Universidade de São Paulo

Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas
(Bioquímica)

ILANA GABANYI

Produção e uso da proteína de fusão
VP22.Pax4 na diferenciação de células-
tronco em células produtoras de insulina

São Paulo
Data de depósito na CPG
08/09/2010

ILANA GABANYI

Produção e uso da proteína de fusão
VP22.Pax4 na diferenciação de células-
tronco em células produtoras de insulina

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
da Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Orientadora: Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar

São Paulo

2010

Ilana Gabanyi

Produção e uso da proteína de fusão VP22.Pax4 na diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina

.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr(a). _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedico este trabalho à minha tia Cecília que por ter lutado tão bravamente contra o diabetes me inspirou a tentar buscar uma solução para este problema.

AGRADECIMENTOS

A Profa Dra Mari Cleide Sogayar, pela orientação e ensinamentos tanto para vida acadêmica quanto para vida pessoal.

Ao Dr Fernando Lojudice, meu supervisor pelos seus vários ensinamentos durante a minha Iniciação Científica e por ter me ajudado a formular este projeto.

Ao Dr Marcos Demasi e ao Prof Dr Miguel Garay pela orientação não formal.

À Patrícia M Kossugue por ceder as células hDPSC e por me ajudar com os protocolos de diferenciação.

Ao Dr Eduardo Rebelato pela imensa ajuda com os experimentos de microscopia confocal.

À Marluce por ter me ajudado a conseguir o material necessário para terminar este projeto.

À Roberta, Érica, Luciana Gomes e Fernanda Forni pelas diversas ajudas no dia a dia.

A todo pessoal da UIPH e do LBCM.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação do Instituto de Química.

À FAPESP, ao CNPq, à FINEP e ao BNDES que financiaram este projeto de pesquisa.

À Beth Gabanyi, ao Diogo Castro, Jose Renato Cussiol e Rodrigo Toledo pela revisão e sugestões durante a escrita desta dissertação.

Aos meus pais por todo apoio.

E aos que esqueci de agradecer.

Só o conhecimento liberta
Jose Martí

RESUMO

Gabanyi, I. **Produção e uso da proteína de fusão VP22.Pax4 na diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina.** 2010. 72p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O Diabetes Mellitus tipo I (DM1) é causado pela destruição auto-imune das células β pancreáticas, encontradas na porção endócrina do pâncreas, constituída pelas ilhotas pancreáticas. As células β são responsáveis pela produção e liberação de insulina, um hormônio que promove a internalização da glicose pelas células. Junto com outros hormônios, a insulina é um dos principais reguladores do nível de glicose sanguínea (glicemia).

Uma das terapias utilizadas para o tratamento do DM1 é o transplante de ilhotas pancreáticas. Entretanto, um dos maiores problemas em relação a esta terapia é a falta de massa celular adequada para ser infundida no paciente. Uma tentativa para solucionar este problema, é o desenvolvimento de fontes alternativas de células produtoras de insulina, como as células-tronco, que possuem a capacidade de se diferenciarem em diversos tipos de células, inclusive nas produtoras de insulina.

Pax4 é um dos fatores de transcrição responsáveis pela diferenciação de células β , sendo essencial para o apropriado desenvolvimento e maturação destas, constitui um bom candidato para induzir a diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina *in vitro*.

Para introduzir o Pax4 nas células-tronco, sem provocar alterações no genoma das células diferenciadas, em virtude dos potenciais efeitos indesejáveis de vetores que se integram ao genoma celular, recorreu-se às proteínas contendo domínio de transdução

(PTDs), que são capazes de carregar a proteína Pax4, através da membrana, diretamente para o interior das células. As PTDs são pequenas sequências peptídicas que permitem a translocação de proteínas através de membranas celulares e sua internalização em células-alvo. Uma das PTDs mais comumente estudadas é a VP22, produto do gene U_L49 do Herpes Simplex vírus tipo I.

Portanto, a proteína de fusão VP22.Pax4 permitiria que o Pax4 fosse inserido em células-tronco, possibilitando que este fator de transcrição ative a transcrição de certos genes que aumentariam a eficiência de diferenciação das células-tronco em células produtoras de insulina.

Para tal, amplificamos e clonamos o cDNA do *Pax4* a partir do RNA das células RINm5f de insulinoma murino, construímos o vetor pVP22.Pax4, o qual foi transfectado em células CHO, que passaram a produzir a proteína de fusão VP22.Pax4.

Após o tratamento de células-tronco com a proteína de fusão VP22.eGFP e análise por microscopia confocal, comprovamos que a VP22 é capaz de transduzir a proteína de fusão também neste tipo celular. Portanto, incorporamos a um dos passos do protocolo de diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina, utilizado em nosso laboratório, a co-cultura com células CHO produtoras de VP22.Pax4.

Observamos que a introdução do Pax4 leva a formação de um número maior de agregados celulares (*clusters*) produtores de insulina. Concluimos, então, que a utilização da VP22 como ferramenta para internalização de proteínas em células-tronco é viável e que a adição do Pax4 pode trazer melhorias para protocolos que busquem a produção de células produtoras de insulina.

Palavras-chave: Diabetes, Pax4, VP22, PTDs, células-tronco, diferenciação celular.

ABSTRACT

Gabanyi, I. **Production and use of the VP22.Pax4 fusion protein for stem cells differentiation into insulin-producing cells.** 2010. 72p. Masters Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Diabetes Mellitus type 1 (DM1) is caused by an auto-immune destruction of the pancreatic β cells, found in the endocrine portion of the pancreas, known as pancreatic islets. These β cells are responsible production and release of insulin, a hormone which promotes glucose internalization by cells. Along with other hormones, insulin is a major regulator of blood glucose levels (glycemia).

One of the therapeutical strategies used to treat DM1 is pancreatic islet transplantation. One of the major problem related to this therapy is the lack of adequate cell mass to be infused into the patients. An attempt to solve this problem is the development of an alternative source of insulin-producing cells by differentiation of stem cells, which display this differentiating potential.

Pax4 is one of the transcription factors responsables for β cell differentiation, being essential for its proper development and maturation, therefore being a good candidate to induce stem cell differentiation into insulin producing cells *in vitro*.

A promising alternative to avoid the alterations of the differentiated cells genome due to its undesirable effects of integrating vectors, but yet allowing the Pax4 to act in diferentiation within the cells are the proteins with a transduction domain (PTDs), which would have the ability to lead the Pax4 protein directly into the cells. The Pax4 could thus act in the nucleus and generate specific transcriptional responses.

The PTDs are small peptide sequences which allow translocation of proteins across cell membranes and their internalization into target cells. One of the most commonly studied PTDs is the VP22, a product of the U_L49 gene from Herpes Simplex virus type I.

Therefore, the VP22.Pax4 fusion protein would transduce Pax4 into the stem cells, thus allowing the transcription activation of certain genes by Pax4, leading to improvement in the process of stem cells differentiation into insulin-producing cells.

To this end, we cloned the *Pax4* cDNA from RINm5f murine insulinoma cells, constructed the pVP22.Pax4 vector and transfected this construct into CHO cells, which then produced the VP22.Pax4 fusion protein. Upon verifying that VP22 was also able to transduce proteins into stem cells, by confocal microscopy analysis, after the treatment of these cells with the fusion protein VP22.eGFP, we incorporated the fusion protein VP22.Pax4 to one of the steps of the protocol used for stem cells differentiation into insulin-producing cells in our lab, by co-culturing with CHO cells producing VP22.Pax4.

We observed that the addition of Pax4 led to the formation of a higher number of insulin producing cell clusters, therefore we conclude that VP22 may be used as a tool to internalize proteins into stem cells, and that the addition of Pax4 may improves protocols seeking the production of insulin-producing cells.

Keywords: Diabetes, Pax4, VP22, PTDs, Stem Cells, Cell differentiation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>Arx</i> - aristaless related homeobox	<i>Mix11</i> - Mix1 homeobox-like 1
<i>Bax</i> - Bcl2-associated X protein	mRNA - RNA mensageiro
<i>Bcl-xl (Bcl2l1)</i> - Bcl2-like 1	<i>Nes</i> - nestina
EGF - epidermal growth factor	<i>Nkx6.1</i> - NK6 homeobox 1
eGFP - enhanced Green Fluorescent Protein	<i>Ng3 (Neurog 3)</i> - neurogenin 3
FGF - fibroblast growth factor	<i>Oct-4 (Pou5f)</i> - POU class 5 homeobox 1
<i>Foxa2</i> - forkhead box A2	<i>Pax4</i> - Paired Box 4
<i>Glut2 (Slc2a2)</i> - solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter) member 2	<i>Pdx1</i> - Pancreatic and duodenal homeobox 1
<i>Hb9 (Mnx1)</i> - motor neuron and pancreas homeobox 1	siRNA - short interfering RNA
HIV - Human Immunodeficiency Virus	TAT - Transactivating regulatory protein
HSV - Herpes simplex virus	TGFβ (TgfB) - transforming growth factor, beta 1
<i>Isl1</i> - ISL LIM homeobox 1 (Islet 1)	VP16 - Virion polypeptide 16
	VP22 - Virion polypeptide 22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1.Diabetes Mellitus.....	13
1.2.Tratamentos para o combate do Diabetes tipo 1	14
1.3.Células-tronco e diferenciação celular	17
1.4.Papel do <i>Pax4</i> no desenvolvimento pancreático.....	19
1.5.VP22: uma proteína com domínio de transdução	25
2. OBJETIVOS	31
3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	32
3.1.Modelos celulares	32
3.2.Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares	32
3.3.Extração e Purificação de RNA	33
3.4.Construção de bibliotecas de cDNA	33
3.5.Desenho de <i>primers</i>	33
3.6.Construção dos plasmídeos	34
3.7.Transformação de bactérias <i>DH10B</i>	35
3.8.Transfecção transitória e estável	35
3.9.Ensaio de Western blot	36
3.10.Tratamento das células-tronco hDPSC e mESC com VP22.eGFP	36
3.11.Análise por microscopia confocal	37
3.12.Diferenciação das mESCs em células produtoras de insulina	37
3.13.Análise da diferenciação das células-tronco murinas	38

4. RESULTADOS	39
4.1.Amplificação do cDNA correspondente ao gene Pax4 através de RT-PCR.....	39
4.2.Obtenção das novas construções plasmideais pVP22.Pax4 e pFLAG.Pax4	40
4.3.Confirmação da expressão de VP22.Pax4	43
4.4.Obtenção e seleção de clones celulares que expressam VP22.Pax4...	44
4.5.Obtenção da nova construção plasmideal pVP22.eGFP	46
4.6.Internalização da VP22 em células-tronco.....	51
4.7.Formação de clusters e produção de insulina nas células diferenciadas	53
4.8. Expressão gênica das células diferenciadas	55
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes Mellitus

O Diabetes constitui um grupo heterogêneo de doenças crônicas que tem como elementos comuns a hiperglicemia e a intolerância à glicose, que podem ocorrer devido a uma deficiência na produção de insulina e/ou uma deficiência na ação da insulina. Este grupo de doenças é classificado de acordo com sua etiologia e apresentação clínica (WHO, 1999).

O Diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) é causado pela destruição auto-imune das células β pancreáticas; pode ocorrer em pessoas de qualquer idade sendo mais comum em crianças e adultos jovens. O tipo 2 é caracterizado pela resistência a insulina e uma relativa deficiência na produção de insulina, esta bastante associada à obesidade, sendo diagnosticada geralmente em pessoas com mais de 40 anos; havendo, contudo, cada vez mais relatos de crianças que desenvolvem este tipo de diabetes. O Diabetes gestacional apresenta-se como uma intolerância a glicose, com diversos graus de severidade, que se inicia durante a gravidez; condição esta que pode ou não persistir após o fim da gestação. Existem ainda outros tipos específicos que ocorrem com menor frequência e estão relacionados com mutações específicas ou a outras doenças (WHO, 1999; SBD, 2010).

A palavra Diabetes, de origem grega, significa “sifão” e faz referência a sede e urina em excesso apresentadas pelos diabéticos. Após descobrirem que a urina destes pacientes era adocicada, deram o nome *mellitus*, que em latim significa mel ou adocicado. Desse modo, esta doença que causava muita sede, produzindo um excesso de urina adocicada, passou a se chamar Diabetes Mellitus.

Atualmente, estima-se que haja no mundo, 285 milhões de pessoas sejam afetadas pelo Diabetes Mellitus e que, em 2030, este número passará a ser de 438 milhões. No Brasil, esta doença já atinge mais de sete milhões de pessoas (IDF Diabetes Atlas, 2009).

A incidência de DM1 tem crescido consideravelmente nos países desenvolvidos a partir dos anos 50 (PATTERSON et al., 2009). Em crianças, esta incidência tem um crescimento anual de 3% sendo, hoje em dia, aproximadamente 480 mil crianças afetadas pela doença (IDF Diabetes Atlas, 2009). Estudos também apontam que em 2020 o número de crianças menores de cinco anos com DM1 irá dobrar e os casos entre crianças menores de quinze anos aumentarão em 70% (PATTERSON et al., 2009).

No DM1, com a destruição auto-imune das células β pancreáticas, o corpo perde a capacidade de produzir e liberar insulina na corrente sanguínea. A insulina é o hormônio que permite que a glicose circulante seja internalizada pelas células, sendo portanto indispensável para a manutenção da normoglicemia. A alta constante de glicose no sangue está diretamente ligada às complicações secundárias que ocorrem em muitos casos, como a retinopatia, neuropatia, nefropatia, doenças cardíacas e amputações, entre outras.

