprogramadas. Assim, foi evidenciado leve alongamento telomérico desde o dia 10 ao 15 quando surgiram as primeiras colônias. Estes resultados indicam que a expressão exógena dos 4 FT ativa primeiro a *Terc* e *Tert* e depois aos genes endógenos de pluripotência. Por outro lado, demonstraram que a expressão de telomerase é instável entre as linhagens de iPSCs e também pode diminuir com as passagens provocando queda no comprimento telomérico. Adicionalmente, mostraram que em fibroblastos de camundongos *Terc*^{-/-} a ausência de atividade da telomerase não afeta a indução da pluripotência, porém resulta essencial na autorrenovação, manutenção dos telômeros e estabilidade cromossômica. Da mesma forma, na ausência ou expressão diminuída de telomerase, mecanismos independentes como a recombinação de cromátides irmãs, funcionam na manutenção dos telômeros. Este mecanismo alternativo está mais ativo em células com telômeros mais curtos. Finalmente, observaram que diferentes linhagens de iPSCs com diferentes níveis de atividade telomerase e comprimentos teloméricos, conseguem adquirir características pluripotentes semelhantes às CTEs, mas quando testadas funcionalmente em ensaios de formação de quimeras, apenas as iPSCs com telômeros mais longos conseguem se integrar à progênie. Estes dados sugerem que o comprimento telomérico está relacionado com células pluripotentes completamente reprogramadas (Wang *et al.*, 2012).

O presente trabalho objetivou induzir pluripotência em células somáticas de pacientes diagnosticados com AA adquirida. Após demonstrar suas características pluripotentes similares às CTEs como morfologia, expressão gênica e diferenciação *in vitro*, a dinâmica do comprimento

telomérico foi avaliada mediante uma metodologia diferente às comumente utilizadas para iPSCs, o flow-FISH. A partir das células reprogramadas, dispostemos de uma fonte promissora de células paciente-específicas como modelo de estudo da AA adquirida, o que pode ser útil na procura de tratamentos mais convenientes e efetivos. Futuramente as iPSCs dos pacientes também poderão ser diferenciadas em células hematopoéticas, na tentativa de obter uma nova fonte de células progenitoras para tratamento da AA grave.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a capacidade de reprogramação de células de pacientes com anemia aplástica (AA) adquirida em células de pluripotência induzida (iPSCs).

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer cultivos de células somáticas de pacientes com AA adquirida;
- Reprogramar células somáticas de pacientes com AA adquirida em iPSCs;
- Avaliar as características de pluripotência das iPSCs geradas;
- Avaliar a dinâmica telomérica das iPSCs dos pacientes com AA adquirida.

3.METODOLOGIA

3.1. Casuística

Para realização do estudo, foram selecionados pacientes do Hemocentro de Ribeirão Preto, diagnosticados com AA adquirida após aprovação da proposta pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), processo n° 6212/2014 (**Anexo 1**). O diagnóstico dos pacientes foi baseado nos critérios de análise de contagem de células sanguíneas com presença de pelo menos duas citopenias: hemoglobina <10g/dL, neutrófilos <1500/ μ L e/ou plaquetas <50.000/ μ L; além disso, os pacientes recrutados deveriam apresentar medula óssea hipocelular evidenciada por biópsia e comprimento telomérico normal (ajustado para a idade), a fim de excluir a AA hereditária. Idade, sexo ou etnia dos pacientes não foram considerados critérios de exclusão. Amostras de sangue periférico e biópsia de pele foram coletadas de quatro pacientes (identificados como AA-01 a AA-07, onde as siglas AA são referentes à doença: anemia aplástica, e a numeração de 01 a 07, a cada um dos quatro pacientes) e de um controle saudável (Ctrl-01) após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**).

3.2. Plasmídeos

- **STEMCCA e STEMCCA-RedLight**: cedidos pelo Dr. Thomas Winkler (NIH). Procedência: G. Mostoslavsky (Boston University, Boston, MA, USA).
- **psPAX2 e pMD2.G**: cedidos pelo Dr. Thomas Winkler (NIH). Procedência: Addgene (Cambridge, MA, USA).
- **RC-CMV-Rev1b, HDM-tat1b, HDM-Hgpm2 e HDM-VSV-G**: cedidos pela Dra. Fabiana F. Bressan (USP, Pirassununga). Procedência: G. Mostoslavsky (Boston University, Boston, MA, USA).

3.3. Linhagens celulares

As linhagens utilizadas no presente trabalho são aderentes.

- **293FT**: célula derivada de rim de embrião humano transformada com adenovírus humano tipo 5 e expressão estável do antígeno SV40 (Invitrogen).
- **HeLa**: célula derivada de adenocarcinoma cervical. Foi obtida da *American Type Culture Collection*, ATCC (Manassas, VA, USA).

3.4. Cultivo e manutenção de linhagens celulares aderentes

3.4.1. Contagem de células em câmara de Neubauer:

Um volume de 10 μL de células individualizadas foi diluído em corante tripan azul ou vermelho para contagem e determinação da viabilidade. Para isso, 10 μL da mistura foram aplicados em um dos quadrantes da câmara de Neubauer. A continuação, todas as células foram contadas (coradas e não coradas) dos quatro quadrantes dos vértices, utilizando microscópio estereoscópico com aumento de 20X. As células coradas são não viáveis.

O cálculo para determinar a quantidade de células por mL foi realizado a partir da seguinte fórmula: $n^\circ \text{células/mL} = n^\circ \text{total células viáveis} / n^\circ \text{de quadrantes contados} \times \text{fator de diluição} \times 10.000$. O número 10.000 surge da seguinte dedução: $1 \text{ mL} = 1 \text{ cc}$; $1 \text{ cc} = 10 \times 10 \times 10 \text{ mm} = 1.000 \text{ mm}^3$ e, como na câmara de Neubauer obtemos um número de células por $0,1 \text{ mm}^3$ é preciso multiplicar por 10, então: $10 \times 1.000 = 10.000$.

A viabilidade foi calculada com a seguinte fórmula: $\text{viabilidade} = \text{células viáveis} / \text{células viáveis} + \text{células inviáveis}$.

3.4.2. Descongelamento:

Prévio ao descongelamento, foi preparado um tubo com 9 mL de médio de cultivo específico para cada linhagem e colocado para aquecer em banho seco a 37°C .

As células foram conservadas em volume final de 1 mL em tubos de 1,5 mL próprios para congelamento em nitrogênio líquido. Para descongelamento, o tubo contendo as células foi retirado, transportado em gelo seco e colocado imediatamente em banho-maria a 37°C durante aproximadamente 2 min até descongelamento completo. Em seguida, foi realizada assepsia do tubo com 70% etanol e colocado em ambiente estéril (cabine de luxo laminar) onde as células foram retiradas do tubo com pipeta e despejadas lentamente no meio pré-aquecido a 37°C . A continuação, o tubo foi centrifugado a $250 \times g$ por 5 min, descartado o sobrenadante e o *pellet* celular foi ressuspendido delicadamente em um determinado volume de meio para manter uma densidade adequada à superfície de cultivo do frasco ou placa utilizado. As células foram homogeneizadas e colocadas em estufa a 37°C , 5% CO_2 .

3.4.3. Repique:

Uma vez as células em confluência de 70%, o meio de cultivo foi retirado e o frasco enxaguado uma vez com PBS (do inglês, *Phosphate-buffered saline*) (Gibco) para retirar os restos de soro bovino fetal (SBF) presentes no meio de cultivo que poderiam inibir a ação enzimática da tripsina. A continuação foi adicionada solução de 0,05% tripsina em 1 mM EDTA (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*) (Gibco) e as células incubadas

por 5 min a 37°C. Após esse período de tempo, foi verificado através de microscópio invertido se as células tinham soltado da placa. Nesse caso, a ação da tripsina foi inativada por adição de meio de cultivo suplementado com 10% SBF, e caso contrário, a placa foi levada para estufa a 37°C por mais 1 min.

3.4.4. Congelamento:

Um número total dentre 5×10^5 e 2×10^6 células individualizadas após tratamento com 0,05% tripsina-EDTA foram ressuspensas em 500 µL de meio de cultivo e colocadas em tubo de congelamento. Seguidamente, foi adicionado mais 500 µL de 20% DMSO (Dimetilsulfóxido) em SBF, ficando o DMSO a uma concentração final de 10%. Uma vez o tubo homogeneizado foi colocado em sistema de criopreservação *CoolCell* (Biocision) que diminui gradualmente a temperatura (1°C/min) quando conservado a -80°C. Para conservação por longos períodos de tempo, as células foram armazenadas em nitrogênio líquido.

3.4.5. Teste de detecção de micoplasma:

Para detecção de micoplasma foi utilizado o *MycoAlert™ mycoplasma detection kit* (Lonza, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foi coletado 1 mL de sobrenadante da cultura celular sem antibiótico e com dois dias de contato com as células. A amostra foi centrifugada a $200 \times g$ durante 5 min para sedimentar qualquer resto celular. Logo, 100 µL do sobrenadante foi colocado numa placa de 96 poços para luminômetro junto com 100 µL do reagente *MycoAlert™*. Depois de 5 minutos, foi realizada a leitura A no luminômetro. Seguidamente, foi colocado 100 µL do substrato *MycoAlert™* e depois de 10 min foi realizada a leitura B. Se a amostra estiver contaminada, enzimas do micoplasma reagem com o substrato *MycoAlert™* e convertem ADP em ATP. O aumento da concentração de ATP pode ser detectado mediante a seguinte reação bioluminescente:

Por tanto, se a amostra em análise tiver contaminação com micoplasma, haverá um aumento de ATP em presença do substrato *MycoAlert™* que será detectada em forma de luz pelo luminômetro.

A partir das duas leituras, foi calculada a relação leitura B/leitura A e o resultado foi interpretado de acordo com a **Tabela 1**:

Tabela 1. Interpretação dos resultados do teste de micoplasma.

Relação	Interpretação
< 0,9	Negativo para micoplasma
0,9 – 1,2	Inconclusivo: colocar células em quarentena e testar em 24 horas
> 1,2	Contaminação com micoplasma

3.5. Reprogramação de fibroblastos humanos com lentivírus

3.5.1. Obtenção e cultivo de fibroblastos humanos

Fibroblastos dermais foram obtidos de biópsia de 0,4 cm da região posterior do braço. O tecido foi coletado em PBS, seccionado em fragmentos e colocado em solução contendo 9 mL de colagenase IV (5 mg/mL), 1 mL de dispase (2,5 U/mL) (Gibco) e 40 µL de DNaseI (10 U/µL) (Invitrogen), e mantido em estufa a 37°C, 5% CO₂ com agitação durante 50 min. Após esse período de tempo, foi adicionado 5 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose* (Sigma) com 20% de (SBF) (Gibco) para inibir a ação enzimática. Cada fragmento de tecido foi colocado em um poço de placa de 6 poços e coberto com lamínula de 24×24 mm exercendo uma leve pressão. Foi adicionado 1,5 mL de meio DMEM *low glucose* com 20% de SBF e 1% de penicilina-streptomicina (Gibco). A placa foi mantida em estufa a 37°C para crescimento dos fibroblastos, os quais, uma vez confluentes, foram transferidos para frascos de cultivo e expandidos. Após realização de teste de detecção de *Mycoplasma* spp com o kit *MycoAlert Mycoplasma Detection* (Lonza), as culturas de fibroblastos negativas para contaminação foram congeladas e conservadas em nitrogênio líquido.

3.5.2. Obtenção e cultivo de fibroblastos embrionários murinos (MEFs)

Os fibroblastos embrionários de camundongo, do inglês: *Mouse Embryonic Fibroblasts* (MEFs) são utilizados como camada alimentadora para permitir o crescimento e manutenção das iPSCs.

Para obtenção dos MEFs, fetos de fêmea Balb/c com 13 dias de gestação foram coletados, lavados em PBS e descartados a cabeça e órgãos vermelhos. O tecido restante foi fragmentado com bisturi e colocado em solução de 0,05% tripsina-EDTA a 37°C por

10 min e homogeneizado até dissociação completa. A tripsina foi inativada por adição de meio DMEM *high glucose* (Gibco) com 10% de SBF. As células foram colocadas em tubo de 15 mL e centrifugadas a $350 \times g$ por 8 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em 2 mL de meio fresco e transferido para placa de cultivo de 10 cm² adicionando mais 8 mL de meio. As placas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% CO₂, expandidas até a passagem 2 (p2) e finalmente conservadas em nitrogênio líquido após realização de teste de detecção de *Mycoplasma* spp (Lonza). O procedimento para obtenção de MEFs foi realizado após aprovação da proposta pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), protocolo n° 018/2014 (**Anexo 3**).

3.5.3. Inativação mitótica de MEFs por raios X

MEFs em p2 foram descongeladas e expandidas em meio DMEM *high glucose* com 10% de SBF até p4. Um total de aproximadamente 25×10^6 células foi removido enzimaticamente dos frascos de cultivo utilizando 0,05% tripsina-EDTA a 37°C por 5 min. MEFs foram expostos a uma dose de 40 Gy em irradiador RAD SOURCE, modelo RS 2000 *Biological System* a fim de inativar a divisão celular. Após a irradiação, as células foram centrifugadas e conservadas em nitrogênio líquido em alíquotas de 2×10^6 células/vial.

Para cultivo de iPSCs sobre monocamada de MEFs, as placas de com MEFs foram preparadas com um dia de antecedência. Para isso, antes de descongelar as MEFs, as placas de cultivo foram tratadas com 0,1% de gelatina (Sigma) durante 1 h a 37°C. A gelatina foi retirada de cada poço, foram adicionados 10^5 MEFs por poço (placa de 6 poços), os quais foram cultivados em meio DMEM *high glucose* suplementado com 10% de SBF e 1% de *nonessential amino acids* (NEAA) (Gibco). MEFs também foram testados para possível contaminação por *Mycoplasma* spp (Lonza), sendo descartados caso alguma contaminação fosse detectada.

3.5.4. Preparação de meio condicionado

Para obtenção de meio condicionado (MC) foram colocados 4×10^6 MEFs inativados em frascos de cultivo celular de 162 cm² contendo 40 mL de meio DMEM *high glucose*

suplementado com 10% de SBF e 1% de NEAA. No dia seguinte, o meio foi retirado e substituído por 40 mL de meio de cultivo F12 (DMEM/F12 [Gibco] suplementado com 20% de *Knockout serum replacement* [KSR, Invitrogen], 0,1 mM de NEAA, 1 mM de L-glutamina [Gibco] e 0,1 mM de 2-mercaptoetanol). Durante os próximos 10 dias, o meio em contato com as MEFs foi coletado diariamente, filtrado com filtro de 0,22 µm e conservado a -20°C. Para utilização, o MC conservado foi descongelado e suplementado com 10 ng/mL de *recombinant human fibroblast like growth factor-basic* (bFGF, Peprotech).