1.2 Tratamentos para o combate do Diabetes tipo 1

Desde o descobrimento da insulina em 1921 por Frederick Banting e Charles Best, o tratamento mais frequentemente utilizado para combater o DM1 tem sido a reposição de insulina, feita através de múltiplas injeções diárias no paciente ou através de bomba de insulina de uso externo. Este tratamento gera uma dependência crônica, assim como a necessidade de monitorização constante da glicemia, pois o risco de hipoglicemias graves pode aumentar consideravelmente. O *Diabetes Control and Complications Trial*

comprovou que um controle rígido da glicemia é capaz de retardar e diminuir a progressão de complicações tardias, porém não de impedi-las (DCCT, 1993).

Além disso, há um grupo de pessoas que, mesmo seguindo rigorosamente o tratamento com insulina, não são capazes de atingir um controle satisfatório da glicemia sanguínea, passando por episódios de hipoglicemias severas e apresentando uma progressão rápida dos efeitos secundários da doença. Este é um subtipo do DM1 conhecido como DM1 Hiperlabil. Nestes casos, pode-se realizar o transplante de pâncreas, que requer um procedimento cirúrgico extenso e o uso contínuo de imunossupressores, não sendo comumente utilizado, é indicado, preferencialmente, em casos onde há necessidade de transplante simultâneo de rim.

Uma outra alternativa, desenvolvida mais recentemente, é o transplante de ilhotas pancreáticas, que constituem a porção endócrina do pâncreas, nas quais são encontradas as células β . Este tipo de transplante envolve um procedimento cirúrgico muito mais simples, entretanto requer também o uso de imunossupressores. O grande impulso do transplante de ilhotas pancreáticas ocorreu em 1988 com o desenvolvimento de uma técnica automatizada para o isolamento das ilhotas (RICORDI et al., 1988) e, mais tarde, com o desenvolvimento do “Protocolo de Edmonton” (SHAPIRO et al., 2000), que visava a melhoria da qualidade e quantidade das ilhotas a serem transplantadas, permitindo uma aplicação mais ampla desta tecnologia.

Atualmente, tem sido demonstrado que pessoas que sofrem de DM1 podem ser curadas através do transplante de ilhotas pancreáticas humanas (MARZORATI et al., 2007), sendo a quantidade e a qualidade das ilhotas isoladas fundamentais para o sucesso do transplante (SHAPIRO et al., 2006).

Para serem transplantadas, as ilhotas devem ser isoladas do pâncreas através da digestão mecânica e enzimática, um processo ineficiente, considerando que o pâncreas de um adulto contém aproximadamente 2×10^9 células β (2 a 3% do órgão total) e que uma fração significativa das ilhotas transplantadas pode ser perdida imediatamente após o transplante. É preciso que uma grande quantidade de ilhotas seja infundida, para garantir maior probabilidade de sucesso no transplante, sendo muitas vezes necessário transplantar ilhotas de até quatro doadores (JONES et al., 2008).

Dados do *Collaborative Islet Transplantation Registry* (CITR) mostram que, dos pacientes que ficaram independentes de insulina após o transplante, 70% se mantiveram assim por pelo menos um ano e 45% por até três anos (CITR Annual Report, 2009).

A aplicação mais freqüente do transplante de ilhotas tem sido dificultada pela limitada disponibilidade de doadores em condições ideais e pela prioridade atribuída ao transplante de órgão total quando há pâncreas disponíveis. Além de estarem sujeitos aos critérios gerais de elegibilidade, os doadores de ilhotas devem ter idade entre 20 e 65 anos, histórico normal de tolerância à glicose, massa corporal entre 20 e 35 kg/m², entre outros (BERMAN et al., 2009).

No Japão, o transplante de ilhotas chegou a ser feito a partir de doador vivo, pois este procedimento não pode ser feito a partir de doadores com morte cerebral, devido ao número muito limitado deste tipo de doador (MATSUMOTO et al., 2006).

A fim de superar esta limitação e permitir que o transplante de ilhotas pancreáticas seja realizado de maneira mais ampla, fontes alternativas capazes de gerar células β estão sendo estudadas, sendo estas: diferenciação de células-tronco, expansão das células β e transdiferenciação de células do fígado ou de outras células pancreáticas em células β (PURI e HEBROK, 2010).

Resultados animadores estão sendo obtidos através da diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina (PURI e HEBROK, 2010). A otimização de um protocolo que permita diferenciar células-tronco em células capazes de responder corretamente aos estímulos da glicose, produzindo insulina suficiente para manter a normoglicemia, permitiria que um número maior de pessoas fosse tratado, pois eliminaria o problema da falta de massa celular adequada para ser infundida no paciente. A utilização mais frequente do transplante de células produtoras de insulina evitaria as consequências de uma cirurgia extensa como no caso do transplante de órgão sólido e poderia ainda evitar o uso de imunossupressores, caso seja um transplante autólogo, uma vez que, idealmente, seria possível isolar as células-tronco do próprio paciente a ser tratado e reimplantar tais células após sua diferenciação *in vitro*.

1.3 Células-tronco e diferenciação celular

Existem diversos tipos de células-tronco, as quais compartilham a capacidade de se autorrenovar e originar distintos tipos celulares.

As células-tronco totipotentes são as únicas capazes de originar qualquer tipo de tecido, incluindo os tecidos extraembrionários. As células-tronco conhecidas como pluripotentes são aquelas capazes de originar as células dos três folhetos embrionários, mas não de gerar os tecidos extraembrionários. As células-tronco com menor capacidade de diferenciação são as multipotentes, capazes de gerar apenas alguns tipos celulares, geralmente relacionados ao tecido do qual elas provêm. Os dois primeiros tipos são conhecidos como células-tronco embrionárias, e o último é conhecido como células-tronco adultas.

A diferenciação é caracterizada como uma restrição progressiva no potencial de desenvolvimento da célula. Complexas redes regulatórias asseguram a transição de uma célula progenitora multipotente para uma célula diferenciada com uma única identidade funcional (PURI e HEBROK, 2010).

A comprovação da existência de células-tronco no sangue, feita por Till e McCulloch em 1961, o isolamento e o estabelecimento de uma linhagem de células-tronco embrionárias humanas originadas do blastocisto, realizado por Thomson *et al* em 1998 e finalmente, a formação de células pluripotentes induzidas a partir de fibroblastos murinos obtida pelo grupo do Yamanaka em 2006, foram os principais avanços na área de pesquisas com células-tronco. Além de possibilitarem um maior entendimento a respeito da formação dos diferentes tipos celulares, estes avanços também contribuem para que seja possível o uso das células-tronco para a modelagem e o tratamento de diversos tipos de doenças, sendo uma delas o Diabetes Mellitus (BRIGNIER e GEWIRTZ, 2010).

Futuros aperfeiçoamentos no protocolo de produção de células produtoras de insulina, a partir de células-tronco, podem levar à formação de um estoque ilimitado de células a serem usadas no tratamento do Diabetes (SEGEV et al., 2004). Para se atingir tal objetivo, é necessário entender como as células β pancreáticas são formadas durante a embriogênese, seu entorno e os genes essenciais para seu desenvolvimento e maturação.

1.4 Papel do gene *Pax4* no desenvolvimento pancreático

O desenvolvimento do pâncreas é coordenado através de uma complexa interação entre fatores extracelulares (Hedgehog, FGF, EGF, Notch, TGF β ...) e fatores de transcrição que determinam desde sua expansão primitiva até a maturação final dos diferentes tipos celulares presentes neste órgão (OLIVER-KRASINSKI e STOFFERS, 2008).

O pâncreas é composto basicamente por três tipos celulares principais, as células ductais, as células exócrinas, que produzem enzimas digestivas e as células endócrinas, que produzem diferentes hormônios sendo conhecidas como ilhotas pancreáticas ou ilhotas de Langerhans, em homenagem a Paul Langerhans, que as descobriu em 1869.

A formação deste órgão se inicia a partir da endoderme do intestino primitivo. Em murinos, as células que darão origem ao pâncreas se tornam evidentes a partir do dia embrionário 8.5 (e8.5), quando estas células passam a expressar *Pdx1*. Em humanos, isto ocorre no início da terceira semana de gestação.

Já próximo ao e9.5 (fim da terceira semana em humanos), ocorre a primeira transição, com o brotamento e posterior ramificação do epitélio. Durante a segunda transição, por volta do e13.5, a maioria das células endócrinas já se encontra comprometida com seu destino final, sendo detectados todos os tipos de células endócrinas presentes no pâncreas maduro, células β -produtoras de insulina, δ -produtoras de somatostatina, α -produtora de glucagon, PP-produtoras de polipeptídeo pancreático e ϵ -produtora de grelina (em humanos, a presença das células ϵ no pâncreas ainda é duvidosa). As células exócrinas começam a aparecer também neste período. Em humanos, a fase final do desenvolvimento pancreático ocorre durante a sétima semana de gestação (SPENCE e WELLS, 2007 e OLIVER-KRASINSKI e STOFFERS, 2008).

Dentre as células endócrinas, as células β são as mais abundantes, constituindo aproximadamente 60% das ilhotas humanas e 75% das ilhotas murinas (CABRERA et al., 2006). Dentre os genes responsáveis pela diferenciação das células progenitoras, presentes no pâncreas, em células β , está o *Pax4* (SOSA-PINEDA et al., 1997).

O *Pax4* pertence à família de genes *Pax*, os quais codificam proteínas que atuam como fatores de transcrição. Por atuarem no padrão de formação do embrião e na proliferação e diferenciação celular, desempenham um papel importante na organogênese de vertebrados (CHI e EPSTEIN, 2002). Estão agrupadas, nesta família, nove proteínas divididas em quatro subgrupos segundo suas similaridades estruturais. O *Pax4* juntamente com o *Pax6* formam o subgrupo IV por apresentarem dois domínios de ligação ao DNA, um domínio *paired* e um *homeodomain* (LANG et al., 2007). Sendo bastante conservado durante a evolução, o *PAX4* presente em humanos e camundongos apresenta 83,1% de homologia de sequência para o gene e 80% de identidade para a proteína (INOUE et al., 1998). Este gene é transitoriamente expresso no estômago posterior, pâncreas, duodeno e medula espinhal ventral de embriões (SOSA-PINEDA, 2004). No pâncreas, a expressão do *Pax4* está restrita aos estágios iniciais de diferenciação das células endócrinas já que, nestas células, seus transcritos não são detectados em recém-nascidos ou adultos (SOSA-PINEDA et al., 1997; SMITH et al., 1999).

A maioria das células endócrinas do pâncreas descende diretamente de células progenitoras endócrinas que expressam *Pax4* (GREENWOOD et al., 2007), portanto, a função do *Pax4* parece ser essencial para o desenvolvimento dos distintos tipos de células endócrinas presentes no pâncreas adulto.

O produto do gene *Pax4* é um fator de transcrição responsável pela diferenciação e maturação de células β , que, juntamente com o *Pdx1*, é essencial para o desenvolvimento

apropriado destas células (BLYSZCZUK et al., 2003). Seu mRNA é detectado durante a embriogênese, a partir do e9.5, tornando-se máximo em e13.5-15.5, que corresponde ao período de grande expansão das células β , declinando a partir de então (BRUN et al., 2007).

Na falta do Pax4, o número de células produtoras de insulina e de somatostatina fica muito reduzido, enquanto que o número de células produtoras de glucagon (SMITH et al., 1999) e de grelina (PRADO et al., 2004) é aumentado. Células que coexpressam glucagon e grelina também são encontradas (HELLER et al., 2005; WANG et al., 2008). O aumento do número de células α é atribuído à falta de repressão exercida pelo Pax4 sobre o gene *Arx*, que codifica um fator de transcrição específico para estas células (COLLOMBAT et al., 2003).

Pax4 já foi descrito como repressor transcricional dos genes para *amilina*, *glucagon*, *Arx* e *grelina* (CAMPBELL et al., 1999; RITZ-LASER et al., 2002; COLLOMBAT et al., 2005; WANG et al., 2008), corroborando a teoria de que Pax4 funcionaria primariamente como um repressor transcricional (FUJITANI et al., 1999; SMITH et al., 1999), sendo, provavelmente, sua porção carboxi-terminal necessária para uma eficiente repressão (WANG et al., 2008).

Quando o *Pax4* não é expresso no pâncreas, a expressão de outros genes que são necessários para a diferenciação de células β , tais como *Pdx1*, *HB9* e *Nkx6-1*, torna-se muito reduzida, o que indica que a atividade do fator Pax4 nas células β é necessária, também, para aumentar o nível de expressão de *Pdx1*, induzir a expressão de insulina e de *HB9* e manter a expressão do *Nkx6.1* (WANG et al., 2004).

Estudos em camundongos mutantes *Pax4* $-/-$ demonstraram que, na falta deste gene, 90% das células tornaram-se incapazes de se desenvolver em células β (WANG et al.,

2004). Nestes camundongos, um tipo de célula endócrina distinta é encontrado, células que coexpressam *ghrelina*, *glucagon*, *amilina* e baixos níveis de *Pdx1* (WANG et al., 2008). Além de deficiências no pâncreas, camundongos *Pax4*^{-/-} também apresentam a perda de diversos tipos de células endócrinas no duodeno, jejuno e estômago (LARSSON et al., 1998), apresentando uma deficiência gastrointestinal severa.

O *PAX4* também parece estar associado a diversas alterações no organismo, como o Diabetes e o Câncer. Em melanomas, seu nível de expressão é extremamente baixo quando comparado ao tecido pigmentoso normal e a superexpressão de *PAX4* em células de melanoma humano reduziu seu crescimento *in vitro*, indicando um possível papel do *PAX4* como supressor de tumor (HATA et al., 2008). Já em doenças hematológicas malignas, o *PAX4* parece atuar como um oncogene (LI et al., 2006).