3.5.5. Produção de lentivírus

Com o intuito de reprogramar fibroblastos em células de pluripotência induzida, foram testadas duas metodologias de produção viral: A e B (**Tabela 2**). Apenas os vírus produzidos pela metodologia B foram utilizados em experimentos de transdução.

Estes procedimentos foram avaliados e aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), número de processo 297/2014.004-02 (**Anexo 4**).

Tabela 2. Metodologias A e B para produção de lentivírus.

	Metodologia A	Metodologia B
Vetores lentivirais	STEMCCA STEMCCA Red pMD2.G psPAX2	STEMCCA RC-CMV-Rev1b HDM-tat1b HDM-Hgpm2 HDM-VSV-G
Células empacotadoras	293FT	293FT
Reagente de transfecção	FuGENE 6	Lipofectamina 2000
Concentração dos vírus	Ultracentrifugação	Não
Titulação viral	Citometria de fluxo	Não
Transdução	Não	Sim

3.5.5.1. Produção de lentivírus: Metodologia A

3.5.5.1.1. Clonagem e digestão dos plasmídeos lentivirais

Na metodologia A, foram utilizados os plasmídeos lentivirais STEMCCA-LoxP (Sommer *et al.*, 2009) (portadores dos genes de pluripotência *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* e *MYC*), e STEMCCA-RedLight-LoxP (que contêm os genes *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* e o gene repórter *mCherry*), além dos vetores que codificam o envelope viral (pMD2.G) e proteínas empacotadoras (psPAX2). Cada plasmídeo foi clonado utilizando-se o *kit One Shot Stbl3 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen). O DNA plasmidial foi extraído das bactérias com *Plasmid Midi Kit* (Qiagen), quantificado e digerido com enzimas de restrição da Invitrogen e NEB (*New England Biolabs*) no caso de *HincII*, seguindo indicações do fabricante. As reações de digestão foram realizadas em volume final de 20 μ L contendo 500 ng de DNA plasmidial, 1 μ L de enzima (1 μ L de cada enzima no caso de digestões duplas), 2 μ L de tampão recomendado para cada enzima e água ultra-pura. As reações foram incubadas por 4 h a 37°C em banho-maria. O pMD2.G foi digerido em três reações diferentes, uma delas combiando *NotI* e *HindIII* e mais duas com as enzimas separadas; psPAX2 foi digerido com *BamHI* e *EcoRI*, separadamente, STEMCCA com a combinação de *BamHI* e *EcoRI* e finalmente o STEMCCA-RedLight apenas com *HincII*. No caso das reações onde foram utilizadas as enzimas *HincII* e *NotI* foi adicionado 2 μ L BSA (do inglês, *Bovine Serum Albumin*). As reações de digestão foram avaliadas através de gel de 1% agarose. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TAE (0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA) a 70 V por 60 min.

3.5.5.1.2. Cultivo e transfecção de células 293FT para produção de lentivírus

A linhagem 293FT livre de *Mycoplasma* spp. foi cultivada em meio DMEM *high glucose* suplementado com 10% SBF não inativado, 0,1 mM NEAA, 6 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio (Sigma), 500 μ g/mL geneticina (Gibco) e 1% penicilina-estreptomicina. Vinte e quatro horas antes da transfecção, 5×10^6 células foram colocadas em placas de cultivo de 10 cm². Em confluência de aproximadamente 70%, um grupo de placas foi transfectado com 2 μ g STEMCCA, 1,8 μ g psPAX2 e 0,2 μ g pMD2.G e, outro grupo, com 2 μ g STEMCCA RedLight, 1,8 μ g psPAX2 e 0,2 μ g pMD2.G, este último, para determinação do título viral. O reagente de transfecção utilizado foi FuGENE 6 (Promega), de acordo com as recomendações do fabricante. As células foram incubadas durante 48 h; o sobrenadante foi coletado, filtrado com filtro de 0,22 μ m e ultracentrifugado a $20.000 \times g$ por 4 h. Alíquotas de vírus não concentrado e concentrado foram coletadas e congeladas a -80°C para posterior determinação do título viral.

3.5.5.1.3. Titulação viral por citometria de fluxo

O número de partículas virais geradas foi estimado utilizando-se os vírus produzidos com o STEMCCA-RedLight (*mCherry*). Para isso, alíquotas de sobrenadante não concentrado (NC), 1× e 10× do sobrenadante concentrado (1×C e 10×C, respectivamente), foram utilizadas para transdução de células da linhagem HeLa. No dia prévio ao início do experimento, 3×10^4 células foram semeadas por poço em placa de 12 poços e cultivadas em meio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) com 10% de SBF. Para realizar a transdução, foram preparados quatro pontos de diluição para cada uma das três condições de sobrenadante viral (NC, 1×C e 10×C). Assim, cada sobrenadante foi diluído em meio de cultivo com 6 µg/mL de polibreno (Millipore) como detalhado nas **Tabelas 3 a 5**. Para cada condição, foi utilizada uma placa com 4 poços para os pontos de diluição (1-4), 2 poços para controle negativo (C-) (meio + polibreno) e 2 poços para contagem de células previamente à transdução (**Figura 1**).

Tabela 3. Pontos de diluição do sobrenadante NC.

C	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
Sobrenadante (µL)	90	400	400	400
Meio + polibreno (µL)	1410	600	600	600
Volume equivalente de sobrenadante/poço	30	12	4,8	1,92

Tabela 4. Pontos de diluição do sobrenadante 1×C.

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
Sobrenadante (µL)	6	400	400	400
Meio + polibreno (µL)	1494	600	600	600
Volume equivalente de sobrenadante/poço	2	0,8	0,32	0,128

Tabela 5. Pontos de diluição do sobrenadante 10×C.

	Ponto 1	Ponto 2	Ponto 3	Ponto 4
Sobrenadante (μL)	60	400	400	400
Meio + polibreno (μL)	1440	600	600	600
Volume equivalente de sobrenadante/poço	20	8	3,2	1,28

Figura 1. Desenho experimental da transdução em placa de 12 poços para cada condição de sobrenadante.(Ø): sem vírus,(C-): controle negativo.

Imediatamente antes da transdução, foi realizada contagem de células, cujos valores foram utilizados para calcular o título viral. Em seguida, o meio dos demais poços foi retirado e substituído por 500 μL de meio de transfecção. As placas foram mantidas em estufa a 37°C por 16 h. Em seguida, o meio de transfecção foi trocado por meio fresco e as células foram mantidas em cultura por 48 h. Para realização da citometria, as células foram retiradas do poço com solução de 0,05% de tripsina, colocadas em tubos de citometria, lavadas e ressuspensas em PBS para análise da porcentagem de fluorescência emitida pela expressão de *mCherry* (P%_{mCh}).

Para determinação do título viral foram realizados os seguintes cálculos:

P%_{mCh} corrigida = % células mCherry positivas – % células positivas no C-

Vírus total = n° células contadas × P%_{mCh} corrigida/100

Título (vírus/mL) = Vírus total/volume de sobrenadante × 1000 (para 1μL sobrenadante)

Média (vírus/mL) = $\sum_{i=1}^n \text{Título}(i)$, em que *i* representa cada um dos pontos de diluição, n = 4.

3.5.5.2. Produção de lentivírus: Metodologia B

3.5.5.2.1. Clonagem dos plasmídeos lentivirais

Os plasmídeos utilizados nesta metodologia foram novamente o STEMCCA e STEMCCA-RedLight, junto a uma combinação diferente de plasmídeos empacotadores HDM-Hgpm2, RC-CMV-Rev1b, HDM-tat1b e HDM-VSV-G.

Para a clonagem dos plasmídeos STEMCCA, foi utilizado o *kit One Shot Stbl3 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen) e para clonagem dos outros plasmídeos, o *kit One Shot TOP10 Chemically Competent E. coli* (Invitrogen) seguindo indicações do fabricante. O DNA plasmidial foi extraído das bactérias com *kit de Maxi prep Endotoxin free* (Qiagen), quantificado e conservado a -20°C.

3.5.5.2.2. Cultivo e transfecção de células 293FT para produção de lentivírus

A linhagem 293FT livre de *Mycoplasma* spp. foi cultivada em meio DMEM *high glucose* suplementado com 10% SBF não inativado, 0,1 mM NEAA, 6 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sódio, 500 µg/mL geneticina e 1% penicilina-estreptomicina. Vinte e quatro horas antes da transfecção, 5×10^6 células foram colocadas em frascos de cultivo de 75 cm² sem adição de antibióticos. Em confluência de aproximadamente 80%, células de dois frascos foram transfectadas com 12 µg hSTEMCCA e 1,2 µg RC-CMV-Rev1b, 1,2 µg HDM-tat1b, 1,2 µg HDM-Hgpm2 e 2,4 µg HDM-VSV-G. Para determinação do título viral, células de outro frasco foram transfectadas com 12 µg hSTEMCCA-RedLight em vez do hSTEMCCA. O reagente de transfecção utilizado foi Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. Após 16 h, o meio de transfecção foi substituído por meio de cultivo fresco. As células foram incubadas durante 72 h, o sobrenadante foi coletado e filtrado com filtro de 0,45 µm, e suplementado com 8 ng/mL de polibreno (Millipore) para proceder imediatamente com a transdução.

3.5.5.2.3. Transdução de fibroblastos

Um dia prévio à coleta dos vírus, 2×10^4 fibroblastos foram semeados por poço em placa de 6 poços. Para iniciar a transdução, o meio de cultivo dos fibroblastos foi retirado e substituído por 1 mL/poço de sobrenadante viral com polibreno, e incubado por 16 h. Passado esse tempo, o meio foi trocado diariamente por meio fresco com 10% SBF e 1% antibióticos durante 6 dias. No sexto dia, 2×10^4 fibroblastos transduzidos foram transferidos para poço de placa de 6 poços contendo MEFs irradiados em meio F12. O

meio de cultivo foi trocado a cada dois dias até o surgimento de colônias.

3.6. Reprogramação de eritroblastos humanos com plasmídeos episossomais

Os procedimentos de reprogramação episossomal foram avaliados e aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), número de processo 297/2015.006-01 (**Anexo 5**).

3.6.1. Clonagem e digestão dos plasmídeos episossomais

Bactérias transformadas contendo os plasmídeos pCE-hOCT3/4 (gene de pluripotência *OCT4*), pCE-hSK (genes *SOX2* e *KLF4*), pCE-hUL (genes *L-MYC* e *LIN28*), pCE-mp53DD (gene *p53*) e pCXB-EBNA1 (gene *EBNA1*) (Addgene) foram colocadas para crescer em placa de petri de 10 cm² com meio sólido LB (Luria-Bertani) contendo 100 µg/mL de ampicilina a 37°C *overnight* a fim de proporcionar apenas o crescimento de colônias resistentes a esse antibiótico. No dia seguinte, uma colônia de cada plasmídeo foi expandida em 100 mL de meio LB (Sigma) (100 µg/mL de ampicilina) a 37°C *overnight* com agitação de 125 rpm. O DNA plasmidial foi extraído das bactérias, utilizando-se *Plasmid Midi Kit* (Qiagen) seguindo as indicações do fabricante. Após a quantificação dos plasmídeos obtidos, estes foram digeridos com enzimas de restrição da Invitrogen seguindo recomendações do fabricante. As reações foram realizadas em volume final de 20 µL contendo 1 µL de enzima, 2 µL de tampão específico para cada enzima, 500 ng de DNA plasmidial e água ultra-pura. O plasmídeo pCE-hSK foi digerido com *XbaI*, pCE-hOCT3/4 com *HindIII*, **pCXB-EBNA1** e pCE-hUL com *BamHI* e pCE-mp53DD com *SpeI*. As reações de digestão foram avaliadas através de gel de 1% agarose. A corrida eletroforética foi realizada em tampão TAE (0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA) a 70 V por 60 min.

3.6.2. Separação de células mononucleares (MNCs)

Após coleta, 15 mL de sangue periférico foram diluídos em PBS na proporção 1:2 e adicionados lentamente em 15 mL de Ficoll (Sigma) à temperatura ambiente (TA). As amostras foram centrifugadas por 30 min a 700 × g, TA. A fração mononuclear foi retirada e lavada em PBS com 0,1% EDTA 0,5 M (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*) (Sigma). Em seguida, foi adicionado 5 mL de tampão de lise de glóbulos vermelhos (0,01 M bicarbonato de amônio e 1,44 M cloreto de amônio) por 10 min a TA. Foram realizadas mais quatro lavagens em PBS 0,1% EDTA de 10 min cada, com centrifugação

a $400 \times g$. As células foram contadas e congeladas em solução de 10% DMSO em SBF. As MNCs (do inglês: *mononuclear cells*) foram conservadas em nitrogênio líquido.

3.6.3. Expansão de eritroblastos

Eritroblastos foram expandidos seguindo-se o protocolo do Laboratório Nacional de Células-Tronco Embrionárias (LaNCE, USP, São Paulo, SP), gentilmente cedido pelo grupo da Professora Lygia da Veiga Pereira. As MNCs dos pacientes e do controle foram descongeladas em 5 mL de SBF, centrifugadas a $300 \times g$ por 10 min e contadas. Obteve-se os seguintes números iniciais de MNCs por alíquota descongelada: AA-01: 2×10^6 , AA-02: 3×10^6 , AA-03: 9×10^6 , AA-04: 6×10^6 e Ctrl-01: $5,5 \times 10^6$. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio de expansão de eritroblastos contendo StemSpan SFEN (StemCell Technologies) e suplementado com 40 ng/mL de IGF-1 (*Insulin-like growth factor 1*), 100 ng/mL de SCF (*Stem cell factor*), 10 ng/mL de IL-3 (*Interleukin-3*) (R&D Systems), 2 U/mL de EPO (Eritropoetina) e 1 μ M/mL de Dexametasona a uma concentração de 2×10^6 células/mL. O meio foi trocado a cada três dias durante nove dias, mantendo-se a concentração inicial de 2×10^6 células/mL nas duas primeiras trocas de meio, e mudando para 1×10^6 células/mL no nono dia. No décimo dia de expansão, procedeu-se com a transfecção.