Estudos associando mutações no gene *PAX4* ao Diabetes ainda são um pouco controversos. Alguns grupos não encontraram correlação alguma com o Diabetes tipo 1 (HOWSON et al., 2009; GYLVIN et al., 2005; MAIER et al., 2005), contradizendo os estudos feitos em escandinavos (HOLM et al., 2004), e em crianças suíças e alemãs (BIASON-LAUBER et al., 2005) portadores de DM1, onde os autores afirmam que mutações no *PAX4* podem estar diretamente ligadas ao desenvolvimento da doença.

Essa correlação também pode ser encontrada em outros tipos de Diabetes, como no caso de japoneses com Diabetes tipo 2 (SHIMAJIRI et al., 2001 e TOKUYAMA et al., 2006), de pessoas com ancestrais africanos com Diabetes com tendência à cetoacidose (*ketosis-prone*) (MAUVAIS-JARVIS et al., 2007), de tailandeses com diabetes tipo MODY (*maturity onset diabetes of the young*) (PLENGVIDHYA et al., 2007), entre outros. Polimorfismos no *PAX4*, também foram associados à longevidade em coreanos (PARK et

al., 2009). Estes estudos genéticos sugerem um importante papel do PAX4 na regulação das funções e/ou massa de células β em ilhotas adultas.

A proliferação de células β , induzida por activina A, coincide com o aumento do mRNA de *Pax4* nestas células (UEDA, 2000). A superexpressão de *Pax4* em ilhotas murinas resulta no aumento da expressão de *c-myc*, *Id2* e do gene anti-apoptótico *Bcl-xl*. Estes resultados sugerem que a expressão do Pax4 leve à uma maior proliferação das células β , através da ativação da via *c-myc/Id2*, além de gerar uma maior resistência à apoptose através da ativação do gene *Bcl-xl* (BRUN et al., 2004).

A expressão do *Pax4* também é capaz de auxiliar a diferenciação de células-tronco embrionárias em células produtoras de insulina (BLYSZCZUK et al., 2003; LIN et al., 2007; LIEW et al., 2008). A transfecção de genes como o *Pdx1* ou o *Pax4* em células-tronco leva à maior eficiência da diferenciação destas células em células produtoras de insulina, porém uma maior taxa de diferenciação é alcançada quando se utiliza o *Pax4* (BLYSZCZUK et al., 2003). A superexpressão do *Pax4* em células-tronco, eleva os níveis de expressão dos genes *Foxa2*, *Mixl1*, *Pdx1*, *Isl-1*, *Ngn3*, *insulina*, *amilina*, *somatostatina* e *Glut2*, aumenta o número de células nestina⁺ e diminui a expressão de *Oct-4* (BLYSZCZUK et al., 2003; LIN et al., 2007; LIEW et al., 2008).

Diferentes métodos já comprovaram que as células-tronco são capazes de se diferenciar em células produtoras de insulina, porém, mesmo o melhor dos protocolos *in vitro* produz apenas células semelhantes a células β imaturas. Células β maduras, que respondam corretamente a glicose, ainda não foram geradas (PURI e HEBROK, 2010). Isto posto, é de grande importância a busca por melhores protocolos, que sejam capazes de produzir células que respondam corretamente a glicose, produzindo insulina em quantidade

suficiente para regular a glicemia sanguínea quando implantadas em pessoas que sofrem com o Diabetes.

Os diversos protocolos já testados apresentam uma eficiência muito variada. O cultivo das células-tronco em meios específicos, que favorecem a seleção e a diferenciação das células produtoras de insulina, apresenta um rendimento de 10% a 20% (LUMELSKY et al., 2001; BLYSZCZUK et al., 2003; SEGEV et al., 2004; LIN et al., 2007). A transfecção de genes responsáveis pela diferenciação de células β , como o *Pdx1* ou o *Pax4* em células-tronco, pode aumentar em 80% a eficiência de diferenciação e, também elevar consideravelmente a secreção de insulina em resposta a glicose (BLYSZCZUK et al., 2003).

Entretanto, apesar dos resultados animadores, a transfecção de genes nas células-tronco implica em alterações do genoma, as quais podem levar a diversas conseqüências, sendo muitas delas indesejadas, como por exemplo, a formação de tumores, por eventual inserção de vetores contendo promotores fortes, na vizinhança de genes reguladores da proliferação celular. O uso de células modificadas geneticamente em protocolos de terapia celular ainda encontra diversas restrições. Portanto, além de aperfeiçoar os protocolos de diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina, é de grande interesse a busca por um método, que permita obter um grande número de células diferenciadas, sem que estas tenham seu genoma alterado, tornando estas células mais aptas para serem utilizadas em diversos protocolos de terapia celular.

1.5 VP22: uma proteína com domínio de transdução

A utilização de proteínas, que contém um domínio de transdução de proteínas, (PTD) constitui-se numa alternativa promissora para solucionar o problema gerado pelo uso da transfecção, pois as proteínas que apresentam uma PTD são capazes de transduzir diversos tipos celulares, possibilitando a incorporação direta da proteína pela célula, sem a necessidade de transfectar um gene para que este expresse a proteína de interesse no interior da célula. O sistema de transdução de proteínas pode ampliar as possibilidades terapêuticas, pois apresenta uma baixa toxicidade e um alto rendimento (NOGUCHI e MATSUMOTO, 2006).

As PTDs são pequenas sequências peptídicas, ricas em resíduos de arginina ou lisina, que permitem a translocação de proteínas através de membranas celulares e sua internalização em outras células (JOLIOT et al., 2004). Seus aminoácidos básicos parecem ser importantes para o contato com os lipídios carregados negativamente encontrados na membrana plasmática das células, sendo o primeiro passo para que a proteína entre na célula (ELLIOTT e O'HARE, 1997; SCHWARZE et al., 2000).

A fusão destas proteínas a fatores de transcrição permitiria sua internalização na célula de interesse onde poderia auxiliar na diferenciação celular. Sua atividade seria limitada pela meia-vida da proteína em questão, porém este estímulo poderia ser suficiente para iniciar a diferenciação de células-tronco em linhagens definidas (HENG et al., 2005), sem que estas tenham sofrido alterações no seu genoma.

Os mecanismos que permitem a transdução destas proteínas ainda não estão bem estabelecidos, porém é consenso que sua carga positiva, conferida pelos resíduos de aminoácidos básicos presentes na PTD, é responsável por sua adesão à superfície celular

através de uma interação eletrostática com as moléculas negativas, como a heparana sulfato, que estão presentes na membrana plasmática (NISHI et al., 2007).

Exatamente como a proteína é internalizada pelas células ainda não se sabe ao certo. Alguns estudos sugerem simples endocitose (LUNDBERG et al., 2003), enquanto outros propõem uma endocitose que ocorreria na ausência dos receptores de clatrina (NISHI et al., 2007). Há, ainda, trabalhos que afirmam que as proteínas atravessam a membrana e são translocadas para o núcleo através de uma conexão com o citoesqueleto de actina (ELLIOTT e O'HARE, 1997). Foi proposto também que as proteínas sofreriam uma desnaturação para então atravessar a membrana e no interior da célula sofreriam um processo de renaturação (ELLIOTT et al., 1996).

Além de serem produzidas sinteticamente, as PTDs são encontradas em algumas proteínas como a TAT do vírus HIV-1, o fator de transcrição de *Drosophila* Antennapedia e a VP22 do vírus HSV-1 (SCHWARZE et al., 2000).

Diversos estudos já comprovaram que é possível a internalização de proteínas específicas em células-alvo, através de seu transporte por proteínas contendo domínio de transdução (PTDs). Além de serem internalizadas, estas proteínas também foram capazes de gerar as respostas biológicas esperadas. Assim, em fusão com a TAT, a proteína P27 induziu a migração de células de mamífero (NAGAHARA et al., 1998). Já a proteína CRE recombinase foi internalizada por células fibroblásticas (PEITZ et al., 2002). Diferentes proteínas fusionadas a TAT foram interiorizadas por células β , propiciando a estas uma maior resistência à apoptose (EMBURY et al., 2001; RIBEIRO et al., 2003). Sua ação também pode ser observada *in vivo*; após uma injeção intraperitoneal de β -galactosidase fusionada a TAT, verificando-se a atividade da β -galactosidase em todos os tecidos do camundongo, inclusive no cérebro (SCHWARZE et al., 1999).

Mesmo siRNAs, que por seu tamanho e carga negativa encontram muita dificuldade para atravessar a membrana plasmática, já foram internalizados por diferentes tipos de células, incluindo células T, células da veia do cordão umbilical e células-tronco embrionárias humanas, com o auxílio da TAT em fusão com um domínio de ligação a RNA dupla fita (EGUCHI et al., 2009).

Trabalhos utilizando a VP22 como ferramenta para internalizar proteínas, também foram capazes de obter as respostas biológicas esperadas. As proteínas de interesse foram fusionadas a VP22, possibilitando a internalização destas pelas células em questão. Assim, células musculares diferenciadas foram induzidas a entrar novamente no ciclo celular através da ação do “large T” do SV40 (DERER et al., 1999 e 2002). Já a proteína p53 induziu a apoptose de células humanas cancerígenas (PHELAN et al., 1998) e a internalização de timidina quinase em células tumorigênicas causou a regressão do tumor em ratos (DILBER et al., 1999). Evidências apontam que a VP22 também poderia ser usada para melhorar a potencialidade de vacinas, por aumentar a distribuição de antígenos (YANG et al., 2010).

Produto do gene *UL49* do Herpes Simplex Virus I, a VP22, uma proteína que apresenta um peso molecular de 38kDa, contém uma PTD rica em resíduos de arginina na sua região carboxi-terminal (ELLIOTT e O’HARE, 1997). Seu nome, Virion Polypeptide 22, se deve ao fato de ser a 22ª maior proteína encontrada nos extratos proteicos do vírion quando estes eram analisados em géis de eletroforese. Contribuindo com 5 a 9% da massa total do vírus, a VP22 é a proteína mais abundante do tegumento, uma camada amorfa situada entre o envelope e o capsídeo icosaédrico do vírus. Aproximadamente 2000 cópias da VP22 podem ser encontradas por partícula viral (HEINE et al., 1974).

Em extratos de células infectadas com HSV-I fracionados por eletroforese em géis de poliacrilamida podem ser encontradas até três bandas, que corresponderiam à forma não fosforilada e a duas formas fosforiladas distintas da VP22. O número de fosforilações presentes parece estar relacionado com a regulação das diferentes funções desta proteína. Esta fosforilação facilitaria a dissociação desta proteína do tegumento, sendo que a forma incorporada ao vírion é a não-fosforilada. Sua fosforilação parece regular também sua localização dentro da célula, já que a forma hipofosforilada se localiza no citoplasma durante a infecção, enquanto que a hiperfosforilada se encontra predominantemente no núcleo (INGVARSDOTTIR e BLAHO, 2010).

A VP22 é empacotada no vírion durante o envelopamento final, porém seu papel durante a infecção viral ainda não é totalmente compreendido (O'REGAN et al., 2007). Acredita-se que a VP22 possa ser membro de uma nova classe de proteínas virais cuja função principal seria a de se ligar e transportar os mRNAs das células infectadas para as não infectadas, criando um ambiente propício para o início de uma nova infecção (SCIORTINO et al., 2002).

Estudos com vírus mutantes *U_L49⁻* concluíram que na ausência da VP22, a produção e a exportação de vírus infecciosos para o meio extracelular fica reduzida (DUFFY et al., 2006). Estudos posteriores concluíram que a VP22 também seria necessária para uma síntese proteica ideal durante a fase tardia de infecção e para o acúmulo dos mRNAs de certos genes durante a fase inicial de infecção. Estes dados indicam que a VP22 tenha um papel importante na exportação e tradução dos mRNAs (DUFFY et al., 2009).

A proteína VP22 exibe uma propriedade não usual de transporte intercelular. Depois de sintetizada por uma subpopulação de células, onde é amplamente citoplasmática, a proteína é transportada para células adjacentes onde é acumulada principalmente no

núcleo (ELLIOTT et al., 1999). Quando expressa nas células em culturas, a VP22 é exportada para o meio e se insere nas células vizinhas. Por sua capacidade de transportar proteínas de uma célula para outra, ela tornou-se muito útil nos estudos de processos celulares e moleculares (BENNET et al., 2002).

Além da sua capacidade de transporte intercelular, a VP22 também apresenta outras propriedades importantes, como a capacidade de se ligar e reorganizar os microtúbulos em células infectadas e não-infectadas, associar-se à cromatina e a membrana nuclear e translocar-se para o núcleo durante a mitose (BREWIS et al., 2000; ELLIOTT e O'HARE, 2000; MARTIN et al., 2002; LEMKEN et al., 2007).

De fato, sendo a VP22 transfectada ou sintetizada pelas células infectadas, é citoplasmática durante a interfase do ciclo celular, enquanto que, durante a divisão celular a proteína se torna nuclear. Sua localização nuclear é primariamente observada durante as fases iniciais da mitose. Acredita-se que a VP22 se ligue fortemente à cromatina condensada e permaneça assim durante todos os estágios da mitose (INGVARSDOTTIR e BLAHO, 2010).

Enquanto diversos autores afirmam ter comprovado que a VP22 realmente cumpre o papel de carregar proteínas para dentro das células, através de testes utilizando a VP22 fusionada a proteína fluorescente eGFP (ELLIOTT e O'HARE, 1999; BREWIS et al., 2000; BAMDAD e BELL, 2007; LEMKEN et al., 2007; NISHI et al., 2007; SUGITA et al., 2008), alguns autores ainda alegam que a VP22 não é realmente capaz de transduzir células e atribuem alguns dos resultados obtidos a artefatos de fixação (FANG et al., 1998; LUNDBERG et al., 2003; ROY et al., 2005).

Além disso, apesar dos diversos estudos feitos com a VP22, nenhum deles procurou verificar se a VP22 pode ser utilizada como ferramenta para internalização de proteínas em células-tronco.

Portanto, pela necessidade de se obter melhores protocolos para diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina, sem que estes alterem o genoma das células em questão, é de extrema importância analisar se a capacidade de transdução da VP22 também se aplica a células-tronco, comprovando assim, que a VP22 poderia ser usada como uma ferramenta para internalização de proteínas específicas em células-tronco, contribuindo, assim, para sua diferenciação.

Esta é uma proposta bastante promissora, pois idealmente, dependendo da proteína e do protocolo utilizado, a internalização de proteínas específicas em células-tronco, através de sua fusão com a VP22, poderia auxiliar a diferenciação destas células em diversos tipos celulares, sem que o genoma destas fosse modificado. Isto restringiria as possibilidades destas células se tornarem tumorigênicas, tornando-as mais aptas para serem utilizadas em terapias celulares, que poderiam ajudar no tratamento de diversas doenças.

2. OBJETIVOS

A proposta deste trabalho foi:

- verificar se a VP22 pode ser utilizada como ferramenta para internalizar proteínas em células-tronco;
- construir a proteína de fusão VP22.Pax4, para permitir que o Pax4 seja internalizado por células-tronco;
- analisar se o Pax4 poderia melhorar a diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina, acrescentando a proteína de fusão VP22.Pax4 durante protocolos de diferenciação *in vitro*.

3. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 Modelos celulares

As células utilizadas neste trabalho foram: a) as células-tronco embrionárias de camundongo (mESC), USP4, obtidas a partir da camada interna do blastocisto que foram gentilmente cedidas pela Prof^a. Dr^a. Lygia da Veiga Pereira do Instituto de Biociências da USP b) as células-tronco adultas de polpa dentaria (hDPSC) isoladas em nosso laboratório pela doutoranda Patrícia Mayumi Kossugue; c) as linhagens celulares 293T (células de rim humano transformadas com o *large T* do SV40) e CHO (células do ovário de hamster chinês).

3.2 Condições de cultura e manutenção das linhagens celulares

As células foram cultivadas a 37°C em frascos plásticos descartáveis contendo meio de crescimento normal específico para cada uma das linhagens utilizadas, em atmosfera de 2,5%CO²/97,5%AR para a manutenção do pH próximo ao fisiológico. As células eram subcultivadas sempre que atingiam aproximadamente 80% da densidade de saturação, utilizando, para tanto, tripsina 0,1% em PBSA contendo 1mM EDTA e tendo sido a cultura previamente lavada, uma vez, com solução de PBSA. Os estoques celulares são mantidos no meio de cultivo contendo 10% DMSO (dimetilsulfóxido) à -190°C, em reservatório contendo nitrogênio líquido.

3.3 Extração e Purificação de RNA

Para a extração e purificação do RNA, foi utilizado o kit *Illustra RNA Spin* (GE Healthcare). As células foram lavadas 2 vezes com PBSA e posteriormente 600µl de solução de lise, contendo β-Mercaptoetanol foi adicionado. O lisado então pode ser congelado ou submetido ao restante do protocolo de purificação, seguindo as instruções do fabricante.

3.4 Construção de bibliotecas de cDNA

As bibliotecas foram construídas utilizando-se a enzima Super Script III (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante, a partir de RNA extraído das células de interesse. A qualidade do cDNA era confirmada através da análise da expressão de genes *housekeeping* como o *GAPDH*, *Actina* ou *HPRT*

3.5 Primers utilizados

A sequência dos genes de interesse foram obtidas no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). Os *primers* para clonagem direcional do cDNA correspondente ao gene *Pax4* foram desenhados através da análise da sequência do gene no BLAT. Estes foram desenhados de forma a conter o sítio de restrição para as enzima EcoRI na porção 5' e NotI na porção 3'. Os *primers* utilizados para análises por q-RT-PCR foram desenhados com a ajuda do programa *Primer Express*, na junção exon-exon.

RNPAX4VPF- GCGCGAATTCGCAGCAGGACGGTCTCAGCAGTGTGAATCAGC
RNPAX4VPR- GATTGCGGCCGCGTGGCCAGTGTAAGTAATAGGTTGATGGCG

mARXrtF- TGAGGCTCAAGGCTAAGGAG
mARXrtR- AGTGGTGCTGAGTGAGGTGA

BAXrtF - CAAGAAGCTGAGCGAGTGTC
BAXrtR – GAAGTTGCCGTCTGCAAACA

BCL-XLrtF - CAGACCCAGTGAGTGAGCAG
BCL-XLrtR - CCGGTTGCTCTGAGACATT

mGLUT2rtF - AGATCGCTCCAACCACACTCA
mGLUT2rtR - GGCCAGCAATCTGACTAATAAGAAT

mINS1rtF - TAAAGCTGGTGGGCATCCA
mINS1rtR - GCACCAACAGGGCCATGT

mINS2rtF - AGGACCCACAAGTGGCACAA
mINS2rtR - GATCTACAATGCCACGCTTCTG

mISLrtF - AACCCAACGACAAAATAATATCCA
mISLrtR – TAGCCTGTAAACCACCATCATG TCT

NESrtF – AGCAACTGGCACACCTCAAGAT
NESrtR – CAGGTGTCTGCAACCGAGAGTT

mNGN3rtF- GCACTCAGCAAAAAGCGAAGA
mNGN3rtR- GCCGAGTTGAGGTTGTGCAT

mPDX1rtF - CTA CTGCCTTCGGGCCTTA
mPDXrtR - GCTCCCACGTCCACACTC

3.6 Construção dos plasmídeos

O vetor mais utilizado neste trabalho foi o pVP22 (Invitrogen). Os cDNAs correspondentes aos genes *Pax4* e *eGFP* foram clonados neste vetor. No caso do *Pax4*, tanto o cDNA quanto o pVP22 foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI e NotI separadamente, o eGFP foi subclonado a partir do pLPCX.eGFP (gentilmente cedido pelo Dr. Marcos Demasi) que foi clivado com HindIII assim como o pVP22. Após à digestão à 37°C *overnight*, vetor e inserto foram purificados utilizando-se o kit DNA and GFX Gel Band Purification (Amersham), seguindo orientações do fabricante. Por fim, o Pax4 e o eGFP foram ligados aos respectivos vetores pVP22 pela ação da enzima T4 DNA ligase. O cDNA correspondente ao gene *Pax4* também foi clonado no vetor pFLAG da mesma maneira utilizada para clonar no pVP22.

3.7 Transformação de bactérias *DH10B*

Os plasmídeos de interesse foram adicionados a uma suspensão de bactérias DH10B eletrocompetentes e estas foram submetidas a um pulso elétrico dentro de uma cubeta de eletroporação no eletroporador (EC-100, EC Apparatus Corporation). Imediatamente após o choque, 1ml de meio SuperBroth foi adicionado à suspensão bacteriana e esta foi incubada a 37°C sob agitação por uma hora. Após este período, as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio LB-Agar contendo antibiótico ampicilina e incubadas a 37°C *overnight* para obtenção de colônias resistentes ao antibiótico.

3.8 Transfecção transitória e estável

As linhagens celulares foram plaqueadas de forma a atingir 80-90% de confluência no momento da transfecção, utilizando o kit LipofectAMINE 2000 (Invitrogen), segundo procedimentos recomendados pelo fabricante; os plasmídeos pVP22, pVP22.Pax4, pVP22.eGFP foram transfectados em células CHO para seleção de clones estáveis e em células 293T para análise da presença da proteína e para obtenção de extratos protéicos para experimentos com microscopia confocal. Para obtenção dos transfectantes estáveis de células CHO, estas células foram cultivadas em meio seletivo contendo Geneticina (G418) após 48h da transfecção. As colônias obtidas foram separadas por tripsinização em anéis de clonagem. Como controles da seleção pelo antibiótico foram utilizadas placas contendo células CHO não transfectadas, cultivadas em meio com a mesma concentração de antibiótico.

3.9 Ensaios de Western blot

As culturas foram coletadas em PBSA gelado com auxílio de um raspador “policial” e lisadas com tampão de lise RIPA+. Alíquotas de extrato protéico foram submetidas ao fracionamento em gel 10% poliacrilamida–SDS. Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences). A membrana foi então incubada com uma solução TBST + 5% leite em pó *overnight* a 4°C, em seguida foi incubada em solução de anticorpo anti-VP22 (gentilmente cedido pelo Dr. Stuart Perkins) por uma hora, lavada 3x com solução TBST e incubada em solução com anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase. Para a revelação utilizamos o Kit ECL plus (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante.

3.10 Tratamento das células-tronco hDPSC e mESC com VP22.eGFP

As células ($\sim 2 \times 10^5$) eram plaqueadas em uma placa de 60mm, contendo 2 lamínulas 24h antes do teste. O extrato proteico de $\sim 6 \cdot 10^6$ células 293T era obtido 48h após a transfecção destas com pVP22.eGFP ou pLPCX.eGFP. Para tal utilizamos 300µl do *High Salt buffer*, de acordo com o protocolo da Invitrogen. Cada lamínula, contendo as células-tronco, era colocada em uma câmara de perfusão aberta e tratada com uma mistura de 150µl do extrato protéico e 150µl de Krebs sem NaCl e 11.2mM de glicose por 30min. A lamínula era então lavada com Krebs e incubada com DAPI (Sigma, USA) 1:10 em Krebs por 10min. Ao final ela era lavada novamente e mantida em Krebs 24mM de glicose para análise no microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss Inc, Thornwood, NY, USA).

3.11 Análise por microscopia confocal

As células foram analisadas em uma câmara de perfusão aberta sob o microscópio confocal de varredura a laser (Carl Zeiss Inc, Thornwood, NY, USA). Utilizamos dois lasers diferentes para as análises, comprimento de onda de excitação em 488nm para o eGFP e 350nm para o DAPI (Sigma, USA). As células foram visualizadas com uma objetiva de 63x de imersão a óleo, as imagens de cortes ópticos das células foram obtidas no eixo Z por toda a célula. As imagens foram analisadas pelo software do fabricante do microscópio.

3.12 Diferenciação de mESC em células produtoras de insulina

O protocolo utilizado para a diferenciação das células-tronco embrionárias em células secretoras de insulina foi proposto pela doutoranda Patrícia M. Kossugue e está esquematizado resumidamente abaixo:

Estágio 1: Expansão das células mESC sobre placas com *feeder layer* e na presença de LIF (2-3 dias).

Estágio 2: Geração de Corpos Embrióides (EBs) em suspensão, em meio de células mESC e na ausência de LIF (4 dias).

Estágio 3: Adesão dos corpos Embrióides, em meio contendo soro fetal bovino e ácido retinoico (1 dias)

Estágio 4: Cultura em meio contendo Activina A e FGF2 (2 dias)

Estágio 5: Cultura em meio contendo Activina A, FGF2, N2, B27 (3 dias)

Estágio 6: Cultura em meio contendo N2, B27, FGF2 (3 dias)

Estágio 7: Cultura em meio contendo N2, B27, Nicotinamida (7 dias)

Estágio 8: Cultura em meio contendo Exendina (7 dias)

A co-cultura com células CHO expressando VP22.Pax4 ou VP22 era feita durante os estágios 4 a 6. As células CHO ($\sim 5 \cdot 10^5$) eram plaqueadas em um “Millicell” (cell culture insert with hanging geometry- Millipore) e transferidas para a placa contendo as células em diferenciação no dia seguinte. O “Millicell” foi trocado uma vez durante o experimento, após 3 dias de uso.

3. 13 Análise da diferenciação das células-tronco murinas

Ao final do protocolo de diferenciação, as células foram coradas com ditizona e *Newport Green* para análise do conteúdo de insulina. Posteriormente o RNA destas células foi extraído e seu cDNA obtido; a expressão de diferentes genes relacionados a linhagem pancreática foi analisada através de q-RT-PCR.

4. RESULTADOS

4.1 Amplificação do cDNA correspondente ao gene *Pax4* através de RT-PCR.

Com o intuito de amplificar o cDNA correspondente ao *Pax4*, extraímos o RNA e construímos as bibliotecas de cDNA correspondentes a ilhotas murinas e as linhagens celulares INS-1E e RINm5f de insulinoma murino. A amplificação do *Pax4* foi obtida com sucesso somente a partir do cDNA das células INS-1E (fig 1) e RINm5F (fig 2). Na amplificação a partir de biblioteca de cDNA de células INS-1E detectou-se apenas uma isoforma do transcrito (Fig 1), enquanto que a amplificação a partir de células RINm5F, apresentou 3 isoformas (fig 2).

Fig 1: Amplificação do cDNA correspondente ao gene *Pax4* de aproximadamente 1 Kpb, a partir da biblioteca de cDNA de INS-1E, sendo possível observar a presença de uma única banda.

Fig 2: Amplificação do cDNA correspondente ao gene *Pax4* a partir de células RINm5f. Observa-se a presença de três isoformas do transcrito.

4.2 Obtenção das novas construções plasmídeais pVP22.Pax4 e pFlag.Pax4

Para a construção deste novo vetor pVP22.Pax4, utilizamos o cDNA correspondente às três isoformas do Pax4 obtidas a partir das células RINm5f.