3.6.4. Reprogramação de eritroblastos em iPSCs

A reprogramação episomal de eritroblastos foi realizada seguindo-se o protocolo do LaNCE. No décimo dia de expansão dos eritroblastos, as células foram lavadas em 10 mL de 0,5% BSA em PBS e centrifugadas a $200 \times g$ por 10 min. Durante o tempo de centrifugação, 82 μ L de solução *Nucleofector* e 18 μ L de suplemento, ambos providenciados no *kit Human CD34 Cell Nucleofector* (Lonza), foram combinados em tubo de 1,5 mL e mantidos a TA. O *pellet* celular foi homogeneizado com a solução anterior, no qual adicionou-se os plasmídeos episomais: 2,1 μ g de pCE-hOCT3/4, pCE-hSK, pCE-hUL, pCE-mp53DD e 1,6 μ g de pCXB-EBNA1. O conteúdo total do tubo foi transferido para cubeta de eletroporação do *kit*, evitando-se a formação de bolhas. A cubeta foi colocada no aparelho de nucleoporação *Amaga Nucleofector 2b* (Lonza), e aplicado o programa T-016. Em seguida, as células nucleoporadas foram transferidas delicadamente para um poço de placa de 12 poços contendo 2 mL de meio de expansão de eritroblastos acrescido de 20 ng/mL de bFGF. Seguidamente, a placa foi colocada em incubadora de hipóxia (5% O_2). No terceiro dia após a nucleoporação, as células foram lavadas em meio de eritroblastos e centrifugadas a $200 \times g$ por 5 min. O *pellet* foi

ressuspendido em 4 mL de meio DMEM *high glucose* com 10% SFB, 1% NEAA e 1% penicilina-streptomicina. O volume total foi dividido para dois poços de placa de 12 poços contendo MEFs irradiadas. A placa foi centrifugada a $200 \times g$ durante 30 min a 37°C para finalmente ser incubada em hipóxia. No quarto dia, o meio de MEFs foi substituído por meio F12 suplementado com 0,25 mM de butirato de sódio (NaB). A partir do dia 8, o meio F12 foi substituído por meio condicionado com troca a cada dois dias, até surgimento de colônias (aproximadamente dia 12 pós-nucleoporação). A partir desse momento, o meio foi trocado diariamente até o primeiro repique.

3.6.5. Cultivo e manutenção de iPSCs em MEFs e Matrigel

Uma vez surgidas as primeiras colônias de iPSCs em MEFs, e assim que estas atingiram o tamanho do campo da objetiva de 10×, cada colônia (representando um clone nessa etapa) foi seccionada em pequenos fragmentos (contendo cerca de 50 células) com auxílio de ponteiras de 200 µL em microscópio invertido dentro de fluxo laminar. Os fragmentos de células de cada colônia foram coletados imediatamente com a pipeta e transferidos para poço de placa de 12 poços com MEFs mitoticamente inativadas (semeadas na placa no dia anterior) e cultivados em meio F12 suplementado com 10 µM de *rock inhibitor* (Millipore). Este primeiro repique foi considerado como a passagem zero (p0). Cada clone foi mantido no mesmo poço por sete dias com trocas diárias do meio de cultivo (F12). Depois do sétimo dia, as colônias foram repicadas para um poço de placa de 6 poços e sucessivamente expandidas por algumas passagens até atingir uma confluência suficiente para congelamento de cada clone. A partir de p5, o repique foi realizado por ação enzimática utilizando 1 mg/mL de colagenase IV. Para isso, o meio foi aspirado e substituído por 1 mL de colagenase por poço de placa de 6 poços. As placas foram incubadas a 37°C por 5 min. A colagenase foi retirada, e as colônias foram dissociadas em fragmentos (contendo cerca de 50 células) por meio de raspagem do poço com pipetas de vidro e meio F12, evitando obter fragmentos muito pequenos.

Alguns fragmentos de colônias obtidos durante os primeiros repiques manuais foram transferidas para poços de placas de 12 poços contendo matrigel (Corning) em meio mTeSR1 ou E8 com 10 µM de *rock inhibitor*. No caso das iPSCs cultivadas em matrigel, o repique foi realizado a cada 4 dias, quando as células atingiram confluência de cerca de 70%. Os clones foram expandidos e congelados em solução de 10% DMSO em SBF e mantidos em nitrogênio líquido. Em passagens mais avançadas (em torno da passagem 5), o repique foi realizado com solução de EDTA/PBS (0,5 M EDTA, 0,9 g NaCl). Para isso,

o meio foi retirado do poço, as células foram enxaguadas duas vezes com PBS, e 1 mL de EDTA/PBS foi adicionado por poço, o qual foi mantido por 4 min a TA. Em seguida, o EDTA/PBS foi retirado e as colônias foram desgrudadas do poço e fragmentadas com leves jatos de meio mTeSR1 ou E8, evitando dissociação excessiva das colônias (fragmentos com menos de 50 células). Previamente a todos os repiques, colônias apresentando regiões de diferenciação foram retiradas manualmente com ponteira de 200 μ L em microscópio invertido dentro de fluxo laminar.

3.6.6. Medida do comprimento telomérico de iPSCs pela técnica de citometria de fluxo associada à hibridização *in situ* por fluorescência (flow-FISH)

O comprimento telomérico das células iPSCs foi determinado pela técnica do flow-FISH. Células nucleadas sanguíneas (*white blood cells* - WBC) com comprimento telomérico conhecido provenientes de indivíduos saudáveis foram utilizadas como amostras de referência para a medida do comprimento telomérico. Timócitos bovinos (CT: controle) isolados e processados previamente foram utilizados como controle interno de hibridização. Em cada experimento, os WBC e CT foram descongelados em solução PBS contendo 10% de SBF/DNAse (1 μ g/mL) e contados em câmara de Neubauer. As células provenientes de clones específicos de iPSCs foram isoladas e colocadas em meio RPMI para contagem em câmara de Neubauer. Para cada clone, alíquotas contendo 5×10^5 de iPSCs foram colocadas em 4 tubos em replicata (A, B, C e D), contendo cada um 5×10^5 CT em volume final aproximado de 100 μ L. De maneira semelhante, para as amostras referência, 1×10^6 WBC foram colocadas em 4 tubos em replicata (A, B, C e D), contendo cada um 10^5 CT em volume final aproximado de 100 μ L. Aos tubos A e B foram adicionados 300 μ L de solução de hibridização contendo uma sonda peptídeo de ácido nucléico (PNA) (CCCTAA)₃ telômero-específica-FITC e aos tubos C e D, foram adicionados 300 μ L da solução de hibridização sem sonda (controle não marcado). Todos os tubos foram homogeneizados e deixados em temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo da luz. Logo em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria à 82°C por 15 min e mantidas em temperatura ambiente *overnight* (16h-18h) para denaturação do DNA e hibridização com a sonda telomérica. As amostras foram lavadas com solução do *kit Telomere PNA kit/FITC* (Dako) e processadas de acordo com as instruções do fabricante. As células foram centrifugadas, ressuspensas em 200 μ L de solução LDS 751 (400 mg/ μ L) e incubadas a 4°C por 30-90 minutos até aquisição em citômetro de fluxo.

Todas as amostras foram adquiridas pelo citômetro de fluxo FACS Canto II (BD Biosciences, CA, USA). Além dos parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), também foram detectados a fluorescência emitida pela sonda PNA telomérica conjugada ao isotiocianato de fluoresceína – FITC (512nm – 558nm) no canal FL-1 e a emitida pelo marcador de DNA LDS 751 em FL3 (665nm – 695nm), ambos excitados pelo laser 488nm. Para cada amostra foram adquiridos 50.000 eventos. *Beads* conjugadas com FITC (Quantum FITC-5 MESF; Bangs laboratories, Inc., Indiana, USA) foram utilizadas para calibrar o equipamento e para converter a fluorescência média emitida pela sonda telomérica em valores absolutos de moléculas de FITC (valor de MESF).

Para as populações de iPSCs e CT de cada amostra, o valor médio de fluorescência foi determinado a partir da subtração do valor de fluorescência em FL1 obtido com o controle não marcado (tubos A e B) do valor de intensidade de fluorescência obtida em mesmo canal com a amostra marcada com a sonda telomérica (tubos C e D). A partir do valor médio de MFI, o valor de MESF foi calculado pelo software Quantum™ FITC MESF (Bangs Laboratory) por meio de uma regressão linear (Kapoor e Telford, 2004). Uma vez determinado o número de moléculas de fluorocromo (MESF), o comprimento telomérico em Kb foi calculado pela seguinte equação: Comprimento telomérico (Kb) = MESF * 0,019 * 0,02604. A medida foi normalizada com o valor obtido do comprimento telomérico dos CTs presentes em cada tubo.

3.7. Caracterização das iPSCs

As colônias de iPSCs obtidas foram analisadas com a finalidade de verificar as suas características pluripotentes através de diferentes ensaios.

3.7.1. Fosfatase alcalina

Para realização do teste de fosfatase alcalina, as células foram cultivadas em placa de 24 poços em matrigel e meio de cultivo E8. Para o ensaio, utilizou-se o *kit* fosfatase alcalina (FA), leucócitos (Sigma-Aldrich). Após retirar o meio e enxaguar as células com PBS, foi adicionado 500 µL de solução fixadora de citrato, acetona e formaldeído e incubado por 30 seg a TA. Em seguida, o fixador foi descartado, o poço lavado com PBS e adicionado 500 µL de solução alcalina de naftol AS-BI e sais de diazônio para logo incubar por 15 min no escuro. Passado o tempo de incubação, a solução alcalina foi descartada, o poço lavado duas vezes com PBS e realizada contracoloração com solução de hematoxilina n°3 de Gill por 2 min. Finalmente, a

hematoxilina foi enxaguada com duas lavagens de PBS, e uma vez os poços secos a TA, as colônias foram observadas em microscópio invertido.

3.7.2. Citometria de fluxo para marcadores de pluripotência

Colônias em confluência de 80% foram individualizadas com solução de acutase (Millipore) por 5 min a 37°C e contadas em câmara de Neubauer. Um total de células entre 3×10^5 a 10^6 foram ressuspensas em PBS e colocadas em tubos de citometria para serem centrifugadas a 1800 rpm por 3 min. Para marcação nuclear de SOX2 e OCT4, foi adicionado 1 mL de fixador com formol (BD) e as células incubadas a TA por 10 min. Em seguida, o fixador foi lavado com 1 mL de PBS e descartado após centrifugação a 1800 rpm por 3 min. Em seguida, as células foram ressuspensas em 300 µL de solução de permeabilização (BD) diluída 1:10 em água MilliQ a TA por 10 min para logo serem lavadas com 1 mL de PBS e centrifugadas a 1800 rpm por 3 min. Foram adicionados 5 µL de cada anticorpo SOX2-Alexa 647 e OCT4-PE (BD), incubados no escuro por 15 min e finalmente lavados com 1 mL de PBS por centrifugação a 1800 rpm por 3 min.

Para o marcador de superfície SSEA4, 5 µL do anticorpo SSEA4-PE (BD) foram diretamente adicionados após a primeira centrifugação, incubado no escuro por 15 min. e por último lavado com 1 mL de PBS. O ensaio foi realizado em citômetro de fluxo BD FACSCalibur e os dados analisados em programa FlowJo 7.6.5.

3.7.3. Imunocitoquímica para marcadores de pluripotência

Os marcadores de pluripotência avaliados e seus respectivos anticorpos (Ac) foram: SSEA-4 (Ac primário *Mouse* IgG3k AlexaFluor555, BD), NANOG [Ac primário *Rabbit* IgG (Abcam); Ac secundário *Donkey* anti-rb IgG AlexaFluor555 (Invitrogen)], Tra1-81 (Ac primário *Mouse* IgMk AlexaFluor488, BD), OCT4 (Ac primário *Rabbit* IgG [Abcam]; Ac secundário *Donkey* anti-rb IgG AlexaFluor555 [Invitrogen]), Tra1-60 (Ac primário *Mouse* IgMk AlexaFluor488, BD).

As iPSCs foram cultivadas sobre matrigel e meio E8 em placa de 96 poços durante 2 dias. Após esse período, as colônias presentes em cada poço da placa foram lavadas com PBS e fixadas

com 100 μ L de 4% paraformaldeído por 30 min a TA. Para internalização dos anticorpos primários NANOG e OCT4, as células foram permeabilizadas com 100 μ L de 0,2% Triton X-100 em PBS por 30 min a TA, seguido de três lavagens com PBS. Em seguida, foi adicionado 100 μ L de *blocking buffer* (3% BSA, 5% *donkey serum*) e incubado por 2 h a TA. Após o bloqueio, as células foram incubadas com 100 μ L de anticorpo primário NANOG e OCT4 (1:100 em *blocking buffer*) a 4°C *overnight*. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e incubadas com 100 μ L de anticorpo secundário *Donkey anti-rb IgG AlexaFluor555* (Invitrogen), e com anticorpos de superfície SSEA4-AlexaFluor555, Tra1-81-AlexaFluor488 e Tra1-60-AlexaFluor488 diluídos em proporção de 1:500 em *blocking buffer* por 3 h a 4°C. Os anticorpos secundários foram removidos mediante três lavagens com PBS e os núcleos corados com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Para a aquisição das imagens, foi utilizado o sistema de HCS (do inglês, *High Content screening*) ImageXpress XL (Molecular Devices). As imagens foram obtidas utilizando-se a objetiva de 10 $\times$ e os cubos com filtros de excitação e emissão ideais para cada fluoróforo. Os cubos utilizados foram de DAPI, FITC (para AlexaFluor488) e Cy3 (AlexaFluor555). O software utilizado para operar o sistema de HCS, bem como para a realização da análise das imagens, foi o MetaXpress (Molecular Devices).

3.7.4. Ensaio de diferenciação in vitro: formação de corpos embrioides

Para diferenciação espontânea em corpos embrioides, iPSCs foram cultivadas em matrigel e meio mTeSR1 (StemCell) ou E8 (Gibco) até atingirem confluência de cerca de 70 %. No dia 0, o meio foi trocado por mTeSR1 ou E8 contendo 1 μ L/mL de *rock inhibitor* e incubado por 1 h a 37°C. Após esse tempo, as colônias foram dissociadas em fragmentos de cerca de 200 células utilizando-se EDTA/PBS, coletadas e transferidas em proporção 2:1 para poços de placa de 6 poços de baixa adesão com 2,5 mg/mL de álcool polivinílico (APV) diluído em meio mTeSR1 ou E8. Alíquotas de iPSCs foram coletadas antes da etapa de tratamento com *rock inhibitor* e conservadas a -80°C. No dia 2, o meio foi trocado por meio *Essential 6* (E6, Gibco) e as células foram mantidas até o dia 16 trocando o meio a cada 2 ou 3 dias. Os corpos embrioides foram

coletados e conservados a -80°C.

3.7.5. Cariotipagem: bandeamento G

Um total de 2×10^6 iPSCs foram individualizadas por tratamento com 0,05% de tripsina por 5 min a 37°C, ressuspendidas em 2 mL de meio E8 contendo 10 μ M de *rock inhibitor* e cultivadas até o dia seguinte. O meio foi trocado por meio fresco contendo 0,1 μ g/mL de Colcemid (Gibco) e mantido por 16 h. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, removidas com 0,05% tripsina e centrifugadas a 1200 rpm por 8 min em tubo de 15 mL. Uma vez descartado o sobrenadante, foi adicionado 5 mL de solução hipotônica pré-aquecida (0,075 M KCl, 25 mM de HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid], pH 7,4) e as células foram mantidas a 37° C por 30 min. Seguidamente, estas foram centrifugadas a 1200 rpm por 8 min e adicionados 10 mL de solução fixadora de Carnoy (metanol: ácido acético glacial, 3:1) durante 30 min a TA. Em seguida, as células foram centrifugadas e ressuspendidas mais uma vez em 10 mL de solução de Carnoy por 10 min a TA. Após uma última centrifugação, o *pellet* foi ressuspendido em fixador fresco e algumas gotas foram despejadas em lâminas úmidas e geladas para observação de metáfases.

O bandeamento G foi realizado submergindo rapidamente as lâminas em solução de 0,5% tripsina em PBS, e seguidamente em tampão fosfato diluído (1:2) em água MilliQ. As lâminas foram cobertas com 3:1 corante Wright em tampão fosfato diluído por 2 min. Finalmente, as lâminas foram enxaguadas com água destilada e, uma vez secas, 20 metáfases foram capturadas para montagem de cariótipos. O software utilizado para análise dos cariótipos foi *Applied Spectral Imaging*.

4. RESULTADOS

4.1. Reprogramação de fibroblastos humanos com lentivírus

4.1.1. Obtenção e cultivo de fibroblastos

Foram obtidos fibroblastos de quatro pacientes com anemia aplástica adquirida: AA-01, AA-05, AA-06 e AA-07 e de um controle saudável: Ctrl-01 a partir biopsia de pele. O tecido foi processado e cultivado a fim de expandir os fibroblastos, os quais apresentam morfologia fusiforme característica e foram predominantes na cultura de células presentes no tecido após expansão por algumas passagens (**Figuras 2 e 3**). Foi realizado teste de detecção de *Mycoplasma* spp, no qual constatou-se que as células estavam livres de contaminação, considerando-se negativa a razão $B/A < 0,9$.

Figura 2. Expansão de fibroblastos a partir de biopsia de pele do paciente AA-01.

Figura 3. Fibroblastos em p6 do paciente AA-07.

4.1.2. Obtenção e cultivo de MEFs

Uma fêmea da linhagem Balb/c foi sacrificada no dia 13 de gestação por deslocamento cervical e foram processados seis fetos para obtenção de fibroblastos. Estas células

fusiformes foram predominantes sobre qualquer outra presente no tecido (**Figura 4**). Foi realizado teste de detecção de *Mycoplasma* spp encontrando-se as células livres de contaminação, considerando-se negativo a razão $B/A < 0,9$.

Figura 4. A) Fetos com 13 dias de gestação; B) Processamento dos fetos; C) MEFs em p2 (aumento 4×).

4.1.3. Inativação mitótica de MEFs por raios X

MEFs irradiadas com raios X foram utilizadas como camada de células alimentadoras para cultivo de iPSCs (**Figura 5**). A dose de radiação de 40 Gy foi padronizada pelo nosso grupo de pesquisa e considerada adequada por não provocar morte celular excessiva e diminuir a taxa de divisões celulares, que é uma característica fundamental para utilização destes fibroblastos embrionários em co-cultivo com iPSCs. Foi realizado teste de detecção de *Mycoplasma* spp, encontrando-se todas as células livres de contaminação, considerando-se negativo a razão $B/A < 0,9$.

Figura 5. MEFs em p5 irradiadas para cultivo de iPSCs (aumento 4×).

4.1.4. Produção de lentivírus

4.1.4.1. Produção de lentivírus: Metodologia A

4.1.4.1.1. Clonagem e digestão dos plasmídeos lentivirais

Os vetores pMD2.G, psPAX2, STEMCAA e STEMCCA-RedLight foram digeridos com enzimas de restrição e analisados por eletroforese em gel de agarose 1%. Como se observa na **Figura 6**, as linhas 2, 7, 11 e 14 (representadas pelo símbolo Ø) correspondem aos plasmídeos sem digestão, apresentando bandas de diversos tamanhos devido às conformações que o DNA circular adota durante a migração no gel de agarose. As bandas inferiores são conformações superhelicoidais compactas resultantes da rápida migração, e as bandas superiores representam o DNA circular mais relaxado e de migração lenta.

O plasmídeo pMD2.G apresentou banda única quando digerido com uma enzima (linhas 3 e 4), o que está de acordo com o DNA linear e com o tamanho de 5824 pares de bases (pb) esperado. Por outro lado, quando digerido com a combinação das duas enzimas, o plasmídeo apresentou dois fragmentos de 2778 e 3046 pb (linha 5), que coincidem com os sítios de corte das enzimas. O psPAX.2, quando digerido com *BamHI*, apresentou duas bandas de 9359 e 1007 pb, ficando praticamente imperceptível a banda de 337 pb devido ao seu pequeno tamanho; quando digerido com *EcoRI*, evidenciou-se duas bandas de 6330 e 4373 pb correspondentes aos sítios de clivagem de cada enzima. Finalmente, o hSTEMCCA apresentou bandas de 8574 e 3961 pb, e o hSTEMCCA RedLight apresentou bandas de 10354 e 1572 pb, como esperado com base nos sítios de clivagem da enzima *HincII* preditos no mapa do plasmídeo, sendo um deles no gene *mCherry*. Portanto, a identidade dos quatro vetores pode ser confirmada utilizando-se esta metodologia.

Figura 6. Gel de agarose 1% mostrando a digestão enzimática dos vetores pMD2.G, psPAX, STEMCCA e STEMCCA-RedLight, respectivamente.

4.1.4.1.2. Cultivo e transfecção de células 293FT para produção de lentivírus

A linhagem comercial 293FT expressa de forma estável o antígeno SV40 cuja expressão é controlada pelo promotor do citomegalovírus humano (CMV), sendo uma linhagem de fácil transfecção. O reagente de transfecção utilizado neste experimento foi o FuGENE 6, que é um reagente não lipossomal, forma complexo com o DNA, apresenta baixa toxicidade para as células e elevada eficiência de transfecção como observado após 48 h de transfecção com a combinação dos vetores hSTEMCCA-RedLight, psPAX2 e pMD2.G (**Figura 7**). Os vírus produzidos por estas células contêm o gene repórter *mCherry*, fundamental para titulação por citometria de fluxo. Em paralelo, foram transfectadas células com hSTEMCCA, psPAX2 e pMD2.G para produzir vírus portadores dos quatro genes de pluripotência para utilização em experimentos de reprogramação.

Figura 7. Linhagem 293FT 48 h após transfecção com FuGENE 6 e STEMCCA-RedLight. A) campo claro; B) expressão de *mCherry*.

4.1.4.1.3. Titulação viral por citometria de fluxo

Células HeLa livres de *Mycoplasma* spp. foram previamente transduzidas com quatro pontos de diluição de sobrenadante viral para cada condição (NC, 1×C e 10×C), assim como com meio sem vírus (controle negativo). Como ilustra a **Figura 8**, as células transduzidas analisadas em citômetro de fluxo e mostraram porcentagens de células emitindo fluorescência do *mCherry* entre 0 e 1% nas condições de vírus NC e 1×C. Já as células transduzidas com sobrenadante 10×C apresentaram maiores porcentagens de fluorescência: primeiro ponto de diluição: 6%, segundo ponto: 3%, terceiro ponto: 1% e quarto ponto: 0,8%.

Figura 8. Análise por citometria de fluxo da expressão de *mCherry* em células HeLa transduzidas com sobrenadante viral 10×C; 1, 2, 3 e 4 representam os pontos de diluição do sobrenadante viral.

A partir dos dados obtidos com a condição de sobrenadante viral 10×C, foi calculado o título viral como descrito na metodologia, resultando em um valor de 310 vírus/μL.

4.1.4.2. Produção de lentivírus: Metodologia B

4.1.4.2.1. Cultivo e transfecção de células 293FT para produção de lentivírus

Células 293FT foram transfectadas utilizando Lipofectamina 2000, formulada com lipossomos catiônicos que formam complexos com DNA, e duas combinações de vetores. Além das partícula virais produzidas com hSTEMCCA, vírus foram produzidos em paralelo com hSTEMCCA-RedLight, com a finalidade de verificar a eficiência da transfecção (**Figura 9**). Neste caso, não foi realizada titulação. Apenas o sobrenadante viral contendo os quatro genes de pluripotência foi coletado após 72 h da transfecção e utilizado imediatamente na transdução dos fibroblastos dos pacientes.

Figura 9. Linhagem 293FT expressando *mCherry* após 72 h da transfecção com Lipofectamina 2000 e STEMCCA-RedLight.

4.1.4.2.2. Transdução de fibroblastos

Fibroblastos do controle (Ctrl-01) e de um paciente (AA-01), foram transduzidos em p6 com sobrenadante viral contendo os quatro fatores de pluripotência. As células foram cultivadas durante seis dias, quando foram observados pequenos grupos de células com

morfologia arredondada, diferente da morfologia dos fibroblastos (**Figura 10**). A partir do sexto dia de cultivo, os fibroblastos foram transferidos para placa com MEFs em meio F12 e mantidos em cultivo durante 30 dias. Durante esse período, foram observadas formações semelhantes a colônias de células reprogramadas, as quais não apresentaram crescimento e não puderam ser mantidas em cultura (**Figura 11 A e B**).

Figura 10. Fibroblastos Ctrl-01 no dia 6 pós-transdução com formação de grupamentos de células com morfologia não-fibroblastoide.

Figura 11. Formação de pequenas colônias (indicadas pelas setas amarelas) em fibroblastos transduzidos cultivados sobre MEFs; A) Fibroblastos de paciente AA-01; B) Fibroblastos Ctrl-01 (aumento 4×).

4.2. Reprogramação de eritroblastos humanos com plasmídeos eppisomais

4.2.1. Clonagem e digestão dos plasmídeos epissomais

Plasmídeos não integrativos foram analisados em gel de agarose 1% tanto na sua forma íntegra como digeridos com enzimas de restrição para confirmar sua identidade (**Figura 12**). As linhas 2, 4, 6, 8 e 10 correspondem ao DNA circular sem digestão

(símbolo Ø), apresentando o padrão típico de várias bandas devido às diferentes conformações que o DNA adota durante a migração no gel de agarose. A digestão do plasmídeo pCE-hUL com a enzima *Bam*HI resultou em duas bandas de 6911 e 4323 pb; pCE-hSK digerido com *Xba*I apresentou duas bandas de 8234 e 3643 pb; pCE-hOCT3/4 digerido com *Hind*III, apresentou as bandas de 8941 e 1531 pb, e duas bandas inespecíficas dentre 4000 e 5000 pb. O vetor pCE-mp53DD digerido com *Spe*I resultou em duas bandas de 6756 e 2941 pb; por último, pCXB-EBNA1, que foi digerido com a enzima *Bam*HI, evidenciou duas bandas de 5668 e 743 pb. Portanto, as digestões enzimáticas dos cinco plasmídeos mostraram bandas do tamanho esperado segundo os sítios de clivagem das enzimas confirmando a identidade de cada um deles.

Figura 12. Gel de agarose 1% mostrando a digestão enzimática dos plasmídeos pCE-hUL, pCE-hSK, pCE-hOCT3/4, pCE-mp53DD e pCXB-EBNA1, respectivamente.

4.2.2. Reprogramação de eritroblastos em iPSCs

Após 10 dias de expansão *in vitro* de eritroblastos de quatro pacientes com AA adquirida e um controle saudável, estes foram transfectados por eletroporação com cinco plasmídeos contendo genes de pluripotência. Aproximadamente 12 dias depois da

eletroporação, surgiram as primeiras colônias de iPSCs em co-cultivo com MEFs mitoticamente inativados (**Figura 13**). As células reprogramadas apresentaram tamanho pequeno, morfologia arredondada e formação de colônias com elevada taxa de crescimento, características similares às CTEs. Quando cada colônia (clone) gerada atingiu o tamanho do campo da objetiva de 10×, ou começaram a aparecer regiões de células diferenciadas, foi repicada e expandida separadamente tanto em MEFs como em matrigel (**Figura 14**). De cada amostra reprogramada, obtiveram-se diferentes números de clones. Foram selecionados dois clones por paciente e para o controle ou três clones no caso da amostra AA-02 para serem caracterizados (**Tabela 6**).

Tabela 6. Número de clones das linhagens de iPSCs.

Linhagem de iPSCs	Número de clones
Ctrl-01	8
AA-01	4
AA-02	5
AA-03	80
AA-04	12

Figura 13. Processo de reprogramação de eritroblastos em iPSCs (paciente AA-02). A) Eritroblastos; B) Surgimento de colônia em MEFs indicada com a seta amarela (dia 12 pós-eletroporação); C) Crescimento de colônia em MEFs.

Figura 14. Morfologia de colônias de CTEs (**H1**) e colônias de iPSCs cultivadas em matrigel: **Ctrl-01** (clones 2 e 4), **AA-01** (clones 2 e 3), **AA-02** (clones 1, 2 e 4), **AA-03** (clones 8 e 9) e **AA-04** (clones 1 e 2) em passagens específicas (p). (aumento 4×).

4.2.3. Medição do comprimento telomérico das iPSCs por flow-FISH

O comprimento telomérico foi avaliado em cada clone das iPSCs geradas através da técnica de flow-FISH. Os comprimentos teloméricos obtidos das iPSCs foram comparados com o comprimento de glóbulos brancos ou WBC de cada amostra prévio à reprogramação. Os resultados demonstraram que houve um aumento no comprimento dos telômeros após o processo de reprogramação (**Figura 15**).

Figura 15. Comprimento telomérico determinado por flow-FISH em amostras pré e pós-reprogramação. A) Ctrl-01: WBC: 8,6; c2p14: 20,4; c2p20: 12,6; c4p11: 20,9; c4p17: 14,6; c7p11: 13; B) AA-01: WBC: 7,7; c2p21: 22,3; c3p7: 12,6; c3p21: 17,3; C) AA-02: WBC: 10,7; c2p9: 16,9; c4p9: 11,2; D) AA-03: WBC: 6,7; c8p5: 18; c9p5: 23,7; E) AA-04: WBC: 6,5; c1p2: 15,5; c2p2: 15,4. Comprimento telomérico expresso em quilobases (kb).

4.3. Caracterização das iPSCs

4.3.1. Fosfatase alcalina

O teste de detecção de fosfatase alcalina foi realizado nas células reprogramadas, mostrando positividade evidenciada pela intensa cor roxa-vermelha comparável com as CTEs H1 (controle positivo) (**Figura 16**).

Figura 16. Teste de detecção de fosfatase alcalina nas iPSCs geradas: Ctrl-01 (clones 2 e 4), AA-01 (clones 2 e 3), AA-02 (clones 1, 2 e 4), AA-03 (clones 8 e 9) e AA-04 (clones 1 e 2). As células apresentaram-se positivas, semelhante à marcação observada nas CTEs (H1). Aumento 4×.