Inserto e plasmídeo foram digeridos com as enzimas EcoRI e NotI; feita sua ligação, o produto desta ligação foi utilizado para transformar bactérias DH10B. Entre as colônias bacterianas resistentes à ampicilina, foram selecionados alguns clones, dos quais se extraíram os plasmídeos. Para confirmar a presença da construção de interesse, os plasmídeos extraídos foram clivados com enzimas específicas.

Os plasmídeos extraídos dos clones bacterianos denominados A1, que haviam sido transformados com a construção pVP22.Pax4, foram clivados com as enzimas EcoRV (para a qual esta construção não apresenta sítios de clivagem), HindIII (que cliva apenas o pVP22), NheI (que cliva o *Pax4*) e KpnI (que cliva pVP22 e *Pax4*) (Fig 3 e 5). Já os plasmídeos extraídos do clone bacteriano denominado 3, transformados com pFLAG.Pax4, foram clivados com as enzimas HindIII (para a qual esta construção não apresenta sítios de clivagem), NheI (que cliva o *Pax4*) e EcoRV (que cliva pFLAG) (Fig 4 e 5). Com o intuito

de ter exemplares das três isoformas de *Pax4* clonadas no pVP22 selecionamos mais alguns clones, denominados E2, E3 que apresentavam a isoforma pequena e G3, G5 e G6 que apresentavam a isoforma grande (Fig 6), já que o clone A1 apresenta a isoforma mediana. Verificamos que as construções foram clonadas satisfatoriamente.

Fig 3: Representação esquemática do vetor pVP22. Os sítios utilizados para diagnóstico de restrição estão representados pelas setas azuis. As caixas roxas indicam os sítios usados para clonagem do *Pax4*.

Fig 4: Representação esquemática do vetor pFLAG. Os sítios utilizados para diagnóstico de restrição estão representados pelas setas azuis. As caixas roxas indicam os sítios usados para clonagem do *Pax4*.

Fig 5: Eletroforese em gel de agarose do produto da clivagem dos plasmídeos extraídos dos clones selecionados A1 (pVP22.Pax4) e 3 (pFlag-Pax4) para confirmar a presença do *Pax4* nos respectivos vetores.

O padrão observado corresponde ao esperado.

Fig 6: Eletroforese em gel de agarose do produto da clivagem dos plasmídeos extraídos dos clones selecionados E2, E3, G1, G3, G5, G6, que haviam sido transformados com o vetor pVP22.Pax4 para confirmar a presença do inserto. O padrão observado demonstra que os clones E2 e E3 apresentam a isoforma maior de Pax4 e G3, G5, G6 a isoforma menor. O clone G1 foi descartado.

4.3 Confirmação da expressão de VP22.Pax4

Selecionamos o clone A1 para dar continuidade ao trabalho. Após verificar, por sequenciamento de DNA, que o plasmídeo não continha mutação, células 293T foram transfectadas transitoriamente para confirmar que a proteína de interesse seria expressa corretamente. Após 48h analisamos a expressão do mRNA correspondente ao *Pax4* (Fig 7) e à proteína de fusão VP22.Pax4 (Fig 8).

Fig 7: Eletroforese em gel de agarose do produto da amplificação do gene *Pax4* por RT-PCR a partir de cDNA obtido de células 293T transfectadas transitoriamente com a construção pVP22.Pax4.

Fig 8: Os extratos proteicos das células 293T transfectadas com o vetor pLPCX.eGFP (1), pVP22 (2), pVP22.Pax4 (3), foram submetidos à uma análise por *Western blot* utilizando-se o anticorpo anti-VP22 para detecção da expressão da proteína de fusão VP22.Pax4. As células transfectadas com pLPCX.eGFP serviram como controle negativo e as células transfectadas com pVP22 serviram como controle positivo do anticorpo.

4.4 Obtenção e seleção de clones celulares que expressam VP22.Pax4

Após a transfecção das células CHO com a construção plamideal pVP22.Pax4, o tratamento destas com o antibiótico Geneticina e o seu plaqueamento em baixa densidade, observamos o crescimento de pequenas colônias resistentes ao antibiótico (Fig 9). Algumas destas colônias foram selecionadas e submetidas à análise da expressão do gene *Pax4* por qRT-PCR (Fig 10) e da proteína de fusão VP22.Pax4 por *Western blot* (Fig 11). O clone denominado A1 foi selecionado para ser utilizado como clone produtor da proteína de fusão VP22.Pax4, a ser utilizada em alguns experimentos, tendo sido submetido à confirmação da expressão desta proteína por *Western blot* (Fig 12).

Fig 9: Formação de colônias de células CHO resistentes à Geneticina após o plaqueamento em baixa densidade das CHO transfectadas com pVP22.Pax4.

Fig 10: Análise da expressão do mRNA correspondente ao gene *Pax4* nos diferentes clones de células CHO denominados A1, A1.2, A1.3, D1, D1.1, D1.4 transfectados com pVP22.Pax4 através de q-RT-PCR.

Fig 11: Os extratos proteicos dos clones selecionados de células CHO transfectadas com o vetor pVP22.Pax4, foram submetidos a uma análise por *Western blot* utilizando-se o anticorpo anti-VP22 para detecção da expressão da proteína de fusão VP22.Pax4. As células transfectadas com pVP22 (+) serviram como controle positivo do anticorpo.

Fig 12: Os extratos proteicos de células CHO não transfectadas (1), transfectadas com o vetor pVP22 (2) e o clone A1 (3), foram submetidos a uma análise por *Western blot* utilizando-se o anticorpo anti-VP22 para detecção da expressão da proteína de fusão VP22.Pax4. As células CHO não transfectadas serviram como controle negativo e as células transfectadas com pVP22 serviram como controle positivo do anticorpo.

4.5 Obtenção da nova construção plasmideal pVP22.eGFP

O cDNA correspondente ao gene *eGFP* foi subclonado no vetor pVP22 a partir do vetor pLPCX.eGFP (Fig 13). Após a clivagem de ambos com a enzima HindIII, o inserto contendo *eGFP* e o vetor pVP22 foram ligados. O produto da ligação pVP22.eGFP (Fig 14) foi usado para transformar bactérias. Após a seleção com o antibiótico ampicilina, alguns clones foram escolhidos para extração e digestão plasmideal com as enzimas de restrição EcoRI (reconhece um sítio no N terminal do *eGFP* e um no sítio de múltipla clonagem do pVP22) e HindIII para confirmação da presença e da correta orientação do inserto correspondente ao *eGFP* no vetor pVP22.

De todos os clones selecionados, somente os clones G, M, O e R continham a construção pVP22.eGFP com o padrão esperado (Fig 15). Para confirmar que a proteína VP22.eGFP seria expressa corretamente, os plasmídeos extraídos dos clones selecionados foram transfectados transitoriamente em células 293T. Após 48h, as células foram

analisadas sob microscopia de fluorescência (Fig 16) e seu extrato proteico foi obtido e analisado através de *Western blot* (Fig 17). Clones estáveis de células CHO também foram obtidos (Fig 18).

Fig 13: Representação esquemática do vetor pLPCX.eGFP.

Fig 14: Representação esquemática do vetor pVP22.Pax4.

Fig 15: Eletroforese em gel de agarose do produto da clivagem dos plasmídeos extraídos de diversos clones bacterianos transformados com pVP22.eGFP. A clivagem foi feita com as enzimas de restrição HindIII (A) e EcoRI (B). Os clones G, M, O e R apresentaram o padrão esperado, os demais foram descartados

Fig 16: Para verificar se a construção pVP22.eGFP estaria expressando corretamente o eGFP transfectamos células 293T transitoriamente com tal plasmídeo. Estas células foram incubadas com DAPI e analisadas sob microscópio de fluorescência com objetiva de 63x (A), células 293T não transfectadas foram submetidas ao mesmo procedimento para servirem de controle quanto a autofluorescência destas células (B).

Fig 17: Os extratos proteicos de células 293T transfectadas com pLPCX.eGFP (1) ou com o vetor pVP22.eGFP (2) foram submetidos a uma análise por *Western blot* utilizando-se o anticorpo anti-VP22 para detecção da expressão da proteína de fusão VP22.eGFP. As células transfectadas com pLPCX.eGFP serviram como controle negativo do anticorpo.

Fig 18: Clones de células CHO que expressavam VP22.eGFP foram selecionados. Para verificar a expressão do eGFP nestas células, estas foram incubadas com DAPI e analisadas sob microscópio de fluorescência com objetiva de 63x (A). Células CHO não transfectadas foram submetidas ao mesmo procedimento para servirem de controle quanto à autofluorescência destas células (B).

4.6 Internalização da VP22 em células-tronco

Para provar que a VP22 seria capaz de transduzir células-tronco, incubamos células-tronco com extratos contendo VP22.eGFP ou eGFP por 30min e, posteriormente, com DAPI por 10min. A observação das células sob microscopia confocal e permitiu confirmar que a VP22 é capaz de internalizar a proteína eGFP à ela fusionada tanto nas células hDPSCs (Fig 19) como nas mESCs (Fig 20), uma vez que se observa fluorescência no interior destas células somente quando foram tratadas com VP22.eGFP e não quando tratadas com eGFP apenas.

Fig 19: Células hDPSC analisadas sob microscopia confocal com objetiva de 63x. Cortes ópticos de $\sim 0,5 \mu\text{m}$ foram obtidos a partir das hDPSC tratadas com extrato contendo VP22.eGFP (A) ou com extrato celular contendo eGFP (B), utilizadas como controle negativo.

Fig 20: Células mESC analisadas sob microscopia confocal com objetiva de 63x (A). Cortes ópticos de ~0,5µm foram obtidos a partir das mESC tratadas com extratos contendo VP22.eGFP (B) ou eGFP (C) utilizadas como controle negativo. As setas azuis indicam a fluorescência observada no interior das células tratadas com VP22.eGFP.

4.7 Formação de clusters e produção de insulina nas células diferenciadas

A presença de insulina nas células diferenciadas foi analisada primeiramente através da coloração com ditizona e *Newport Green* (Fig 21). Ao analisar os *clusters* de células coradas com ditizona ao final do protocolo de diferenciação, observamos um número maior de agregados/*clusters* produtores de insulina quando se adicionou ao protocolo original células CHO, que produziam a proteína de fusão VP22.Pax4, em co-cultura. Valores menores foram obtidos quando se utilizou o protocolo original ou a adição de células que produziam apenas a VP22 (Fig 22).

Fig 21: Formação de agregados/*clusters* de células produtoras de insulina ao final do protocolo de diferenciação. As células foram coradas com ditizona para analisar se os *clusters* formados estariam produzindo insulina (A). Prot. original corresponde ao protocolo sem adição de co-cultura, VP22 corresponde ao protocolo com adição da co-cultura com as células produtoras de VP22 e VP22.Pax4 corresponde ao protocolo com adição da co-cultura com células produtoras de VP22.Pax4. Os *clusters* também foram submetidos à coloração com *Newport Green* (B) para confirmar a produção de insulina.

Fig 22: Número de agregados/*clusters* formados ao final do protocolo de diferenciação de células mESC em células produtoras de insulina. O número de clusters para VP22 e VP22.Pax4 (experimento), foi normalizado pelo número de clusters obtidos no protocolo original (controle). Foram analisados dois experimentos independentes, sendo um deles em duplicata. Prot. original corresponde ao protocolo sem adição de co-cultura, em VP22 houve a adição da co-cultura com células CHO expressando VP22, em VP22.Pax4 adicionamos a co-cultura com células CHO expressando VP22.Pax4.

4.8 Expressão gênica das células diferenciadas

A expressão relativa dos genes *Arx*, *Ins1*, *Ins2*, *Isl1*, *Glut2*, *Ngn3*, *Nes* e *Pdx1*, relacionados com a embriogênese pancreática e especificamente com diferenciação de células β e dos genes *Bcl-xl* e *Bax* relacionados com a apoptose foram analisadas ao nível de mRNA através de qRT-PCR (Fig 23). A expressão do gene *Ins1* só foi detectada nas células MIN6 e nas células submetidas a diferenciação espontânea, o *Glut2* foi detectado nas células submetidas ao protocolo original e a adição de VP22.Pax4 em apenas uma das três amostras analisadas, sendo sua expressão foi detectada também nas células MIN6 e nas células submetidas à diferenciação espontânea.

Fig 23: Comparação dos níveis de expressão dos mRNAs correspondentes aos genes *Arx*, *Ins2*, *Isl1*, *Pdx1*, *Ngn3*, *Nes*, *Bcl-xl* e *Bax* entre diferentes protocolos de diferenciação, células embrionárias não diferenciadas (Indiferenciada) e células MIN-6 de insulinoma murino, através de q-RT-PCR. Os protocolos aqui comparados foram o protocolo original descrito em procedimentos experimentais (Prot. original), o mesmo com a co-cultura de células produtoras de VP22 (VP22), com a co-cultura de células produtoras de VP22.Pax4 (VP22.Pax4), células submetidas a diferenciação espontânea em meio DMEM 10%SFB (Dif Esport.) e o protocolo descrito por Lumelsky et al 2001 (Lumelsky). Os dados de Prot. original, VP22, VP22.Pax4 e Dif Esport. foram obtidos a partir de dois experimentos independentes, sendo um deles em duplicata.

5. DISCUSSÃO

A VP22 já foi utilizada com sucesso para transduzir proteínas em diversos tipos de células (ELLIOTT e O'HARE, 1997; BREWIS et al., 2000; LEMKEN et al., 2007; SUGITA et al., 2008), porém, até o momento, nenhum trabalho havia demonstrado se a VP22 poderia ser utilizada para internalizar proteínas em células-tronco, o que a tornaria uma boa ferramenta para auxiliar na diferenciação de células-tronco sem o comprometimento de seu genoma.