4.3.2. Citometria de fluxo para marcadores de pluripotência

Foi realizada citometria de fluxo para análise da expressão de genes nucleares de pluripotência (*SOX2* e *OCT4*) e de membrana (*SSEA4*) em amostras das iPSCs geradas. A linhagem de CTEs H1 e fibroblastos foram utilizados como controles positivo e negativo,

respectivamente. Os resultados indicam que todos os clones de iPSCs gerados apresentaram elevadas porcentagens de expressão dos genes de pluripotência, semelhante à expressão observada em H1, porém não houve expressão desses genes em fibroblastos **(Figura 17-21)**.

Figura 17. Análise por citometria de fluxo da expressão de genes de pluripotência das iPSCs geradas. Controle negativo: Fib.; controle positivo: H1; Ctrl-01 (clones 2 e 4) em passagens específicas (p), Fib. (fibroblastos em p11).

Figura 18. Análise por citometria de fluxo da expressão de genes de pluripotência das iPSCs geradas. AA-01 (clones 2 e 3), em passagens específicas (p).

Figura 19. Análise por citometria de fluxo da expressão de genes de pluripotência das iPSCs geradas. AA-02 (clone 1), em passagens específicas (p).

Figura 20. Análise por citometria de fluxo da expressão de genes de pluripotência das iPSCs geradas. AA-03 (clones 8 e 9) e em passagens específicas (p).

Figura 21. Análise por citometria de fluxo da expressão de genes de pluripotência das iPSCs geradas. AA-04 (clones 1 e 2) em passagens específicas (p).

4.3.3. Imunocitoquímica para marcadores de pluripotência

A marcação de proteínas expressas em células pluripotentes foi realizada com Ac conjugados a diferentes fluoróforos. Células H1 e fibroblastos foram utilizados como controles positivo e negativo, respectivamente. Os marcadores nucleares avaliados foram NANOG e OCT4, além dos marcadores de superfície SSEA4, TRA-1-81 e TRA-1-60. As imagens abaixo ilustram que um clone representativo de cada linhagem de iPSCs gerada apresentou marcação semelhante à observada em H1 (**Figuras 22-28**).

Figura 22. Fotomicrografia de luz transmitida e fluorescência de CTEs H1 p61, onde são visualizadas as marcações para NANOG, OCT4 e SSEA4 (vermelho), TRA1-81 e TRA1-60 (verde). Ac 2° representa a marcação realizada apenas com o anticorpo secundário, demonstrando ausência de marcação inespecífica. Os núcleos foram corados com DAPI. Aumento 10×.

Figura 23. Fotomicrografia de luz transmitida e fluorescência de Ctrl-01 clone 2 p19, onde são visualizadas as marcações para NANOG, OCT4 e SSEA4 (vermelho), TRA1-81 e TRA1-60 (verde). Ac 2° representa a marcação realizada apenas com o anticorpo secundário, demonstrando ausência de marcação inespecífica. Os núcleos foram corados com DAPI. Aumento 10×.

Figura 24. Fotomicrografia de luz transmitida e fluorescência de AA-01 clone 2 p22, onde são visualizadas as marcações para NANOG, OCT4 e SSEA4 (vermelho), TRA1-81 e TRA1-60 (verde). Ac 2° representa a marcação realizada apenas com o anticorpo secundário, demonstrando ausência de marcação inespecífica. Os núcleos foram corados com DAPI. Aumento 10×.

Figura 25. Fotomicrografia de luz transmitida e fluorescência de AA-02 clone 1 p11, onde são visualizadas as marcações para NANOG, OCT4 e SSEA4 (vermelho), TRA1-81 e TRA1-60 (verde). Ac 2° representa a marcação realizada apenas com o anticorpo secundário, demonstrando ausência de marcação inespecífica. Os núcleos foram corados com DAPI. Aumento 10×.

Figura 26. Fotomicrografia de luz transmitida e fluorescência de AA-03 clone 9 p11, onde são visualizadas as marcações para NANOG, OCT4 e SSEA4 (vermelho), TRA1-81 e TRA1-60 (verde). Ac 2° representa a marcação realizada apenas com o anticorpo secundário, demonstrando ausência de marcação inespecífica. Os núcleos foram corados com DAPI. Aumento 10×.

Figura 27. Fotomicrografia de luz transmitida e fluorescência de AA-04 clone 1 p8, onde são visualizadas as marcações para NANOG, OCT4 e SSEA4 (vermelho), TRA1-81 e TRA1-60 (verde). Ac 2° representa a marcação realizada apenas com o anticorpo secundário, demonstrando ausência de marcação inespecífica. Os núcleos foram corados com DAPI. Aumento 10×.

Figura 28. Fotomicrografia de luz transmitida e fluorescência de fibroblastos p11, onde são visualizadas as marcações para NANOG, OCT4 e SSEA4 (vermelho), TRA1-81 e TRA1-60 (verde). Ac 2° representa a marcação realizada apenas com o anticorpo secundário, demonstrando ausência de marcação inespecífica. Os núcleos foram corados com DAPI. Aumento 10×.

4.3.4. Ensaio de diferenciação *in vitro*: formação de corpos embrioides

Foi realizado teste de diferenciação espontânea de células pluripotentes em EBs com todas as amostras de iPSCs geradas e com H1 como controle positivo. As células formaram estruturas semelhantes a EBs no dia 1 como visualizado nas **Figuras 29-33**. Os EBs foram maturados por 16 dias.

Figura 29. Diferenciação *in vitro* das iPSCs em corpos embrioides: (H1): controle positivo, Ctrl-01 (clones 2 e 4). d0: colônias confluentes pré-diferenciação; d1 e d2: formação de estruturas semelhantes a corpos embrioides um ou dois dias após transferência para placas de baixa adesão. Aumento: 4×.

Figura 30. Diferenciação *in vitro* das iPSCs em corpos embrioides: AA-01 (clones 2 e 3). d0: colônias confluentes pré-diferenciação; d1 e d2: formação de estruturas semelhantes a corpos embrioides um ou dois dias após transferência para placas de baixa adesão. Aumento: 4×.

Figura 31. Diferenciação *in vitro* das iPSCs em corpos embrioides: AA-02 (clones 2 e 4). d0: colônias confluentes pré-diferenciação; d1 e d2: formação de estruturas semelhantes a corpos embrioides um ou dois dias após transferência para placas de baixa adesão. Aumento: 4×.

Figura 32. Diferenciação *in vitro* das iPSCs em corpos embrioides: AA-03 (clones 8 e 9). d0: colônias confluentes pré-diferenciação; d1 e d2: formação de estruturas semelhantes a corpos embrioides um ou dois dias após transferência para placas de baixa adesão. Aumento: 4×.

Figura 33. Diferenciação *in vitro* das iPSCs em corpos embrioides: AA-04 (clones 1 e 2). d0: colônias confluentes pré-diferenciação; d1 e d2: formação de estruturas semelhantes a corpos embrioides um ou dois dias após transferência para placas de baixa adesão. Aumento: 4×.

4.3.5. Cariotipagem: bandeamento G

Com a finalidade de avaliar a integridade genômica após o processo de reprogramação, metáfases das iPSCs geradas foram adquiridas e analisadas. As **figuras 33 e 34** representam um cariótipo normal 46, XX das iPSCs Ctrl-01 clone 2. Perdas aleatórias de cromossomos foram identificadas em algumas das metáfases analisadas, embora não comprometendo o diagnóstico do cariótipo como sendo normal.

Figura 2. Célula com cromossomos em metáfase de amostra de iPSCs Ctrl-01 clone 2. Aumento: 100×.

Figura 3. Cariótipo normal 46, XX de amostra de iPSCs Ctrl-01 clone 2. Aumento: 100×.

5. DISCUSSÃO

A etiologia da AA adquirida associada a mecanismos autoimunes pode ser atribuída à combinação de diversos fatores como exposição a elementos nocivos (químicos, radioativos ou biológicos) e predisposição genética. Comprovações clínicas como a recuperação da hematopoese em pacientes transplantados ou resposta a tratamentos de imunossupressão, permitem classificar a AA adquirida como uma doença imunomediada (Young *et al.*, 2008). Da mesma forma, experimentos *in vitro* demonstraram que a remoção de linfócitos da medula óssea promove o crescimento de diversas colônias de células hematopoéticas (Young, 2000). O comportamento anormal das células T continua sendo um mecanismo não totalmente esclarecido, porém não se descartam bases genéticas envolvidas nesta ativação aberrante de linfócitos T (Young, Scheinberg *et al.*, 2008).

O encurtamento telomérico excessivo em leucócitos pode ser secundário a mutações nos genes componentes da telomerase (*TERT* e *TERC*), representando fatores de risco para AA (Yamaguchi *et al.*, 2005). O fenótipo clínico da AA adquirida é similar à AA hereditária. Por isso, resulta indispensável para distinção de ambos os tipos, a medição do comprimento telomérico dos pacientes, onde valores abaixo dos normais para a idade, sugerem telomeropatias (Townsend *et al.*, 2014). Assim, com a finalidade de excluir doenças relacionadas ao encurtamento telomérico, o grupo de pacientes escolhido para realização do presente estudo apresentou comprimento telomérico normal com valores acima do décimo percentil.

Uma das duas opções de tratamento atualmente disponíveis na anemia aplástica grave é o transplante de medula óssea no caso de pacientes menores de 40 anos e que disponham de doador compatível aparentado (Young *et al.*, 2010). Embora apenas uma pequena porcentagem de pacientes seja beneficiada com este tratamento, a ampla experiência clínica na utilização de CTHs no transplante de medula óssea junto ao surgimento da tecnologia de reprogramação de células somáticas humanas em células pluripotentes induzidas (iPSCs)

(Takahashi *et al.*, 2007) abriu novas perspectivas e desafios na modelagem de doenças e no desenvolvimento de tratamentos utilizando células-tronco paciente-específicas. Desta forma, o principal objetivo de nosso trabalho foi reprogramar células de pacientes com AA adquirida com a finalidade de obter células pluripotentes que permitam futuras aplicações em tratamentos alternativos como por exemplo, transplantes autólogos de células hematopoéticas.

Para fins terapêuticos, é fundamental garantir a segurança clínica das iPSCs, já que se trata de células reprogramadas pela expressão forçada de genes de pluripotência. Dentre as metodologias de geração de iPSCs baseadas na integração de DNA exógeno, encontram-se as que utilizam retrovírus (Takahashi e Yamanaka, 2006) ou lentivirus (Yu *et al.*, 2007) como veículos para inserir os fatores de pluripotência no genoma das células-alvo. Embora existam riscos de mutagênese devido à inserção aleatória do DNA exógeno capaz de reativar ou silenciar genes (Okita *et al.*, 2007), são considerados métodos eficientes por permitir uma expressão duradoura dos fatores de pluripotência necessária na reprogramação celular. Vetores lentivirais são amplamente utilizados na reprogramação de células humanas. Dentre as vantagens, encontra-se a capacidade de transduzir células quiescentes e silenciar os fatores de reprogramação mais lentamente que os vetores retrovirais (Stadtfield *et al.*, 2008).

O vetor lentiviral policistrônico pHAGE-STEMCCA desenvolvido por Sommer e colaboradores (2009) é composto por quatro genes de pluripotência (*OCT4*, *KLF4*, *SOX2* e *MYC*) que são expressos como um transcrito único, demonstrando vantagem sobre a utilização de múltiplos vetores monocistrônicos integrativos. Além disso, é possível a excisão dos transgenes através do sistema Cre-loxP para a obtenção de células iPSCs livres de transgenes (Sommer *et al.*, 2009).

O protocolo estabelecido por Sommer e colaboradores (2009) demonstrou a geração eficiente de iPSCs a partir de fibroblastos de neonato e conseguiu gerar alguns clones com

apenas uma integração do cassete de expressão. A pluripotência destas células foi confirmada por ensaio *in vivo* de formação de teratomas e capacidade de formação de quimeras.

Inicialmente, nós realizamos duas metodologias de produção de lentivírus utilizando combinações diferentes de plasmídeos que expressam proteínas do envelope e capsídeo viral junto ao STEMCCA. A linhagem produtora de vírus utilizada foi a 293FT, derivada de rim de embrião humano e modificada com o gene E1A de adenovírus tipo 5 cuja expressão promove a ativação de alguns promotores virais permitindo a produção de elevados níveis de proteínas. Esta linhagem também expressa de forma estável o antígeno SV40 estando sua expressão controlada pelo promotor do citomegalovírus humano (CMV). Estas características fazem como que seja uma linhagem apropriada para produção de lentivírus. Também foram testados dois tipos de reagentes de transfecção, um deles não lipossomal (FuGENE) e o outro, Lipofectamina 2000, conformada de lipossomos catiônicos. Após 48 e 72 h pós-transfecção das células 293FT com STEMCCA-RedLight, portador do gene de fluorescência *mCherry*, nós observamos uma marcada expressão deste gene nas células transfectadas, evidenciando a eficiência de transfecção de ambos os reagentes (**Figuras 7 e 9**).

Em seguida, o sobrenadante viral foi coletado e concentrado 100× por ultracentrifugação. De forma semelhante, outros grupos de pesquisa realizaram este procedimento de concentração de partículas virais conseguindo reprogramar células com sucesso (Sommer, Stadtfeld *et al.*, 2009; Winkler *et al.*, 2013). O título viral obtido pelo grupo de Sommer foi de $2-2 \times 10^8$ /mL, um título menor ao obtido por vetores monocitrônicos, atribuindo esta diminuição ao tamanho do genoma proviral de quase 10 kb. Contrastando estes resultados, nós obtivemos um título de 310.000 vírus/mL. O número de partículas virais obtido não foi suficiente para prosseguir com a transdução. Inicialmente, atribuímos a baixa produção de vírus à perda durante os processos de filtração do sobrenadante viral após coleta, já que utilizamos filtros de um tamanho de poro de 0,22 μ M, quando a maioria dos protocolos

utilizam filtros de 0,45 μ M. Outro procedimento que poderia estar envolvido na perda de vírus é a ultracentrifugação, porém não achamos evidências na literatura de que isso possa ser causal de perda excessiva de vírus. Pelo contrário, previamente o grupo de Winkler e colaboradores (2013) conseguiu produzir partículas lentivirais funcionais, utilizando o mesmo protocolo.

Como nova tentativa, utilizamos uma segunda metodologia de produção de vírus onde o sobrenadante viral foi coletado e utilizado sem concentrar para transduzir fibroblastos de uma amostra controle Ctrl-01 e de um paciente AA-01. Este método evidenciou o surgimento de pequenas conformações similares a colônias (**Figura 11**), embora essas células não proliferaram em cultura e não puderam ser repicadas.

A baixa eficiência de reprogramação está associada com a necessidade de um balanço exato da expressão que cada transgene. Por exemplo, retrovírus e lentivírus podem inserir de 1 a 40 cópias de transgenes em fibroblastos, sendo difícil controlar tanto a expressão como a região de integração (Okita e Yamanaka, 2011). Para evitar este desbalanço na expressão dos transgenes, nós utilizamos o vetor lentiviral policistrônico STEMCCA a partir do qual é traduzido um único transcrito com níveis específicos de cada proteína (Sommer, Stadtfeld *et al.*, 2009). Muitas vezes, os níveis de expressão dos transgenes são também afetados pela proximidade de outros promotores dependendo do sítio onde tenha sido inserido o transgene e também, no caso de vetores multicistrônicos, a ordem em que os genes são expressos pode influenciar na reprogramação (Okita e Yamanaka, 2011). Além disso, as mudanças epigenéticas anormais como hipo ou hipermetilação também podem afetar o processo de reprogramação. Da mesma forma, as condições de cultivo influenciam a reprogramação. FGF2 (*basic fibroblast growth factor*), por exemplo, deve estar presente no meio (Levenstein *et al.*, 2006) já que, se retirado, as células entram em processo de diferenciação (Diecke *et al.*, 2008).

Considerando que os vírus produzidos através da segunda metodologia tenham sido funcionais, e levando em conta a informação proporcionada acima, podemos supor que os fibroblastos iniciaram o processo de reprogramação, mas devido à ação de fatores como, por exemplo, a expressão inadequada dos transgenes, mudanças epigenéticas ineficientes ou alteração na composição do meio de cultivo F12 utilizado, o processo de reprogramação tenha sido prejudicado, impedindo a manutenção das células em estado indiferenciado. O processo de reprogramação ocorre em forma gradual e as células se encontram parcialmente reprogramadas nas primeiras passagens sendo necessárias mais divisões celulares para finalização do (Wang *et al.*, 2012).

A metodologia de reprogramação celular através de plasmídeos episomais tem a vantagem de não integrar DNA exógeno nas células-alvo. Embora esse método seja considerado de baixa eficiência em comparação com as metodologias integrativas, o desenvolvimento de vetores episomais auto-replicativos baseados no vírus Epstein Barr (EBV) foi eficiente na reprogramação de fibroblastos (Yu *et al.*, 2009). Estes plasmídeos tem a capacidade de se replicar e acompanhar as divisões celulares. Porém, é preciso utilizar uma combinação de vários plasmídeos diferentes na reprogramação (Hu *et al.*, 2011; Okita e Yamanaka, 2011).

Neste trabalho, foram reprogramadas com sucesso células somáticas de quatro pacientes com AA adquirida e de um indivíduo saudável (controle), utilizando cinco plasmídeos episomais; três contendo os genes de pluripotência: *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *L-MYC* e *LIN28* e os outros dois, *p53* e *EBNA1* para auxiliar no processo de reprogramação. Os plasmídeos foram inseridos nas células-alvo mediante um procedimento de eletroporação. O tipo celular reprogramado foi eritroblasto, o qual foi expandido *in vitro* em meio com citocinas específicas. as amostras são obtidas de sangue periférico dos pacientes, sendo de

fácil obtenção e menos invasivo do que fibroblastos. Além disso, nós observamos colônias em apenas 12 dias após a transfecção.

Linhagens de iPSCs devem ser avaliadas quanto a suas características de pluripotência, de forma a garantir que houve reprogramação completa das células somáticas das quais as iPSCs foram derivadas (Zhao *et al.*, 2009). Para isso, podem ser testados diversos parâmetros como morfologia, atividade de fosfatase alcalina, expressão de genes endógenos e de superfície, capacidade de diferenciação *in vitro* (formação de corpos embrioides) e *in vivo* (formação de teratomas) e integridade genômica (Marti *et al.*, 2013).

As células reprogramadas dos quatro pacientes e do controle saudável foram caracterizadas quanto à pluripotência e comparadas a CTEs. Todas os clones de cada linhagem apresentaram células com morfologia arredondada e de tamanho pequeno, formação de colônias de células justapostas com bordas mais definidas quando cultivadas sobre MEFs (**Figura 13**). O primeiro teste de pluripotência realizado foi o de fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina é uma enzima presente na membrana de várias células incluindo as pluripotentes, que tem a capacidade de hidrolisar moléculas em meio alcalino e, neste caso, mudar a conformação de um reagente colorimétrico de um estado solúvel a precipitado. Esta reação se evidencia por uma intensa coloração roxa ou avermelhada, o que indica que se trata de células pluripotentes, como observado em todas as linhagens geradas de maneira semelhante ao controle positivo (linhagem de CTEs H1) (**Figura 16**).

Em seguida, a expressão de genes específicos na manutenção do estado indiferenciado das células foi avaliada de forma quantitativa por citometria de fluxo. Os genes endógenos avaliados foram *SOX2* e *OCT4* e o antígeno glicolípido de membrana SSEA4. Para complementação, foi realizado um ensaio qualitativo de imunomarcacão para SSEA4, OCT4, NANOG e os antígenos de membrana keratan sulfato Tra1-81 e Tra1-60. Os fatores de

transcrição *OCT4*, *SOX2* e *NANOG* tem um papel muito importante na manutenção do estado indiferenciado e a capacidade de autorenovação das células pluripotentes em cultivo (Boyer *et al.*, 2005).

Os resultados da citometria (**Figuras 17-21**) mostraram valores de expressão dos três genes avaliados dentre 50-90%. Os níveis de expressão não seguiram padrões definidos. A linhagem de paciente AA-03 mostrou porcentagens de expressão superiores às iPSCs Ctrl-01 e à CTE H1, diferentemente das linhagens dos outros três pacientes que apresentaram níveis menores de expressão de *SSEA4* e *SOX2*. A expressão entre os clones de uma mesma linhagem foi similar excetuando a amostra do paciente AA-01, na qual os clones apresentaram valores diferentes. Por sua vez, observou-se que particularmente o gene *OCT4* manteve um nível de expressão acima do 80% em todas as linhagens. Esta marcada expressão de *OCT4*, foi também visível no ensaio de imunomarcação, observando-se uma coloração vermelha intensa em todas as iPSCs e H1 (**Figuras 22-28**), em concordância com o resultado da citometria. Para os outros marcadores de pluripotência, tanto as iPSCs quanto H1 mostraram colorações intensas com exceção da proteína de superfície Tra1-81 de coloração mais fraca. Estas variações na expressão gênica entre as iPSCs e H1 são comparáveis aos dados obtidos no trabalho pioneiro do grupo de Yamanaka, sugerindo que as iPSCs são similares, mas não idênticas, às CTEs (Okita, Ichisaka *et al.*, 2007).

O grupo de Boyer e colaboradores (2005) demonstrou (através de experimentos de imunoprecipitação de cromatina combinados com *microarrays* em células embrionárias da linhagem H9) que 3% das regiões promotoras de genes que codificam proteínas e miRNA conhecidos em células embrionárias humanas estão associadas a *OCT4*, 7% a *SOX2* e 9% a *NANOG*. Essa observação evidencia que os três FT apresentam muitos genes-alvo em comum. Isto sugere que esses FT funcionam em conjunto para regular a maioria dos seus alvo

mediante ativação de genes de pluripotência e repressão de genes de diferenciação (Pesce e Schöler, 2001).

Para avaliar a capacidade de diferenciação das células pluripotentes, podem ser realizados ensaios *in vivo* e *in vitro*. Este último consiste na diferenciação espontânea em corpos embrioides (EBs), que são estruturas tridimensionais que possuem tecido dos três folhetos embrionários (ecto, endo e mesoderme) (Chadwick *et al.*, 2003). Embora as linhagens de iPSCs geradas neste trabalho tenham sido capazes de se diferenciar em EBs (**Figuras 29-33**) ainda é preciso realizar uma análise detalhada da expressão gênica das células diferenciadas representativas das três camadas germinativas. A controvérsia da realização de apenas o teste de diferenciação *in vitro* continua vigente. Enquanto para alguns a formação de EBs é suficiente para comprovar a capacidade de diferenciação das iPSCs, outros argumentam que as células apresentam comportamentos diferentes *in vitro* e *in vivo*. Por esse motivo, a capacidade de diferenciação e manutenção do tecido diferenciado precisa ser demonstrada também *in vivo* (Marti, Mulero *et al.*, 2013). Dessa forma, as iPSCs geradas pelo nosso grupo de pesquisa serão testadas quanto à capacidade de formação de teratomas em camundongos imunocomprometidos.

Diversas condições induzem alterações genéticas em células embrionárias humanas. Fatores como o tempo e condições de cultivo, assim como as metodologias de repique podem ser causais de estas alterações (Caisander *et al.*, 2006; Grandela e Wolvetang, 2007). Anormalidades numéricas recorrentes são as trissomias do cromossomo 12 e 17 que atribuem vantagens seletivas a estas células (Meisner e Johnson, 2008). Além dos fatores descritos, acredita-se que determinadas linhagens são mais propensas a adquirir alterações (Catalina *et al.*, 2008). Esta instabilidade poderia interferir nos processos de proliferação e diferenciação (Imreh *et al.*, 2006).

A metodologia da citogenética tradicional mais aplicada é a realização de cariótipos através da técnica de bandeamento G.

A obtenção de metáfases de boa qualidade foi padronizada a partir do protocolo de Moralli e col (2011). A utilização de solução hipotônica com HEPES assim como o tratamento com inibidor do fuso mitótico (Colcemid) por 16 h foram diferenciais para obtenção de grandes quantidades de metáfases com cromossomos bem espalhados (Moralli *et al.*, 2011). Esta metodologia foi aplicada apenas na amostra de iPSCs controle (Ctrl-01), a qual, após análise de 20 metáfases, foi definida como contendo cariótipo normal (46, XX). A análise dos cariótipos das outras linhagens geradas no presente trabalho está em andamento.

Outra característica interessante que as CTEs têm em comum com as iPSCs é a elevada atividade da telomerase (Takahashi, Tanabe *et al.*, 2007). Quando células somáticas são reprogramadas para iPSCs, o restabelecimento da atividade da telomerase leva ao alongamento telomérico das iPSCs em relação às células parentais (Marion *et al.*, 2009; Suhr *et al.*, 2009; Vaziri *et al.*, 2010). Telomerase e telômeros são essenciais para garantir a proliferação ilimitada destas células (Hiyama e Hiyama, 2007). A queda na expressão de telomerase leva à diferenciação celular (Forsyth *et al.*, 2002), encurtamento telomérico e, finalmente, senescência e apoptose (Blackburn, 2000).

O processo de reativação da telomerase e alongamento telomérico acontece gradualmente na reprogramação de células de camundongo *Terc*^{-/-} e *Terc*^{+/-}. *Terc* e *Tert* são ativados antes dos genes *Oct4*, *Sox2* e *Nanog* nas iPSCs (Wang, Yin *et al.*, 2012). Outros trabalhos também demonstraram que *Klf4* participa da reativação de *Tert* (Wong *et al.*, 2010), e *Oct4* na reativação de *Terc* (Agarwal *et al.*, 2010). Wang e colaboradores (2012) sugeriram que a dinâmica de ativação de *Tert* e *Terc* depende do tipo celular e da metodologia de reprogramação utilizada (Wang, Yin *et al.*, 2012).

O comprimento telomérico das iPSCs geradas no presente trabalho foi avaliado e comparado ao comprimento telomérico das células parentais. A medição foi realizada em diferentes clones da mesma linhagem e, em alguns casos, em diferentes passagens. Para isso, diferentemente de trabalhos como o de Wang e colaboradores (2011) que utilizaram Q-FISH e qPCR ou Southern blot (Marion, Strati *et al.*, 2009) como metodologias de medição do comprimento telomérico das iPSCs geradas, nosso grupo adaptou e aplicou a técnica de flow-FISH padronizada para utilização em diagnóstico de telomeropatias (Gutierrez-Rodrigues *et al.*, 2014). Os resultados das medições mostraram alongamento dos telômeros após a reprogramação chegando a 17 kb, 2,5 vezes aumentado em relação ao comprimento dos leucócitos originais (Paciente AA-03). Na amostra controle (Ctrl-01) observamos que o aumento das passagens levou a uma diminuição do comprimento telomérico e que diferentes clones na mesma passagem apresentaram comprimentos teloméricos diferentes. Contrariamente, na amostra do paciente AA-01 foi observado alongamento telomérico no decorrer das passagens. Amostras pré-reprogramação dos pacientes AA-03 e AA-04 com comprimento telomérico próximo ao limite do décimo percentil (6,7 e 6,5, respectivamente), mostraram um aumento notável do comprimento nas primeiras passagens (p5 e p2, respectivamente). Diferentemente, a amostra AA-02 apresentou comprimento telomérico de 10,7 kb antes da reprogramação e, após reprogramada, apenas evidenciou alongamento dos telômeros em um dos clones (c4) em p9. Esta variação no alongamento telomérico de iPSCs foi previamente reportada (Marion, Strati *et al.*, 2009; Suhr, Chang *et al.*, 2009; Vaziri, Chapman *et al.*, 2010). A insuficiência na ativação dos genes da telomerase, especialmente durante as primeiras passagens, pode afetar o alongamento dos telômeros (Wang, Yin *et al.*, 2012). iPSCs nas primeiras passagens retêm características epigenéticas das células somáticas de origem, o que se manifesta através de diferenças na expressão gênica, porém a medida que aumentam as passagens, estas diferenças diminuem (Polo *et al.*, 2010). Dado que o processo

de reprogramação precisa de divisões celulares ativas (Hanna *et al.*, 2009) existe aumento do comprimento telomérico em passagens mais avançadas (Agarwal, Loh *et al.*, 2010; Marion, Strati *et al.*, 2009).