Outra proteína que contém uma PTD, a TAT do vírus HIV, foi utilizada com sucesso para auxiliar a diferenciação de células-tronco neurais murinas em neurônios (SPITERE et al., 2008), corroborando a ideia de que as PTDs podem ser utilizadas como ferramenta para introduzir diferentes proteínas nas células-tronco, auxiliando assim sua diferenciação. É possível que as diferentes proteínas que contém uma PTD como a VP22, TAT ou Antenapedia, tenham diferentes mecanismos de translocação (SCHWARZE et al., 2000), por isso é importante confirmar se a VP22, assim como a TAT, pode ser utilizada como ferramenta para transduzir proteínas em células-tronco, auxiliando na diferenciação destas células no tipo celular desejado.

Embora diversos trabalhos demonstrem uma resposta biológica nas células em que a VP22 foi utilizada como ferramenta para internalizar determinadas proteínas (DERER et al., 2002; BARBÉ-TUANA et al., 2004; SAHA et al., 2006; XIONG et al., 2007), alguns trabalhos alegam que a VP22 não é capaz de transduzir membranas celulares e que alguns resultados obtidos podem ser atribuídos a artefatos de fixação ou a simples adesão desta proteína a membrana celular e sua posterior internalização por endocitose clássica, argumentando que a proteína fusionada a VP22 poderia gerar respostas apenas pela

interação com a membrana plasmática ou, a partir do compartimento endossomal, sem ser efetivamente levada para o núcleo (FANG et al., 1998; LUNDBERG e JOHANSSON, 2001; LUNDBERG et al., 2003; ROY et al., 2005).

Portanto, a fim de evitar argumentos de que nossos resultados fossem devidos a artefatos de fixação ou a simples adesão da VP22 na membrana celular, analisamos a capacidade de translocação da VP22 em células vivas e por microscopia confocal de varredura pudemos inferir que a VP22 estava de fato dentro da célula e não apenas aderida a sua membrana.

Os testes feitos em células-tronco adultas humanas (hDPSC) e em células-tronco embrionárias murinas (mESC) demonstraram, pela primeira vez, que a VP22 é capaz de transduzir células-tronco de diferentes espécies, sejam estas adultas ou embrionárias, podendo ser utilizada para auxiliar na diferenciação de diferentes tipos de células-tronco, sem que o genoma destas seja afetado, evitando, assim, as possíveis reações adversas que alterações no DNA podem causar e tornando estas células mais aptas para serem utilizadas no tratamento de diversas doenças.

Além das questões respondidas neste trabalho, criamos ferramentas que poderão responder a outras questões pertinentes a este trabalho. Uma destas ferramentas é o vetor pFLAG.Pax4, que foi elaborado para analisar a necessidade e eficiência da VP22, pois algumas proteínas como PDX1, BETA2/NeuroD e inclusive o próprio Pax4 apresentam em sua estrutura uma PTD e são capazes de transduzir células por si só (NOGUCHI et al., 2003 e 2005; LU et al., 2008). O pFLAG.Pax4, ao ser transfectado em células eucarióticas, induziria a produção da proteína Pax4, que servia como controle para verificar se, na ausência da VP22, o Pax4 poderia transduzir células-tronco e, se fosse o caso, se a adição da VP22 tornaria esta transdução mais ou menos eficiente. Clonamos também as diferentes

isoformas do *Pax4* presentes no cDNA de células RINm5f no pVP22 para analisar se a adição destas ao protocolo de diferenciação poderia gerar respostas diferentes nas células em diferenciação, dependendo da isoforma adicionada, podendo assim verificar quais partes da proteína são relevantes para a indução de uma determinada resposta biológica.

Neste trabalho, observamos, os efeitos da adição da proteína correspondente a uma das isoformas do *Pax4* sobre as mESCs durante a diferenciação em células produtoras de insulina. Utilizando a VP22 para transduzir o Pax4 nas células em diferenciação, pudemos observar, ao final do tratamento, que o número de agregados/*clusters* de células produtoras de insulina era maior e que o perfil de expressão gênica era distinto em relação ao controle contendo apenas a VP22. Esta diferença observada corrobora a ideia de que a VP22 é realmente capaz de transduzir células-tronco, podendo ser utilizada como ferramenta para auxiliar na diferenciação destas.

A hipótese inicial deste experimento era que as células submetidas à co-cultura com células CHO produtoras de VP22 e aquelas que foram submetidas ao protocolo original (sem co-cultura), gerassem células semelhantes ao final do protocolo e que as células que foram submetidas à co-cultura com as células CHO produtoras de VP22.Pax4, se diferenciasssem de forma mais eficiente. Porém, ao final do experimento, verificamos que haviam diferenças entre as células tratadas apenas com VP22 e as células do protocolo original.

Observamos, ainda, que as células submetidas à co-cultura com células CHO produtoras de VP22, apresentaram uma resposta inferior ao protocolo de diferenciação aplicado, mostrando que, provavelmente, a co-cultura com células CHO é prejudicial para as células em diferenciação. Isto pode estar ocorrendo devido ao metabolismo alto e rápida proliferação que as células CHO apresentam, o que pode levar a uma alta secreção de

metabólitos que podem ser prejudiciais as células de interesse. Além disso, as células CHO também devem estar metabolizando grande parte dos fatores adicionados no meio de cultura, fazendo com que diminua a concentração de fatores disponíveis para as células em diferenciação.

Estabeleceu-se, portanto, que a co-cultura é prejudicial para as células em diferenciação e que, de modo geral, diferenças significativas não são observadas quando se compara a expressão gênica das células submetidas à co-cultura com células CHO expressando VP22.Pax4 à aquelas submetidas ao protocolo original. Diferenças mais evidentes foram observadas quando comparamos as células tratadas com VP22.Pax4 e aquelas tratadas com VP22, daí acreditamos que a adição do Pax4 pode ser benéfica para as células durante o protocolo de diferenciação em células produtoras de insulina e que sua presença ajuda a minimizar os possíveis efeitos prejudiciais das células CHO. Acreditamos ainda, que caso se adicione a proteína de fusão VP22.Pax4 purificada ao meio de cultura, os efeitos benéficos da adição do Pax4 durante a diferenciação celular, se tornarão mais evidentes.

Uma das ações que o Pax4, adicionado durante a diferenciação parece estar exercendo é a de proteger as células da morte celular e/ou aumentar sua proliferação, pois o número de agregados/*clusters* de células produtoras de insulina observado ao final do protocolo de diferenciação neste caso é maior do que aqueles observados tanto no protocolo original quanto nas células onde foi adicionado somente VP22.

O Pax4 parece ter distintas ações, dependendo do contexto celular. Em células de insulinoma INS1E este parece ser essencial para a sobrevivência das células induzindo a expressão do gene anti-apoptótico *Bcl-xl*, mas não possui um papel relevante na proliferação celular (BRUN et al., 2007). A superexpressão do Pax4 em ilhotas murinas e

humanas induziu proliferação ativando, o *c-myc* e protegeu contra apoptose, ativando o *Bcl-xl*. Em células HEK293T e SHSY/610, a superexpressão do *PAX4* aumentou a proliferação celular (LI et al., 2006). Já a superexpressão deste gene em células de melanoma humano reduziu seu crescimento *in vitro* (HATA et al., 2008).

A análise da expressão do gene antiapoptótico *Bcl-xl* e do gene próapoptótico *Bax*, nos leva a acreditar que, pelo menos nas células utilizadas neste trabalho, o Pax4 esta possivelmente induzindo sua sobrevivência celular, pois observamos uma maior expressão de *Bcl-xl* e uma menor relação *Bax/Bcl-xl* nas células que foram tratadas com VP22.Pax4, quando comparadas àquelas tratadas com VP22 ou as submetidas ao protocolo original ou a diferenciação espontânea. Como observamos um número maior de agregados/*clusters* ao final do experimento, não descartamos a hipótese de que, além de estar protegendo as células contra a apoptose, o Pax4 esteja também induzindo a proliferação destas células.

Além disso, a análise da expressão gênica foi feita somente ao final do protocolo. Para analisar melhor os efeitos do Pax4 sobre o *Bcl-xl* e também sobre os demais genes estudados, seria importante analisar as células logo após o fim do período de tratamento com Pax4, ou seja após 10 dias do início do protocolo de diferenciação. Como o protocolo tem uma duração de 27 dias, a análise da expressão gênica ao final do protocolo nos permite avaliar se a adição do Pax4 ajuda a melhorar a diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina, porém não permite avaliar os efeitos diretos do Pax4.

Escolhemos adicionar o Pax4 somente durante o início do protocolo, pois durante a embriogênese pancreática este gene é expresso somente no início da diferenciação dos distintos tipos celulares presentes nas ilhotas, e seu possível estímulo sobre a proliferação celular poderia inibir a diferenciação destas células.

Para melhor analisar os efeitos da adição do Pax4 ao protocolo de diferenciação, escolhemos diversos genes que são expressos nas diferentes etapas da embriogênese pancreática. Os genes *Ins1*, *Ngn3*, *Nes*, *Isl1* estão presentes em precursoras pancreáticas, enquanto o *Ins2* e *Glut2* estão presentes em células β maduras. Já o gene *Pdx1* possui dois picos de expressão, sendo um no início da embriogênese e, o outro, no final. Analisando e comparando a expressão relativa dos genes escolhidos, nas células tratadas com VP22.Pax4 com aquelas tratadas somente com VP22, verificamos que o aumento do nível de expressão de alguns deles como o *Pdx1*, *Isl1*, *Ngn* e *Ins2*, condiz com os resultados obtidos em células-tronco que superexpressam o Pax4 submetidas à diferenciação em células produtoras de insulina, nas quais o Pax4 também eleva o nível de expressão destes genes (BLYSZCZUK et al., 2003). Apesar da superexpressão do Pax4 ter levado a um maior aumento na expressão destes genes, acreditamos que nossa metodologia é melhor pois as células geradas podem ter uma maior aplicabilidade, já que não sofreram alterações permanentes em seu genoma.

O aumento no nível de expressão do gene *Nes* também parece corroborar os achados no trabalho de BLYSZCZUK et al., em 2003, no qual os autores encontraram um número maior de células nestina⁺ quando o protocolo de diferenciação era realizado com as células que expressavam constitutivamente o Pax4. Uma maior expressão relativa do gene *Nes* nas células tratadas com VP22.Pax4, observada em nosso trabalho, pode refletir o aumento no número de células nestina⁺ durante a diferenciação, mostrando que este protocolo, realizado na presença do Pax4, favorece a proliferação de células precursoras pancreáticas.

Em relação ao *Arx*, esperávamos observar uma diminuição de sua expressão nas células tratadas com VP22.Pax4, já que o Pax4 já foi descrito como repressor do gene *Arx*

(COLLOMBAT et al., 2003), porém observamos que sua expressão é semelhante nos três tratamentos empregados. Esta ausência na diminuição da expressão relativa de *Arx* pode indicar que as células obtidas sejam células precursoras endócrinas, nas quais ainda há expressão de Pax4 e *Arx* simultaneamente, ou que podem haver diferentes populações de células, mostrando que este protocolo de diferenciação pode levar à diferenciação de diversos tipos de células pancreáticas endócrinas.

A detecção da expressão dos genes *Ngn3*, *Isl1*, a ausência da expressão de *Glut2* e os dados preliminares que indicam que apesar destas células estarem secretando insulina, esta secreção não ocorre em resposta a glicose, indicam que, ao final do protocolo, com ou sem a adição do Pax4, estamos obtendo apenas células endócrinas imaturas e que, para a maturação final destas, seria necessária a elaboração de um protocolo de diferenciação mais eficiente e/ou a maturação final destas células *in vivo*.

6. CONCLUSÕES

Pela análise direta da presença do eGFP fusionado a VP22 no interior de células-tronco e pela observação indireta, através das respostas biológicas, da presença do Pax4 fusionado a VP22 no interior das células-tronco em diferenciação, concluímos que a VP22 pode ser usada como ferramenta para transduzir células-tronco e, portanto, levar diferentes proteínas fusionadas a ela para o interior destas células, sendo útil em protocolos que visem à diferenciação de células-tronco sem que haja alteração do genoma.

Pela comparação dos resultados obtidos nas células tratadas com VP22.Pax4 com aqueles de células tratadas somente com VP22, concluímos que a metodologia utilizada neste trabalho (fusão da VP22 a proteína de interesse e adição desta proteína de fusão ao meio de cultura), pode ser utilizada para melhorar protocolos de diferenciação de células-tronco, sendo que a resposta obtida dependerá da proteína em questão.

A adição do Pax4 durante a diferenciação de células-tronco em células produtoras de insulina não foi capaz de melhorar a maturação final destas células, porém, por atuar na prevenção de apoptose e possivelmente na indução de proliferação celular, a adição do Pax4 pode ser utilizada para se obter um número maior de células produtoras de insulina ao final do protocolo de diferenciação *in vitro*.

A adição da proteína de interesse através da co-cultura das células-tronco com as células produtoras da proteína é útil para testar o efeito de tal proteína na diferenciação, entretanto, melhores resultados deverão ser obtidos com a proteína de fusão purificada e adicionada ao meio de cultura, pois a co-cultura pode atrapalhar a diferenciação celular.

7. REFERÊNCIAS

- Bamdad T, Bell JC. Intercellular trafficking of VP22, a herpes simplex virus type 1 tegument protein. *Iran Biomed J.* 2007 Jan;11(1):53-7.
- Barbé-Tuana FM, Machado DC, Saitovitch D. ; Modified location of the major histocompatibility protein Kb by co-delivery with VP22 protein. *Biomol Eng.* 2004 Jan;21(1):27-31
- Bennet, R. P.; Dalby, B.; Guy, P. M. Protein delivery using VP22. *Nature Biotechnol.* 20: 20. 2002.
- Berman A, Pawelec K, Fiedor P., Allogeneic transplantation of isolated islet cells in clinical practice. *Pol Arch Med Wewn.* 2009 May;119(5):326-32.
- Biason-Lauber A, Boehm B, Lang-Muritano M, Gauthier BR, Brun T, Wollheim CB, Schoenle EJ. Association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. *Diabetologia.* 2005 May;48(5):900-5.
- Blyszczuk, P. ; Czyz, J. ; Kania G. ; Wagner, M. ; Roll, U. ; St-Onge, L. ; Wobus, A. M. Expression of PAX4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin- positive progenitor and insulin-producing cells. *PNAS.* 100:998-1003. 2003.
- Brignier A.C., Gewirtz A.M., Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2010 S336-44.
- Brewis N, Phelan A, Webb J, Drew J, Elliott G, O'Hare P. ; Evaluation of VP22 spread in tissue culture. *J Virol.* 2000 Jan;74(2):1051-6.
- Brun T.; Franklin I.; St-Onge L.; Biason-Lauber A.; Schoenle E. J.; Wollheim C.B.; Benoit B. R.; The diabetes-linked transcription factor PAX4 promotes β -cell proliferation and survival in rat and human islets. *J Cell Biol.* 2004.
- Brun T, Duhamel DL, Hu He KH, Wollheim CB, Gauthier BR. The transcription factor PAX4 acts as a survival gene in INS-1E insulinoma cells. *Oncogene.* 2007 Jun 21;26(29):4261-71. Epub 2007 Jan 29.
- Cabrera O, Berman DM, Kenyon NS, Ricordi C, Berggren PO, Caicedo A., The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. Feb 14;103(7):2334-9.
- Campbell SC, Cragg H, Elrick LJ, Macfarlane WM, Shennan KI, Docherty K., Inhibitory effect of pax4 on the human insulin and islet amyloid polypeptide (IAPP) promoters. *FEBS Lett.* 1999 Dec 10;463(1-2):53-7.
- Chi N, Epstein JA. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends Genet.* 2002 Jan;18(1):41-7.
- Collaborative Islet Transplantation Registry, CITR Annual Report April, 2009. www.citregistry.org
- Collombat P, Mansouri A, Hecksher-Sorensen J, Serup P, Krull J, Gradwohl G, Gruss P. Opposing actions of Arx and Pax4 in endocrine pancreas development. *Genes Dev.* 2003 Oct 15;17(20):2591-603
- Collombat P, Hecksher-Sørensen J, Broccoli V, Krull J, Ponte I, Mundiger T, Smith J, Gruss P, Serup P, Mansouri A., The simultaneous loss of Arx and Pax4 genes promotes a somatostatin-producing cell fate specification at the expense of the alpha- and beta-cell lineages in the mouse endocrine pancreas. *Development.* 2005 Jul;132(13):2969-80.

DCCT - The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes in the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 329:977-986, 1993.

Derer W, Easwaran HP, Knopf CW, Leonhardt H, Cardoso MC. Direct protein transfer to terminally differentiated muscle cells. *J Mol Med*. 1999 Aug;77(8):609-13.

Derer W, Easwaran HP, Leonhardt H, Cardoso MC. ; A novel approach to induce cell cycle reentry in terminally differentiated muscle cells. *FASEB J*. 2002 Jan;16(1):132-3.

Dilber MS, Phelan A, Aints A, Mohamed AJ, Elliott G, Smith CI, O'Hare P. Intercellular delivery of thymidine kinase prodrug activating enzyme by the herpes simplex virus protein, VP22. *Gene Ther*. 1999 Jan;6(1):12-21

Duffy C, Lavail JH, Tauscher AN, Wills EG, Blaho JA, Baines JD. Characterization of a UL49-null mutant: VP22 of herpes simplex virus type 1 facilitates viral spread in cultured cells and the mouse cornea. *J Virol*. 2006 Sep;80(17):8664-75.

Duffy C, Mbong EF, Baines JD. VP22 of herpes simplex virus 1 promotes protein synthesis at late times in infection and accumulation of a subset of viral mRNAs at early times in infection. *J Virol*. 2009 Jan;83(2):1009-17.

Eguchi A, Meade BR, Chang YC, Fredrickson CT, Willert K, Puri N, Dowdy SF. Efficient siRNA delivery into primary cells by a peptide transduction domain-dsRNA binding domain fusion protein. *Nat Biotechnol*. 2009 Jun;27(6):567-71.

Elliott G, O'Reilly D, O'Hare P. Phosphorylation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22. *Virology*. 1996 Dec 1;226(1):140-5.

Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*. 1997 Jan 24;88(2):223-33.

Elliott G, O'Hare P. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins. *Gene Ther*. 1999 Jan;6(1):149-51

Elliott G, O'Hare P. Cytoplasm-to-nucleus translocation of a herpesvirus tegument protein during cell division. *J Virol*. 2000 Mar;74(5):2131-41.

Embury J, Klein D, Pileggi A, Ribeiro M, Jayaraman S, Molano RD, Fraker C, Kenyon N, Ricordi C, Inverardi L, Pastori RL. Proteins linked to a protein transduction domain efficiently transduce pancreatic islets. *Diabetes*. 2001 Aug;50(8):1706-13

Fang B, Xu B, Koch P, Roth JA. Intercellular trafficking of VP22-GFP fusion proteins is not observed in cultured mammalian cells. *Gene Ther*. 1998 Oct;5(10):1420-4.

Fujitani Y, Kajimoto Y, Yasuda T, Matsuoka TA, Kaneto H, Umayahara Y, Fujita N, Watada H, Miyazaki JI, Yamasaki Y, Hori M. Identification of a portable repression domain and an E1A-responsive activation domain in Pax4: a possible role of Pax4 as a transcriptional repressor in the pancreas. *Mol Cell Biol*. 1999 Dec;19(12):8281-91.

Greenwood AL, Li S, Jones K, Melton DA. Notch signaling reveals developmental plasticity of Pax4(+) pancreatic endocrine progenitors and shunts them to a duct fate. *Mech Dev*. 2007 Feb;124(2):97-107.

Gylvin T, Bergholdt R, Nerup J, Pociot F, To: Biason-Lauber A, Boehm B, Lang-Muritano M et al. (2005) association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. *Diabetologia* 48:900-905. *Diabetologia*. 2005 Oct;48(10):2183-4.

Hata S, Hamada J, Maeda K, Murai T, Tada M, Furukawa H, Tsutsumida A, Saito A, Yamamoto Y, Moriuchi T. PAX4 has the potential to function as a tumor suppressor in human melanoma. *Int J Oncol*. 2008 Nov;33(5):1065-71.

Heller RS, Jenny M, Collombat P, Mansouri A, Tomasetto C, Madsen OD, Mellitzer G, Gradwohl G, Serup P. Genetic determinants of pancreatic epsilon-cell development. *Dev Biol*. 2005 Oct 1;286(1):217-24.

Heine JW, Honess RW, Cassai E, Roizman B. Proteins specified by herpes simplex virus. XII. The virion polypeptides of type 1 strains. *Virology*. 1974 Sep;14(3):640-51.

Heng, B. C.; Cao T. Incorporating protein transduction domains (PTD) within recombinant 'fusion' transcription factors. A novel strategy for directing stem cell differentiation? *Biomed Pharmacother*. 2005 Apr;59(3):132-4

Howson JM, Walker NM, Smyth DJ, Todd JA; Analysis of 19 genes for association with type I diabetes in the Type I Diabetes Genetics Consortium families. Type I Diabetes Genetics Consortium. *Genes Immun*. 2009 Dec;10 Suppl 1:S74-84.

Holm P, Rydlander B, Luthman H, Kockum I; European Consortium for IDDM Genome Studies. Interaction and association analysis of a type 1 diabetes susceptibility locus on chromosome 5q11-q13 and the 7q32 chromosomal region in Scandinavian families. *Diabetes*. 2004

IDF- International Diabetes Federation. *Diabetes Atlas*, 2009. Disponível em: www.idf.org (acesso em 21 maio 2010)

Ingvarsdottir K, Blaho JA. Association of the herpes simplex virus major tegument structural protein VP22 with chromatin. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Mar-Apr;1799(3-4):200-6. Review.

Inoue H, Nomiya J, Nakai K, Matsutani A, Tanizawa Y, Oka Y. Isolation of full-length cDNA of mouse PAX4 gene and identification of its human homologue. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998.

Joliet A, Prochiantz A. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol*. 2004 Mar;6(3):189-96. Review

Jones PM, Courtney ML, Burns CJ, Persaud SJ. Cell-based treatments for diabetes. *Drug Discov Today*. 2008 Oct;13(19-20):888-93. Epub 2008 Aug 4. Review.

Lang D, Powell SK, Plummer RS, Young KP, Ruggeri BA. PAX genes: roles in development, pathophysiology, and cancer. *Biochem Pharmacol*. 2007. Jan 1;73(1):1-14. Review.

Larsson LI, St-Onge L, Hougaard DM, Sosa-Pineda B, Gruss P. Pax 4 and 6 regulate gastrointestinal endocrine cell development. *Mech Dev*. 1998 Dec;79(1-2):153-9.

Lemken ML, Wolf C, Wybranietz WA, Schmidt U, Smirnow I, Bühring HJ, Mack AF, Lauer UM, Bitzer M. Evidence for intercellular trafficking of VP22 in living cells. *Mol Ther*. 2007 Feb;15(2):310-9.

Li Y, Nagai H, Ohno T, Ohashi H, Murohara T, Saito H, Kinoshita T. Aberrant DNA demethylation in promoter region and aberrant expression of mRNA of PAX4 gene in hematologic malignancies. *Leuk Res*. 2006 Dec;30(12):1547-53.

Liew CG, Shah NN, Briston SJ, Shepherd RM, Khoo CP, Dunne MJ, Moore HD, Cosgrove KE, Andrews PW. ; PAX4 enhances beta-cell differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE*. 2008 Mar 12;3(3):e1783.

Lin HT, Kao CL, Lee KH, Chang YL, Chiou SH, Tsai FT, Tsai TH, Sheu DC, Ho LL, Ku HH. ; Enhancement of insulin-producing cell differentiation from embryonic stem cells using pax4-nucleofection method. *World J Gastroenterol*. 2007 Mar 21;13(11):1672-9.

Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 2001 May 18;292(5520):1389-94.

Lundberg M, Johansson M. Is VP22 nuclear homing an artifact? *Nat Biotechnol*. 2001 Aug;19(8):713-4.

Lundberg M, Wikström S, Johansson M. ; Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther*. 2003 Jul;8(1):143-50.

Marzorati, S, Pileggi, A., Ricordi C., Allogeneic islet transplantation. *Expert. Opin. Biol. Ther*. 7, 1627-1645. 2007

Maier LM, Cooper JD, Walker N, Smyth DJ, Todd JA. Comment to: Bason-Lauber A, Boehm B, Lang-Muritano M et al. (2005) association of childhood type 1 diabetes mellitus with a variant of PAX4: possible link to beta cell regenerative capacity. *Diabetologia* 48:900-905. *Diabetologia*. 2005 Oct;48(10):2180-2; author reply 2185-6.

Martin A, O'Hare P, McLauchlan J, Elliott G. ; Herpes simplex virus tegument protein VP22 contains overlapping domains for cytoplasmic localization, microtubule interaction, and chromatin binding. *J Virol*. 2002 May;76(10):4961-70.

Matsumoto S, Okitsu T, Iwanaga Y, Noguchi H, Nagata H, Yonekawa Y, Liu X, Kamiya H, Ueda M, Hatanaka N, Kobayashi N, Yamada Y, Miyakawa S, Seino Y, Shapiro AM, Tanaka K., Follow-up study of the first successful living donor islet transplantation. *Transplantation*. 2006 Dec 27;82(12):1629-33.

Mauvais-Jarvis F, Smith SB, Le May C, Leal SM, Gautier JF, Molokhia M, Riveline JP, Rajan AS, Kevorkian JP, Zhang S, Vexiau P, German MS, Vaisse C. PAX4 gene variations predispose to ketosis-prone diabetes. *Hum Mol Genet*. 2004 Dec 15;13(24):3151-9. Nishi K, Saigo K. ; Cellular internalization of green fluorescent protein fused with herpes simplex virus protein VP22 via a lipid raft-mediated endocytic pathway independent of caveolae and Rho family GTPases but dependent on dynamin and Arf6. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):27503-17.

Nagahara, H.; *et al*. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27kip1 induces cell migration. *Nat. Med*. 4:1449-1452, 1998.

Nishi K, Saigo K.; Cellular internalization of green fluorescent protein fused with herpes simplex virus protein VP22 via a lipid raft-mediated endocytic pathway independent of caveolae and Rho family GTPases but dependent on dynamin and Arf6. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):27503-17.

Noguchi H, Kaneto H, Weir GC, Bonner-Weir S. PDX-1 protein containing its own antennapedia-like protein transduction domain can transduce pancreatic duct and islet cells. *Diabetes*. 2003 Jul;52(7):1732-7.

Noguchi H, Bonner-Weir S, Wei FY, Matsushita M, Matsumoto S. BETA2/NeuroD protein can be transduced into cells due to an arginine- and lysine-rich sequence. *Diabetes*. 2005 Oct;54(10):2859-66.

Noguchi H, Matsumoto S. Protein transduction technology: a novel therapeutic perspective. *Acta Med Okayama*. 2006 Feb;60(1):1-11. Review.

Oliver-Krasinski JM, Stoffers DA. On the origin of the beta cell. *Genes Dev*. 2008 Aug 1;22(15):1998-2021. Review.

O'Regan KJ, Murphy MA, Bucks MA, Wills JW, Courtney RJ. ; Incorporation of the herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 into the virus particle is independent of interaction with VP16. *Virology*. 2007 Dec 20;369(2):263-80.

Park JW, Ji YI, Choi YH, Kang MY, Jung E, Cho SY, Cho HY, Kang BK, Joung YS, Kim DH, Park SC, Park J. Candidate gene polymorphisms for diabetes mellitus, cardiovascular disease and cancer are associated with longevity in Koreans. *Exp Mol Med*. 2009 Nov 30;41(11):772-81.

Patterson, C.C., Dahiquist, G. G., Gyurus, E., Green, A., Soltész, G. EURODIAB Study Group. Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-2020: A multicentre prospective registration study. *Lancet* 373, 2027-2033. 2009

Phelan A, Elliott G, O'Hare P. Intercellular delivery of functional p53 by the herpesvirus protein VP22. *Nat Biotechnol*. 1998 May;16(5):440-3

Plengvidhya N, Kooptiwut S, Songtawee N, Doi A, Furuta H, Nishi M, Nanjo K, Tantibhedhyangkul W, Boonyasrisawat W, Yenchitsomanus PT, Doria A, Banchuin N. PAX4 mutations in Thais with maturity onset diabetes of the young. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Jul;92(7):2821-6.

Prado, C, L; Pugh-Bernard, A., E; Elghazi, L; Sosa-Pineda, B; Sussel, L. Ghrelin cells replace insulin-producing β cells in two mouse models of pancreas development. *PNAS* 101: 2924-2929, 2004.

Puri S, Hebrok M. Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev Cell*. 2010 Mar 16;18(3):342-56. Review.

Ribeiro, M. M.; Klein D.; Pileggi A.; Molano D.; Fraker C.; Ricordi C.; Inverardi L.; Pastori R.L. Heme oxygenase-1 fused to a TAT peptide transduces and protects pancreatic β -cells. *Elsevier Science* 305:876-881, 2003.

Ricordi, C.; Lacy, PE.; Finke, E.H.; Olack B.J.; Scharp D.W. Automated method for isolation of human pancreatic islets. *Diabetes*. 37:413-20, 1988.

Ritz-Laser B, Estreicher A, Gauthier BR, Mamin A, Edlund H, Philippe J., The pancreatic beta-cell-specific transcription factor Pax-4 inhibits glucagon gene expression through Pax-6. *Diabetologia*. 2002 Jan;45(1):97-107.

Roy V, Qiao J, de Campos-Lima P, Caruso M. Direct evidence for the absence of intercellular trafficking of VP22 fused to GFP or to the herpes simplex virus thymidine kinase. *Gene Ther*. 2005 Jan;12(2):169-76.

Saha S, Yoshida S, Ohba K, Matsui K, Matsuda T, Takeshita F, Umeda K, Tamura Y, Okuda K, Klinman D, Xin KQ, Okuda K. ; A fused gene of nucleoprotein (NP) and herpes simplex virus genes (VP22) induces highly protective immunity against different subtypes of influenza virus. *Virology*. 2006 Oct 10;354(1):48-57.

SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes. Disponível em: www.diabetes.org.br (acesso em 21 maio 2010).

Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A, Dowdy SF. ; In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science*. 1999 Sep 3;285(5433):1569-72.

Schwarze SR, Hruska KA, Dowdy SF. ; Protein transduction: unrestricted delivery into all cells? *Trends Cell Biol*. 2000 Jul;10(7):290-5. Review.

Sciortino MT, Taddeo B, Poon AP, Mastino A, Roizman B. Of the three tegument proteins that package mRNA in herpes simplex virions, one (VP22) transports the mRNA to uninfected cells for expression prior to viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 11;99(12):8318-23.

Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells*. 2004; 22(3):265-74.

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbitt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*. 343:230-238, 2000.

Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ, Auchincloss H, Lindblad R, Robertson RP, Secchi A, Brendel MD, Berney T, Brennan DC, Cagliero E, Alejandro R, Ryan EA, DiMercurio B, Morel P, Polonsky KS, Reems JA, Bretzel RG, Bertuzzi F, Froud T, Kandaswamy R, Sutherland DE, Eisenbarth G, Segal M, Preiksaitis J, Korbitt GS, Barton FB, Viviano L, Seyfert-Margolis V, Bluestone J, Lakey JR., International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med*. 2006 Sep 28;355(13):1318-30.

Shimajiri Y, Sanke T, Furuta H, Hanabusa T, Nakagawa T, Fujitani Y, Kajimoto Y, Takasu N, Nanjo K. A missense mutation of PAX4 gene (R121W) is associated with type 2 diabetes in Japanese. *Diabetes*. 2001

Smith, S. T.; Ee, H. C.; Connors R. J.; German M. S.; Paired-homeodomain transcription factor PAX4 acts as a transcriptional repressor in esrly pancreatic development. *Mol Cell Biol*. 1999.

Sosa-Pineda B, Chowdhury K, Torres M, Oliver G, Gruss P. The Pax4 gene is essential for differentiation of insulin-producing beta cells in the mammalian pancreas. *Nature*. 1997 Mar 27;386(6623):399-402.

Sosa-Pineda B. The gene Pax4 is an essential regulator of pancreatic beta-cell development. *Mol Cells*. 2004 Dec 31;18(3):289-94. Review.

Spence J.R., and Wells J.M., Translational embryology: Using embryonic principles to generate pancreatic endocrine cells from embryonic stem cells. *Dev Dyn*. 2007, 236:3218-3227

Spitere K, Toulouse A, O'Sullivan DB, Sullivan AM. ; TAT-PAX6 protein transduction in neural progenitor cells: a novel approach for generation of dopaminergic neurones in vitro. *Brain Res*. 2008 May 7;1208:25-34. Epub 2008 Mar 4.

Sugita T, Yoshikawa T, Mukai Y, Yamanada N, Imai S, Nagano K, Yoshida Y, Shibata H, Yoshioka Y, Nakagawa S, Kamada H, Tsunoda SI, Tsutsumi Y. Comparative study on transduction and toxicity of protein transduction domains. *Br J Pharmacol*. 2008 Mar;153(6):1143-52.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-7.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961;14:213-22.

Tokuyama Y, Matsui K, Ishizuka T, Egashira T, Kanatsuka A. The Arg121Trp variant in PAX4 gene is associated with beta-cell dysfunction in Japanese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism*. 2006 Feb;55(2):213-6.

Ueda Y. Activin A increases Pax4 gene expression in pancreatic beta cell lines. *FEBS Lett.* 2000 Sep 1;480(2-3):101-5.

Wang, J; Elghazi, L; Parker, S. E., Kizilocak, H; Asano, M; Sussel, L.;Sosa-pineda, B. The concerted activities of PAX4 and Nkx2.2 are essential to initiate pancreatic β -cell differentiation. *Developmental Biology* 266:178-189, 2004.

Wang Q, Elghazi L, Martin S, Martins I, Srinivasan RS, Geng X, Sleeman M, Collombat P, Houghton J, Sosa-Pineda B. Ghrelin is a novel target of Pax4 in endocrine progenitors of the pancreas and duodenum. *Dev Dyn.* 2008 Jan;237(1):51-61.

WHO - World Health Organization: Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of a WHO Consultation. Geneva, 1999.

Xiong F, Xiao S, Yu M, Li W, Zheng H, Shang Y, Peng F, Zhao C, Zhou W, Chen H, Fang L, Chamberlain JS, Zhang C. ; Enhanced effect of microdystrophin gene transfection by HSV-VP22 mediated intercellular protein transport. *BMC Neurosci.* 2007 Jul 8;8:50.

Yang SG, Wo JE, Li MW, Mi FF, Yu CB, Lv GL, Cao HC, Lu HF, Wang BH, Zhu H, Li LJ. Expression of H5N1 influenza virus hemagglutinin protein fused with protein transduction domain in an alphavirus replicon system. *J Virol Methods.* 2010 Jan;163(1):31-9.

SUMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Nome: Ilana Gabanyi

Data de nascimento: 22 de fevereiro de 1984

Natural de: São Paulo – SP

Endereço: Rua Angelina Maffei Vita, 392 - Apto. 12
Jardim Paulistano
São Paulo – SP - Brasil
CEP 01455-070

Fone: 55-11-3816-2804

55-11-92292176

e-mail: igabanyi@hotmail.com

Formação Acadêmica

- Colégio I. L. Peretz ,São Paulo – SP – Brasil – 1º. e 2º. graus
- Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo ,São Paulo – SP
- Mestrado em ciências (Bioquímica) pela Universidade de São Paulo ,São Paulo – SP

Intercâmbios

- Hopkins High School, Mineapolis - MN - Estados Unidos – cursou o segundo semestre da segunda série do segundo grau.
- Universidade Politécnica de Valência, Valência – Espanha – cursou segundo semestre de 2005 e primeiro semestre de 2006 disciplinas pertinentes a área de Ciências Biológicas.
- École normale supérieure de Cachan, Cachan – França – Trabalhou de outubro de 2008 a março de 2009 no Laboratório de Biologia e Farmacologia Aplicada, LBPA.

Estágios

- Iniciação Científica - sob orientação da Prof^a Dra. Mari Cleide Sogayar e supervisão do Dr Fernando Henrique Lojudice na Unidade de Ilhotas Pancreáticas Humanas do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (setembro 2003 a dezembro 2006).
- Treinamento em pesquisa – sob a supervisão do Dr Jean-François Mouscadet e Dra Stéphanie Bury-Moné no Laboratório de Biologia e Farmacologia Aplicada - École normale supérieure de Cachan, Cachan, França – Outubro 2008 a Março 2009.

Monitorias

- Monitora no III Curso de Verão em Bioquímica e Biologia Molecular realizado pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP de 07 a 18 de janeiro 2008.
- Monitora pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) do curso de Bioquímica e Biologia Molecular ministrado para os alunos de Fisioterapia e Terapia Ocupacional da USP durante o 1º semestre de 2008.
- Monitora no IV Curso de Inverno Temas Avançados de Bioquímica e Biologia Molecular realizado pelo Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP de 20 a 31 de julho 2009.
- Monitora pelo Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE) do curso de Biologia Molecular ministrado para os alunos de Medicina Veterinária da USP durante o 2º semestre de 2009.

Bolsas de estudos

- Mestrado - financiado pela FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo).
- Intercambio com a École normale supérieure de Cachan – financiado pelo departamento de relações internacionais da École normale supérieure de Cachan.
- Intercambio com a Universidad Politecnica de Valencia – financiado através de um acordo entre a Universidade de São Paulo e a Universidad Politécnica de Valencia.
- Iniciação científica – financiado pela FAPESP.

Publicações

- Sogayar, M.C.; Eliaschewitz F.G.; Goldberg, A.C.; Noronha, I.L.; Genzini, T.; Labriola, L.; Krogh, K. ; Sá, S.V.; Lojudice, F.H.; Fortuna, V.A.; Correa-Giannella, M.L.C.; Maria-Enger, S.M.S.; Granjeiro, J. M.; Giannella-Neto, D.; Machado, M.;Oliveira, E.M.C.; Campos, A.C.V., Franco, D.; Noda, E.; de Castro, L.A.; Andreolli, M.; Miranda M.P.; Santos P.B.; Ferreira R.C.; Ferreira G.B.; **Gabanyi, I.**; Diabetes mellitus: new therapeutic approaches to treat an old disease. Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences 2005.

Resumos em congressos

- Apresentação de trabalho na XXXIV Reunião Anual da Sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular em 2005.
- Apresentação de trabalho na XXXVII Reunião Anual da Sociedade de Bioquímica e Biologia Molecular em 2008.
- Apresentação de trabalho no IV Simpósio internacional de Terapias Avançadas & Células-tronco em 2009
- Apresentação de trabalho no ISSCR 2010 8th Annual Meeting em 2010

Cursos Extracurriculares

- “Checkpoints, apoptose e câncer” durante a 6ª semana temática da Biologia em 2003.
- “Ecoturismo” durante a 6ª semana temática da Biologia em 2003.
- “Células-Tronco: Mecanismos e Aplicações” durante a 7ª semana temática da Biologia em 2004.
- “Avanços em Oncologia” realizado pela Faculdade de Medicina da USP em abril de 2004.
- “Avanços em Terapia Gênica e Celular” realizado pela Faculdade de Medicina da USP em maio de 2004.
- Curso Intensivo de Espanhol no centro de línguas latinas Hispania - março a maio/2005.
- Curso de Espanhol para Estrangeiros - nível avançado, na Universidade Politécnica de Valência, segundo semestre de 2005.

- Curso de Francês nível I - Universidade Politécnica de Valência, primeiro semestre de 2006.
- 13º Congresso Brasileiro Multidisciplinar e Multiprofissional em Diabetes realizado em julho 2008
- “Novas Tecnologias em Vacinas Recombinantes” realizado pelo Instituto de Ciências Biomédicas da USP em julho 2009
- Workshop “hESC e hiPSC: Soluções para Manutenção, Expansão e Diferenciação” realizado pela Science PRO em agosto 2009
- VII Simpósio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos em Instituições de Ensino e Pesquisa - realizado pela faculdade de Ciências farmacêuticas da USP em novembro 2009
- “Estruturação de Artigo para Publicação Internacional” realizado pela Universidade de São Paulo em julho 2010.

Idiomas

- Inglês Fluente (leitura, conversação e escrita).
- Espanhol Fluente (leitura, conversação e escrita).
- Francês intermediário.
- Conhecimentos de hebraico.