Desta forma, o nosso estudo evidenciou que é possível gerar iPSCs de pacientes com AA adquirida portadores de comprimento telomérico normal utilizando uma metodologia sem integração de transgenes. As iPSCs geradas a partir de células de pacientes apresentaram morfologia, expressão gênica e capacidade de diferenciação *in vitro* semelhantes a CTEs, além de apresentarem integridade cromossômica e alongamento telomérico.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, concluímos que células somáticas de pacientes com anemia aplástica adquirida podem ser expandidas *in vitro* e reprogramadas para um estado de pluripotência semelhante às CTEs. As iPSCs geradas no presente trabalho apresentaram-se positivas para os marcadores de pluripotência *OCT4*, *SOX2* e *SSEA-4*, além de apresentarem capacidade de diferenciação *in vitro* em corpos embrioides. As iPSCs de pacientes com AA adquirida apresentaram aumento do comprimento telomérico em todos os clones das linhagens reprogramadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, S. et al. Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature*, v. 464, n. 7286, p. 292-296, 2010. ISSN 0028-0836.
- AOI, T. et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, v. 321, n. 5889, p. 699-702, 2008. ISSN 0036-8075.
- BACIGALUPO, A. et al. Bone marrow transplantation (BMT) versus immunosuppression for the treatment of severe aplastic anaemia (SAA): a report of the EBMT* SAA Working Party. *British journal of haematology*, v. 70, n. 2, p. 177-182, 1988. ISSN 1365-2141.
- BLACKBURN, E. H. Switching and signaling at the telomere. *Cell*, v. 106, n. 6, p. 661-673, 2001. ISSN 0092-8674.
- BLACKBURN, E. H. Telomere states and cell fates. *Nature*, v. 408, n. 6808, p. 53-56, 2000. ISSN 0028-0836.
- BODNAR, A. G. et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, v. 279, n. 5349, p. 349-352, 1998. ISSN 0036-8075.
- BOYER, L. A. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *cell*, v. 122, n. 6, p. 947-956, 2005. ISSN 0092-8674.
- BRÜMMENDORF, T. H. et al. Telomere length in leukocyte subpopulations of patients with aplastic anemia. *Blood*, v. 97, n. 4, p. 895-900, 2001. ISSN 0006-4971.
- CAISANDER, G. et al. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture. *Chromosome Research*, v. 14, n. 2, p. 131-137, 2006. ISSN 0967-3849.
- CALADO, R. T. et al. Aplastic anaemia and telomerase RNA mutations. *The Lancet*, v. 360, n. 9345, p. 1608, 2002. ISSN 0140-6736.
- CAMITTA, B. M. et al. Severe aplastic anemia: a prospective study of the effect of early marrow transplantation on acute mortality. *Blood*, v. 48, n. 1, p. 63-70, 1976. ISSN 0006-4971.
- CATALINA, P. et al. Human ESCs predisposition to karyotypic instability: Is a matter of culture adaptation or differential vulnerability among hESC lines due to inherent properties. *Mol Cancer*, v. 7, n. 1, p. 76, 2008.
- CHADWICK, K. et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood*, v. 102, n. 3, p. 906-915, 2003. ISSN 0006-4971.
- CHAMBERS, I. et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, v. 113, n. 5, p. 643-655, 2003. ISSN 0092-8674.
- CHOU, B.-K. et al. Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Cell research*, v. 21, n. 3, p. 518-529, 2011. ISSN 1001-0602.

- CONG, Y.-S.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Human telomerase and its regulation. *Microbiology and molecular biology reviews*, v. 66, n. 3, p. 407-425, 2002. ISSN 1092-2172.
- DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*, v. 19, n. 18, p. 2100-2110, 2005. ISSN 0890-9369.
- DEMETER, J.; MESSER, G.; SCHREZENMEIER, H. Clinical relevance of the TNF- α promoter/enhancer polymorphism in patients with aplastic anemia. *Annals of hematology*, v. 81, n. 10, p. 566-569, 2002. ISSN 0939-5555.
- DIECKE, S. et al. FGF2 signaling in mouse embryonic fibroblasts is crucial for self-renewal of embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs*, v. 188, n. 1-2, p. 52-61, 2008. ISSN 1422-6421.
- DUFOUR, C. et al. Homozygosity for (12) CA repeats in the first intron of the human IFN- γ gene is significantly associated with the risk of aplastic anaemia in Caucasian population. *British journal of haematology*, v. 126, n. 5, p. 682-685, 2004. ISSN 1365-2141.
- EHRlich, P. Über einen Fall von Anämie mit Bemerkungen über regenerative Veränderungen des Knochenmarks. *Charité-Annalen*, v. 13, p. 300-309, 1888.
- EMA, H. et al. Adult mouse hematopoietic stem cells: purification and single-cell assays. *Nature protocols*, v. 1, n. 6, p. 2979-2987, 2006. ISSN 1754-2189.
- EPSTEIN, F. H.; YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. *New England Journal of Medicine*, v. 336, n. 19, p. 1365-1372, 1997. ISSN 0028-4793.
- ESCORS, D.; BRECKPOT, K. Lentiviral vectors in gene therapy: their current status and future potential. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, v. 58, n. 2, p. 107-119, 2010. ISSN 0004-069X.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *nature*, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981. ISSN 0028-0836.
- FENG, B. et al. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nature cell biology*, v. 11, n. 2, p. 197-203, 2009. ISSN 1465-7392.
- FOGARTY, P. F. et al. Late presentation of dyskeratosis congenita as apparently acquired aplastic anaemia due to mutations in telomerase RNA. *The Lancet*, v. 362, n. 9396, p. 1628-1630, 2003. ISSN 0140-6736.
- FORSYTH, N. R.; WRIGHT, W. E.; SHAY, J. W. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*, v. 69, n. 4-5, p. 188-197, 2002. ISSN 1432-0436.
- FREED, E. O. HIV-1 replication. *Somatic cell and molecular genetics*, v. 26, n. 1-6, p. 13-33, 2001. ISSN 0740-7750.

FUSAKI, N. et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, v. 85, n. 8, p. 348-362, 2009. ISSN 0386-2208.

GADALLA, S. M.; SAVAGE, S. A. Telomere biology in hematopoiesis and stem cell transplantation. *Blood reviews*, v. 25, n. 6, p. 261-269, 2011. ISSN 0268-960X.

GRAMATGES, M. M.; BERTUCH, A. A. Short telomeres: from dyskeratosis congenita to sporadic aplastic anemia and malignancy. *Translational Research*, v. 162, n. 6, p. 353-363, 2013. ISSN 1931-5244.

GRANDELA, C.; WOLVETANG, E. hESC adaptation, selection and stability. *Stem cell reviews*, v. 3, n. 3, p. 183-191, 2007. ISSN 1550-8943.

GUTIERREZ-RODRIGUES, F. et al. Better Performance of Flow-FISH in Comparison to qPCR As a Diagnostic Test for Telomere Diseases. *Blood*, v. 124, n. 21, p. 1605-1605, 2014. ISSN 0006-4971.

HANNA, J. et al. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, v. 462, n. 7273, p. 595-601, 2009. ISSN 0028-0836.

HANNA, J. et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, v. 318, n. 5858, p. 1920-1923, 2007. ISSN 0036-8075.

HARRINGTON, L. Biochemical aspects of telomerase function. *Cancer letters*, v. 194, n. 2, p. 139-154, 2003. ISSN 0304-3835.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research*, v. 25, n. 3, p. 585-621, 1961. ISSN 0014-4827.

HEISS, N. S. et al. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nature genetics*, v. 19, n. 1, p. 32-38, 1998. ISSN 1061-4036.

HIYAMA, E.; HIYAMA, K. Telomere and telomerase in stem cells. *British journal of cancer*, v. 96, n. 7, p. 1020-1024, 2007. ISSN 0007-0920.

HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, v. 441, n. 7097, p. 1061-1067, 2006. ISSN 0028-0836.

HU, K. et al. Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. *Blood*, v. 117, n. 14, p. e109-e119, 2011. ISSN 0006-4971.

HU, K.; SLUKVIN, I. Induction of pluripotent stem cells from umbilical cord blood. *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*, 2013. ISSN 3527600906.

HUANGFU, D. et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature biotechnology*, v. 26, n. 11, p. 1269-1275, 2008. ISSN 1087-0156.

IMREH, M. et al. In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells. *Journal of cellular biochemistry*, v. 99, n. 2, p. 508-516, 2006. ISSN 1097-4644.

JIA, F. et al. A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nature methods*, v. 7, n. 3, p. 197-199, 2010. ISSN 1548-7091.

JUNG, M. et al. A data integration approach to mapping OCT4 gene regulatory networks operative in embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells. *PLoS One*, v. 5, n. 5, p. e10709, 2010. ISSN 1932-6203.

KAPOOR, V, TELFORD, WG. Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Methods Mol Biol.* v. 263, p. 385-98, 2004.

KATZ, R. A.; SKALKA, A. M. The retroviral enzymes. *Annual review of biochemistry*, v. 63, n. 1, p. 133-173, 1994. ISSN 0066-4154.

KIM, J. B. et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, v. 136, n. 3, p. 411-419, 2009. ISSN 0092-8674.

KIM, J. B. et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, v. 454, n. 7204, p. 646-650, 2008. ISSN 0028-0836.

LEVENSTEIN, M. E. et al. Basic fibroblast growth factor support of human embryonic stem cell self-renewal. *stem cells*, v. 24, n. 3, p. 568-574, 2006. ISSN 1549-4918.

LI, J. P.; ZHENG, C. L.; HAN, Z. C. Abnormal immunity and stem/progenitor cells in acquired aplastic anemia. *Critical reviews in oncology/hematology*, v. 75, n. 2, p. 79-93, 2010. ISSN 1040-8428.

LINDNER, S. E.; SUGDEN, B. The plasmid replicon of Epstein–Barr virus: mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells. *Plasmid*, v. 58, n. 1, p. 1-12, 2007. ISSN 0147-619X.

LINGNER, J. et al. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, v. 276, n. 5312, p. 561-567, 1997. ISSN 0036-8075.

MACARTHUR, B. D.; MA'AYAN, A.; LEMISCHKA, I. R. Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 10, n. 10, p. 672-681, 2009. ISSN 1471-0072.

MARION, R. M. et al. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, v. 4, n. 2, p. 141-54, Feb 6 2009. ISSN 1875-9777.

- MARTI, M. et al. Characterization of pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, v. 8, n. 2, p. 223-53, Feb 2013. ISSN 1750-2799.
- MEISNER, L. F.; JOHNSON, J. A. Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells. *Methods*, v. 45, n. 2, p. 133-141, 2008. ISSN 1046-2023.
- METCALF, D. The molecular control of blood cells. Harvard University Press, 1988. ISBN 0674581571.
- MIKKELSEN, T. S. et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*, v. 454, n. 7200, p. 49-55, 2008. ISSN 0028-0836.
- MITCHELL, J. R.; WOOD, E.; COLLINS, K. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature*, v. 402, n. 6761, p. 551-555, 1999. ISSN 0028-0836.
- MITSUI, K. et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *cell*, v. 113, n. 5, p. 631-642, 2003. ISSN 0092-8674.
- MORALLI, D. et al. An improved technique for chromosomal analysis of human ES and iPS cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 7, n. 2, p. 471-477, 2011. ISSN 1550-8943.
- NAKAGAWA, M. et al. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 107, n. 32, p. 14152-14157, 2010. ISSN 0027-8424.
- NARAZAKI, G. et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation*, v. 118, n. 5, p. 498-506, 2008. ISSN 0009-7322.
- OKITA, K. et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*, v. 31, n. 3, p. 458-466, 2013. ISSN 1549-4918.
- OKITA, K. et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, v. 322, n. 5903, p. 949-953, 2008. ISSN 0036-8075.
- OKITA, K.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, v. 448, n. 7151, p. 313-317, 2007. ISSN 0028-0836.
- OKITA, K.; YAMANAKA, S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 366, n. 1575, p. 2198-2207, 2011. ISSN 0962-8436.
- ORKIN, S. H.; ZON, L. I. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*, v. 132, n. 4, p. 631-644, 2008. ISSN 0092-8674.
- PARK, I.-H. et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, v. 134, n. 5, p. 877-886, 2008. ISSN 0092-8674.

PARK, I.-H. et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, v. 451, n. 7175, p. 141-146, 2008. ISSN 0028-0836.

PARRY, E. M. et al. Syndrome complex of bone marrow failure and pulmonary fibrosis predicts germline defects in telomerase. *Blood*, v. 117, n. 21, p. 5607-5611, 2011. ISSN 0006-4971.

PASQUINI, R e BITENCOURT, MA. Anemia aplastica. In: Zago MA, Passeto Falcão R, Pasquini R. *Hematologia: fundamentos e prática*. São Paulo, editor Atheneu, p.151-161 (2004).

PENG, J. et al. The TNF2 allele is a risk factor to severe aplastic anemia independent of HLA-DR. *Human immunology*, v. 64, n. 9, p. 896-901, 2003. ISSN 0198-8859.

PEREIRA, LV. Células-tronco embrionárias e clonagem terapêutica. in Covas DT, Zago MA. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina*. São Paulo, editor Atheneu, p. 21-34 (2006).

PESCE, M.; SCHÖLER, H. R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem cells*, v. 19, n. 4, p. 271-278, 2001. ISSN 1549-4918.

POGACIC, V.; DRAGON, F.; FILIPOWICZ, W. Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Molecular and cellular biology*, v. 20, n. 23, p. 9028-9040, 2000. ISSN 0270-7306.

POLO, J. M. et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, v. 28, n. 8, p. 848-855, 2010. ISSN 1087-0156.

REARDON, S, CYRANOSKI, D. Japan stem-cell trial stirs envy. *Nature*, v. 513, p. 287–288 2014.

ROSENFELD, S. et al. Antithymocyte globulin and cyclosporine for severe aplastic anemia: association between hematologic response and long-term outcome. *Jama*, v. 289, n. 9, p. 1130-1135, 2003. ISSN 0098-7484.

SAVAGE, S. A.; BERTUCH, A. A. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genetics in medicine*, v. 12, n. 12, p. 753-764, 2010. ISSN 1098-3600.

SCHEINBERG, P. et al. Horse antithymocyte globulin as salvage therapy after rabbit antithymocyte globulin for severe aplastic anemia. *American journal of hematology*, v. 89, n. 5, p. 467-469, 2014. ISSN 1096-8652.

SCHEINBERG, P.; YOUNG, N. S. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood*, v. 120, n. 6, p. 1185-96, Aug 9 2012. ISSN 1528-0020.

SCHEPER, W.; COPRAY, S. The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem Cell Reviews and Reports*, v. 5, n. 3, p. 204-223, 2009. ISSN 1550-8943.

- SERWOLD, T. et al. Early TCR expression and aberrant T cell development in mice with endogenous prerrearranged T cell receptor genes. *The Journal of Immunology*, v. 179, n. 2, p. 928-938, 2007. ISSN 0022-1767.
- SHIMAMURA, A. Inherited bone marrow failure syndromes: molecular features. *ASH Education Program Book*, v. 2006, n. 1, p. 63-71, 2006. ISSN 1520-4391.
- SOLDNER, F. et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, v. 136, n. 5, p. 964-977, 2009. ISSN 0092-8674.
- SOMMER, C. A. et al. Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, v. 27, n. 3, p. 543-9, Mar 2009. ISSN 1549-4918.
- STADTFELD, M. et al. Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell stem cell*, v. 2, n. 3, p. 230-240, 2008. ISSN 1934-5909.
- STADTFELD, M. et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, v. 322, n. 5903, p. 945-949, 2008. ISSN 0036-8075.
- STEWART, S. A.; WEINBERG, R. A. Telomerase and human tumorigenesis. *Seminars in cancer biology: Elsevier*, v. 10, n- 6, p. 399-406, 2000.
- SUHR, S. T. et al. Telomere dynamics in human cells reprogrammed to pluripotency. 2009. ISSN 1932-6203.
- TAKAHASHI, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007. ISSN 0092-8674.
- 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. ISSN 0092-8674.
- TATEISHI, K. et al. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 46, p. 31601-31607, 2008. ISSN 0021-9258.
- THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998. ISSN 0036-8075.
- TOWNSLEY, D. M.; DUMITRIU, B.; YOUNG, N. S. Bone marrow failure and the telomeropathies. *Blood*, v. 124, n. 18, p. 2775-2783, 2014. ISSN 0006-4971.
- VAZIRI, H. et al. Spontaneous reversal of the developmental aging of normal human cells following transcriptional reprogramming. *Regenerative medicine*, v. 5, n. 3, p. 345-363, 2010.
- VULLIAMY, T. et al. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature*, v. 413, n. 6854, p. 432-435, 2001. ISSN 0028-0836.

- WANG, F. et al. Molecular insights into the heterogeneity of telomere reprogramming in induced pluripotent stem cells. *Cell research*, v. 22, n. 4, p. 757-768, 2012. ISSN 1001-0602.
- WERNIG, M. et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 15, p. 5856-5861, 2008. ISSN 0027-8424.
- WINKLER, T. et al. Defective telomere elongation and hematopoiesis from telomerase-mutant aplastic anemia iPSCs. *J Clin Invest*, v. 123, n. 5, p. 1952-63, May 2013. ISSN 1558-8238.
- WONG, C. W. et al. Krüppel-Like Transcription Factor 4 Contributes to Maintenance of Telomerase Activity in Stem Cells. *Stem Cells*, v. 28, n. 9, p. 1510-1517, 2010. ISSN 1549-4918.
- XU, D. et al. Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 3, p. 808-813, 2009. ISSN 0027-8424.
- YAKUBOV, E. et al. Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 394, n. 1, p. 189-193, 2010. ISSN 0006-291X.
- YAMAGUCHI, H. et al. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *New England Journal of Medicine*, v. 352, n. 14, p. 1413-1424, 2005. ISSN 0028-4793.
- YAMANAKA, S. Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible. *Cell Stem Cell*, v. 7, n. 1, p. 1-2, 2010. ISSN 1934-5909.
- YOUNG, N. S. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. *Seminars in hematology*: Elsevier, 2000. 3-14 p.
- YOUNG, N. S.; ALTER, B. P. *Aplastic anemia: acquired and inherited*. WB Saunders Company, 1994. ISBN 0721637027.
- YOUNG, N. S.; BACIGALUPO, A.; MARSH, J. C. Aplastic anemia: pathophysiology and treatment. *Biol Blood Marrow Transplant*, v. 16, n. 1 Suppl, p. S119-25, Jan 2010. ISSN 1523-6536.
- YOUNG, N. S.; CALADO, R. T.; SCHEINBERG, P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood*, v. 108, n. 8, p. 2509-19, Oct 15 2006. ISSN 0006-4971.
- YOUNG, N. S.; SCHEINBERG, P.; CALADO, R. T. Aplastic anemia. *Curr Opin Hematol*, v. 15, n. 3, p. 162-8, May 2008. ISSN 1065-6251.
- YU, J. et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, v. 324, n. 5928, p. 797-801, 2009. ISSN 0036-8075.

YU, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, v. 318, n. 5858, p. 1917-1920, 2007. ISSN 0036-8075.

ZHANG, D. et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell research*, v. 19, n. 4, p. 429-438, 2009. ISSN 1001-0602.

ZHAO, X.-Y. et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, v. 461, n. 7260, p. 86-90, 2009. ISSN 0028-0836.

ZHOU, H. et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell*, v. 4, n. 5, p. 381-384, 2009. ISSN 1934-5909.

Anexo 1. Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

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

Ribeirão Preto, 13 de junho de 2014

Ofício nº 2068/2014
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 6212/2014

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **“GERAÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO PLURIPOTENTES INDUZIDAS (iPSCs) A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE PACIENTES COM ANEMIA APLÁSTICA ADQUIRIDA”**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 388ª Reunião Ordinária realizada em 09/06/2014, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

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

Atenciosamente.

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

Ilustríssimos Senhores
MARIA FLORENCIA TELLECHEA
PROF. DR. RODRIGO T. CALADO (Orientador)
Depto. de Clínica Médica

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo 2. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), aprovado pelo CEP.

	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO <u>Adulto</u>
INSTITUIÇÃO:	DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
NÚMERO DO ESTUDO:	14-H-RTC-0011
INVESTIGADORES:	Prof. Dr. Rodrigo T. Calado e Maria Florencia Tellechea
TÍTULO:	Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de fibroblastos de pacientes com anemia aplástica adquirida
Versão:	1 (25 de abril de 2014)

INTRODUÇÃO

Nós o (a) convidamos para participar de uma pesquisa clínica na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Primeiramente, gostaríamos que você soubesse que:
A participação neste estudo da FMRP-USP é totalmente voluntária.

Você pode optar por não participar do estudo ou mesmo que tenha aceitado participar, você pode decidir por sair do estudo a qualquer momento. Neste caso, você não vai perder nenhum benefício ou atendimento aos quais você tem direito.

Você pode não ter nenhum benefício direto por participar da pesquisa. Este estudo vai nos permitir aumentar o nosso conhecimento científico sobre a medicina e o funcionamento do corpo humano que pode nos auxiliar a ajudar outras pessoas e pacientes no futuro.

Em segundo lugar, é importante lembrar que algumas pessoas têm crenças pessoais, religiosas ou éticas que podem limitar ou impedir a participação em estudos médicos e pesquisas clínicas ou receber alguns tratamentos médicos (por exemplo, transfusão de sangue). Se você tem ou segue alguma dessas crenças, por favor discuta-as com o seu médico antes de concordar em participar no estudo.

Agora, nós vamos descrever esta pesquisa clínica. Antes de decidir por participar, por favor tome o tempo necessário para fazer perguntas e discutir os aspectos que causaram dúvida com a equipe de pesquisa da FMRP-USP, com a sua família, amigos, seu médico ou algum outro profissional de saúde.

1. Qual o objetivo deste estudo?
O objetivo deste estudo é o de produzir células-tronco a partir das células maduras doadas pelo paciente. As células-tronco são células "mãe" com função muito importante no nosso corpo, já que têm a capacidade de se multiplicar dando origem a diferentes tipos celulares, como por exemplo, células do sangue. Existem algumas doenças do sangue como a anemia aplástica onde estas células "mãe" se encontram praticamente ausentes no corpo, fazendo com que as células do sangue diminuam. Por tais motivos, pesquisadores da FMRP-USP estudam a geração de células-tronco utilizando outros tipos de células presentes no paciente com anemia aplástica como são as células da pele. Estes pesquisadores também procuram utilizar essas células-tronco produzidas a partir das amostras de pacientes para melhor entender porque a anemia aplástica acontece e testar novos potenciais tratamentos.

2. Você vai receber alguma medicação para teste?
Não, você não receberá nenhum remédio ou medicação em teste neste estudo.

3. Você receberá alguma outra medicação ou terapia que não esteja em teste?
Não, você não receberá nenhum remédio ou medicação neste estudo.

IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE

1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
- Adulto

INSTITUIÇÃO: DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

NÚMERO DO ESTUDO: 14-H-RTC-0011

INVESTIGADORES: Prof. Dr. Rodrigo T. Calado e Maria Florencia Tellechea

TÍTULO: Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de fibroblastos de
pacientes com anemia aplásica adquirida

Versão: 1 (25 de abril de 2014)

4. Qual avaliação médica é necessária para participar do estudo?

Exame médico não é necessário para participar do estudo.

5. Por quanto tempo você irá participar do estudo?

Você apenas tem de doar uma amostra de sangue (dois mililitros ou o volume de uma colher de chá) e uma amostra de pele da região de dentro do braço (uma "biópsia por punch", que é uma espécie de uma pinça parecida com um canudinho que faz uma pequena perfuração na pele do braço (de onde é retirada a amostra de pele) uma única vez. Caso você não queira mais que o seu sangue ou pele sejam utilizados no estudo, você pode pedir para que as suas amostras de sangue e pele sejam retiradas do estoque e destruídas e seus resultados apagados. Para isto, você deve entrar em contato com o Dr. Rodrigo Calado na FMRP-USP, telefone (16) 3602-2294.

6. Os resultados dos testes serão informados a você?

É seu direito ter acesso aos resultados dos testes da pesquisa. Esses resultados não serão fornecidos automaticamente a você, mas caso você se interesse em saber o resultado, deverá entrar em contato com o Dr. Rodrigo T. Calado da FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2294.

7. Quais são os riscos e desconfortos esperados?

O risco é mínimo e está relacionado à coleta do sangue e pele e ao estoque temporário das amostras. Todas as informações obtidas nos testes realizados serão mantidas em sigilo e apenas os pesquisadores responsáveis terão acesso à sua amostra guardada no freezer, às informações obtidas e à identificação da sua amostra de sangue. As amostras guardadas no freezer serão numeradas e não conterão nenhuma informação que possa identificar o doador. O desconforto que você pode sentir na coleta de sangue é apenas da picada da agulha e um possível hematoma que possa se formar no local. Na "biópsia por punch", o procedimento é realizado com material estéril, com anestesia local e pode dar um ponto. O desconforto que você pode sentir é mínimo e somente em decorrência do furo que se faz, como um beliscão. Infecção no local da coleta pode acontecer muito raramente.

8. Há algum benefício por participar do estudo?

Não, não há nenhum benefício imediato para você por participar do estudo. Você poderá saber o resultado dos testes, caso tenha interesse.

9. Há algum exame de laboratório adicional que será realizado?

Não, não serão realizados exames laboratoriais adicionais. Caso os pesquisadores da FMRP-USP desejem realizar outros testes ou novas pesquisas utilizando a sua amostra de sangue ou pele, eles tentarão entrar em contato com você para obter a permissão do uso da amostra.

10. Armazenamento e distribuição das amostras de sangue para pesquisa:

As amostras para pesquisa serão estocadas em nosso laboratório em freezer por período limitado de tempo sob o cuidado e supervisão dos investigadores da FMRP-USP, que também serão o contato entre você e a informação obtida com o estudo da sua amostra de sangue. Os tubos contendo as amostras de sangue não terão nenhum código ou nenhum tipo de identificação que possa ligar o seu nome à amostra. Nenhum outro indivíduo, incluindo seus familiares, médico ou empregado terão acesso às amostras estocadas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
- Adulto

INSTITUIÇÃO: DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

NÚMERO DO ESTUDO: 14-H-RTC-0011

INVESTIGADORES: Prof. Dr. Rodrigo T. Calado e Maria Florencia Tellechea

TÍTULO: Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de fibroblastos de
pacientes com anemia aplásica adquirida

Versão: 1 (25 de abril de 2014)

11. Os resultados dos exames realizados:

É muito pouco provável que o que nós aprendermos com este estudo tenha um benefício direto para você. Estes resultados poderão ser úteis para o tratamento de pacientes no futuro.

12. Tomando a própria decisão

Este documento descreve para você os fatos relacionados a esta pesquisa clínica. Se você tiver alguma dúvida, sinta-se à vontade para fazer as perguntas necessárias para o investigador para que a sua decisão seja consciente e bem informada. Você receberá uma cópia deste documento para guardar em seu arquivo pessoal.

OUTRAS INFORMAÇÕES IMPORTANTES

1. Sigilo. Quando os resultados de uma pesquisa clínica da FMRP-USP são publicados em revistas médicas e científicas ou em congressos médicos, não há nenhuma identificação das pessoas que participaram do estudo. A FMRP-USP não irá fornecer nenhuma informação sobre a sua participação no estudo sem a sua permissão por escrito.

2. Complicações relacionadas à pesquisa. O grupo de pesquisadores da FMRP-USP irá fornecer o atendimento médico necessário caso alguma lesão ou complicação ocorra decorrente da sua participação no estudo.

3. Perguntas. Se você tiver alguma dúvida ou preocupação relacionadas a esta pesquisa clínica ou sobre os seus direitos como participante, contate o investigador principal, Dr. Rodrigo Calado, pelo telefone (16) 3602-2294 ou o Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP pelo telefone (16) 3602-2228.

4. Termo de consentimento livre e esclarecido. Por favor, guarde a sua cópia deste documento

COMPLETE OS ITENS APROPRIADOS ABAIXO:

A. Consentimento do Participante Adulto

Li as informações acima sobre o estudo e recebi explicações sobre a participação no estudo. Portanto, dou o meu consentimento para participar do estudo.

Assinatura

Data

Nome

Assinatura do Investigador

Data

Assinatura da Testemunha

Data

Nome

Nome

IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE

3

Anexo 3. Parecer consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais (CETEA).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 018/2014, sobre o projeto intitulado “*Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de fibroblastos de pacientes com anemia aplástica adquirida*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 28 de julho de 2014.

We certify that the protocol nº 018/2014, entitled “*Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from fibroblasts of patients with acquired aplastic anemia*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 07/28/2014.

Ribeirão Preto, 28 de julho de 2014.

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Júnior
Vice-Presidente da Comissão de Ética
no Uso de Animais, em exercício

Anexo 4. Parecer consubstanciado da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) para produção viral.

Fundação
Hemocentro RP

Ribeirão Preto, 013 de janeiro de 2015.

O projeto de pesquisa intitulado “Geração de Células-Tronco Pluripotentes induzidas (iPSCs) a partir de Fibroblastos de pacientes com anemia aplástica adquirida”, em nome de Maria Florencia Tellechea, orientada pelo Profº Drº Rodrigo do Tocantins Calado de Saloma Rodrigues, foi avaliado por esta Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2014.004-02**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório final da pesquisa.

Virgínia Picanço e Castro
Membro da CIBio
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto

Ilustríssimo Senhores
Maria Florencia Tellechea
Profº Drº Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues

Anexo 5. Parecer consubstanciado da Comissão Interna de Biossegurança (CIBio) para utilização de plasmídeos episomais.

Ribeirão Preto, 13 de julho de 2015.

O projeto de pesquisa intitulado “Geração de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) a partir de células de pacientes com anemia aplástica adquirida”, em nome de Maria Florencia Tellechea, orientada pela Profª Drª Rodrigo do Tocantis Calado de Saloma Rodrigues, foi avaliado pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), recebendo o parecer **APROVADO** e registrado sob número de processo: **297/2015.006-01**.

Lembramos que deverá ser apresentado a CIBio, o relatório final da pesquisa.

Simone Kashima Haddad

Presidente da CIBio

Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto