GLEICIELE ALICE VIEIRA SILVA

**Estabelecimento de linhagem de células-tronco de pluripotência induzida
(iPSC) de pacientes com perda auditiva hereditária**

Versão Corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia
Orientadora: Profa. Dra. Karina Lezirovitz
Mandelbaum
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Carla
Batissoco

SÃO PAULO

2021

GLEICIELE ALICE VIEIRA SILVA

**Estabelecimento de linhagem de células-tronco de pluripotência induzida
(iPSC) de pacientes com perda auditiva hereditária**

Versão Corrigida

(Resolução CoPGr 6018/11 de 01 de novembro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca da FMUSP)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Otorrinolaringologia
Orientadora: Profa. Dra. Karina Lezirovitz
Mandelbaum
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Carla
Batissoco

SÃO PAULO

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Silva, Gleiciele Alice Vieira

Estabelecimento de linhagem de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) de pacientes com perda auditiva hereditária / Gleiciele Alice Vieira Silva. -- São Paulo, 2021.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Otorrinolaringologia.

Orientadora: Karina Lezirovitz Mandelbaum.

Coorientadora: Ana Carla Batissoco.

Descritores: 1.Perda auditiva 2.Surdez não-sindrômica 3.Duplicação gênica 4.Superexpressão 5.Células-tronco pluripotentes induzidas 6.Fisiopatologia auditiva

USP/FM/DBD-137/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Nome: SILVA, Gleiciele Alice Vieira

Título: Estabelecimento de linhagem de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) de pacientes com perda auditiva hereditária

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial meus pais: Maria e Lourivaldo, dando-me suporte mesmo quando me veio o desânimo pelo carinho, apoio e por tudo que sempre fizeram.

À Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum, pesquisadora científica do Laboratório de Investigação Médica (LIM-32) e minha orientadora, pelo apoio, ensinamentos, discussões científicas, correções, orientação, pelo carinho, e por me proporcionar crescimento intelectual e científico em todos os momentos da realização do projeto.

À Dra. Ana Carla Batissoco, pós-doutoranda do departamento de otorrinolaringologia e minha coorientadora, pelo apoio, ensinamentos, discussões científicas, correções, orientação, pelo carinho, e pela disposição em me ajudar em todas as etapas desse estudo.

À Dra. Débora Levy, pesquisadora científica do Laboratório de Investigação Médica (LIM-19), pelo carinho de sempre, pelas discussões científicas, ideias e todo ensinamento.

Aos meus amigos Jackson Meneses, Juliana Sampaio Silva, Letícia Mantovani e Juliana Gonçalves da Silva, pela profunda amizade de tantos anos, que sempre aceitaram a minha distância e a dedicação extrema a esse trabalho e por todo o apoio durante toda esta jornada.

À Cláudia Regina de Marchi Lopes Hemza, Biologista do Laboratório de Investigação Médica (LIM-32) pelo auxílio e apoio na realização dos experimentos, pelo carinho e pela amizade de sempre.

À Faculdade de Medicina da USP ao Prof. Dr. Ricardo Ferreira Bento, Professor Titular da Disciplina de Otorrinolaringologia da FMUSP e à Profa. Dra. Jeanne Oiticica Ramalho Ferraz, chefe do Laboratório de Investigação Médica (LIM-32), por cederem o espaço físico para realização dos experimentos, bem como a oportunidade de obter grande conhecimento.

Aos Doutores Gerson Kobayashi e Danielle P. Moreira do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco – USP (CEGH-CEL) e o Fernando Lojudice do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL), por toda ajuda nas etapas de isolamento, expansão e reprogramação das PBMC em iPSC.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos nossos pacientes, pela paciência e colaboração durante a nossa pesquisa.

Sucesso não é o final, fracasso não é fatal: é a coragem para continuar que conta.

Winston Churchill

Normatização adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011.

Referências bibliográficas estão de acordo com as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT.

RESUMO

Silva GAV. *Estabelecimento de linhagem de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) de pacientes com perda auditiva hereditária* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

A perda auditiva afeta mais de 466 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo considerado o defeito sensorial mais frequente em humanos. O estudo dos genes de surdez tem contribuído no conhecimento da fisiologia auditiva e no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Porém, ainda há uma fração considerável de genes de surdez a serem identificados e novas vias biológicas a serem reveladas. O mapeamento desses genes em grandes famílias levou ao conhecimento de mais de uma centena de loci gênicos relacionados à surdez hereditária, incluindo o DFNA58 (2p12-p21), mapeado em 2009 pela orientadora deste estudo. Após o mapeamento do *locus* DFNA58, foi identificada uma duplicação de ~200Kb por meio de sequenciamento do exoma, dentro da região cromossômica candidata mapeada, cuja co-segregação com a perda auditiva não-sindrômica sensorioneural pós-lingual e progressiva de herança autossômica dominante foi confirmada na família. A duplicação inclui três genes codificadores de proteína, dois inteiros (*PLEK* e *CNRIP1*) e o exon 1 de *PPP3R1*, cuja expressão foi confirmada na cóclea, além disso de quatro outros genes menos caracterizados. Ensaaios de RT-qPCR a partir de células mononucleares do sangue dos portadores da duplicação revelaram superexpressão de três dos genes duplicados. No entanto, não há como saber se o mesmo padrão alterado também ocorre na cóclea. Dessa forma, para contribuir na elucidação do papel dessa duplicação (e de seus genes envolvidos) na fisiologia auditiva e por consequência, na surdez, esse estudo teve como objetivo criar um modelo celular experimental, por meio do estabelecimento de linhagens de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) a partir das células mononucleares do sangue periférico dos pacientes dessa família afetados por surdez e portadores desta duplicação e, também dos normouvintes, não portadores desta duplicação. Estabelecidas as linhagens, verificar se as linhagens de iPSC derivadas dos afetados possuem a duplicação e o mesmo padrão de expressão alterado observado nas células mononucleares do sangue dos indivíduos com duplicação. Para isso, foram utilizados vetores episomais a fim de induzir a reprogramação de células mononucleares de sangue periférico a iPSC. Foram obtidas três linhagens iPSC, uma sem duplicação e duas com duplicação, que se mostraram pluripotentes e com potencial de se diferenciarem em células dos três tecidos dos folhetos embrionários. Além disso, o rastreamento dos vetores utilizados na reprogramação revelou que as linhagens estão livres de integração após a quinta passagem. O padrão de expressão alterado visto no sangue também estava presente nas iPSC, porém um quarto gene, de lncRNA, se mostrou muitas vezes superexpresso nas linhagens dos indivíduos com duplicação em relação aos sem duplicação, corroborando a nossa hipótese de que o padrão de expressão na cóclea pode não refletir o que observamos em outros tipos celulares. Em resumo, foi estabelecido um modelo celular fundamental que, por meio da diferenciação em células fenotipicamente semelhantes às encontradas no epitélio sensorial auditivo, poderá auxiliar nos estudos sobre os efeitos da duplicação nas vias biológicas cruciais na audição.

Descritores: Perda auditiva; Surdez não-sindrômica; Duplicação gênica; Superexpressão; Células-tronco pluripotentes induzidas; Fisiopatologia auditiva.

ABSTRACT

Silva GAV. *Establishment of induced pluripotency stem cell line (iPSC) of patients with hereditary hearing loss* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina”, Universidade de São Paulo; 2021.

Hearing loss is considered the most common sensory defect in humans, affecting more than 466 million people worldwide. The study of hearing loss genes has contributed to the advancing knowledge of auditory physiology and new therapeutic approaches development. However, there is still a considerable fraction of those genes to be identified and new biological pathways revealed. The study of large families in which hearing loss was segregating led to the discovery of more than a hundred genetic loci, including DFNA58 (2p12-p21), mapped in 2009 by our team, associated with non-syndromic, sensorineural, post-lingual progressive hearing loss with autosomal dominant inheritance. Afterward, a ~ 200Kb duplication was identified through exome sequencing within the mapped locus, which co-segregates with hearing loss in the family. The duplication includes three protein-coding genes, two entire (*PLEK* and *CNRIP1*) and exon 1 of *PPP3R1*, from which the expression was confirmed in the cochlea, in addition to five other less characterized genes. RT-qPCR assays from duplication carriers' blood mononuclear cells revealed overexpression of three of the duplicated genes. However, whether the same altered pattern also occurs in the cochlea is unpredictable. Thus, in an attempt to elucidate the duplication role (and the involved genes) in the auditory physiology and, consequently, in deafness, this study aimed to create an experimental cell model by establishing induced pluripotency stem cell lines (iPSC) from the peripheral blood mononuclear cells of three female patients from this family, two affected by hearing loss and duplication carriers and one non-carrier normal-hearing. Episomal vectors were used to induce reprogramming of the peripheral blood mononuclear cells into iPSC. Three iPSC lines were obtained, one from an individual without the duplication and two from duplication carriers, which express pluripotent markers and can differentiate into cells of all three germ layers. In addition, the iPSC lines were free of vector integration after the fifth passage. The altered expression pattern seen in the blood was also present in iPSC, but a fourth gene, a lncRNA, showed overexpression in duplication carriers iPSC compared to the non-carrier iPSC, corroborating our hypothesis that the pattern of expression in the cochlea may not resembles what was observed in other cell types. In summary, an essential cellular model was established that, by differentiating into cells phenotypically similar to those found in the auditory sensory epithelium, could finally recapitulate the effects of the duplication on the crucial biological pathways in hearing.

Descriptors: Hearing loss; Non-syndromic hearing loss; Gene duplication; Overexpression; Induced pluripotent stem cells; Auditory pathophysiology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação da orelha humana. A: Divisão do órgão auditivo em orelhas externa, média e interna com secção longitudinal da cóclea, mostrando os três compartimentos (escalas) que a formam e do órgão de Corti e seus principais tipos celulares; B: Neurônios do gânglio espiral que inervam as células ciliadas. Figura modificada de Kramer; Brown 2019: Audiology: science to practice; Lang H. 2016: *The Primary Auditory Neurons of the Mammalian Cochlea* e acousticslab.org. 25

Figura 2: Esquema da região cromossômica da duplicação mostrando a localização das sondas MLPA e a extensão da duplicação de acordo com os diferentes métodos e combinando todos [NC_000002.12: g. (68 247 572_68 248 077) _ (68 449 525_68 452 166) dup]. GRCh38 como o conjunto do genoma de referência. Ambos os pontos de interrupção (regiões BK breakpoints) e dentro de elementos repetitivos. Foram observados no sangue dos portadores da duplicação superexpressão dos genes circulados. Modificada de LEZIROVITZ *et al.* (2020). 30

Figura 3: Heredograma da família DFNA58, os pontos de interrogação indicam as pessoas sem queixas de PA, das quais não temos exames clínicos e que estão abaixo da idade máxima de manifestação da PA observada na família. DUP e ND indicam respectivamente, presença e ausência da duplicação, sendo que em todos os casos, a duplicação encontra-se em heterozigose. Os sinais de + e - dentro do retângulo cinza indicam respectivamente, a superexpressão e a expressão normal dos genes *CNRIP1*, *LOC107985892* e *LOC102724389* observadas por RT-qPCR, respectivamente de cima para baixo, nas células mononucleares obtidas a partir do sangue dos pacientes. 31

Figura 4: (A – C) Resultados de RT-qPCR mostrando níveis de RNAm no sangue em portadores de duplicação (média de pelo menos 10 indivíduos, em preto) e não portadores (média de pelo menos oito sujeitos, em branco) dos genes envolvidos na duplicação ou próximos à provável posição da sua inserção: A) genes envolvidos na duplicação: *PPP3R1* (exon 1), *CNRIP1* (todos os transcritos), *PLEK* (transcrito codificador de proteína e transcrito de íntron retido) e *PPP3R1* (expressão geral de todos os transcritos). B) os níveis de RNAm de *PNO1* e *WDR92*, dois genes vizinhos da provável posição da inserção da duplicação. C) níveis de RNAm de genes lncRNA não caracterizados contidos dentro do segmento de duplicação: *LOC101927723*, *AC017083.1*, *LOC102724389* e *LOC107985892*. Os gráficos que mostram genes que são ligeiramente superexpressos (1,2-1,8X) foram indicados por uma borda de linha única: *PLEK* (transcrito de codificador de proteína), *PPP3R1* (exon 1 de todos os três transcritos) e *AC017083.1* (gene lncRNA). Gráficos mostrando genes que foram altamente superexpressos (4-27X) comparação de portadores vs não portadores foram indicados por borda de linha dupla: *CNRIP1*, *LOC102724389* e *LOC107985892*. D) Possíveis posições de inserção do segmento duplicado (?). O tamanho do segmento duplicado é indicado pela borda de linha dupla. Dependendo da posição de inserção, o novo gene *AC017083.3* pode ou não pode ser interrompido. Exemplos dos transcritos de fusão de baixa abundância *CNRIP1-PPP3R1* encontrados nos transportadores de duplicação são mostrados abaixo. Modificada de LEZIROVITZ *et al.* (2020). 33

Figura 5: Linha do tempo histórica com a descrição dos principais eventos que levaram à geração das linhagens de células-tronco de pluripotente induzida (iPSC). SCNT – *Somatic cell nuclear transfer*, OSKM – Oct 3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc, OSNL – Oct 3/4, Sox2, Nanog e Lin28. Adaptado de OMOLE; FAKOYA 2018. 40

Figura 6: Fluxograma com a descrição sucinta das etapas realizadas nesse estudo.	53
Figura 7: Fórmula utilizada para contagem do número total de células por mL em câmara de Neubauer.	55
Figura 8: Plasmídeos utilizados neste estudo: CAG, promotor CAG; WPRE, elemento regulador pós-transcricional da hepatite de marmota (do inglês Woodchuck Hepatitis Post-transcriptional Regulatory Element); pA: calda poliA, shRNA suprimindo p53 Adaptada de Okita <i>et. al.</i> , 2011.	56
Figura 9: Equação utilizada nos cálculos de quantificação relativa de expressão gênica proposto por Pfaffl (2001). Ratio = Quantificação relativa a amostra calibradora ou controle, E = Eficiência dos <i>primers</i> . ΔCP_{target} = diferença nos limiares <i>Cp</i> ou <i>Ct</i> (<i>cycle threshold</i>) entre controle e amostra (sample) relativo ao gene alvo ou teste; ΔCP_{ref} = diferença nos limiares <i>Cp</i> ou <i>Ct</i> (<i>cycle threshold</i>) entre controle e amostra (sample) relativo ao gene de referência, endógeno ou <i>housekeeping</i>	64
Figura 10: Heredograma da família DFNA58. Os pontos de interrogação indicam as pessoas sem queixas de PA, das quais não temos exames clínicos e que estão abaixo da idade máxima de manifestação da PA observada na família. DUP e ND indicam respectivamente, presença e ausência da duplicação, em todos os casos, a duplicação encontra-se em heterozigose. Os sinais de + e - dentro do retângulo cinza indicam respectivamente, a superexpressão e a expressão normal do gene <i>CNRIP1</i> , <i>LOC107985892</i> e <i>LOC102724389</i> observadas por RT-qPCR. Retângulos vermelhos indicam as culturas que não resultaram em linhagens iPSC, retângulos verdes indicam linhagens iPSC estabelecidas.....	72
Figura 11: Imagens do processo de reprogramação da iPSC V:19, mostrando a alteração de morfologia celular, onde as células passam de individualizadas com crescimento em suspensão para células com crescimento em colônias similar a CTe. A: células após 14 dias de cultivo, pré-nucleofecção. Barra de escala: 200 µm. B: Células aderidas ao Matrigel seis dias após nucleofecção. Barra de escala: 200 µm. C: Primeira colônia de iPSC obtida 18 dias de cultivo após nucleofecção. Barra de escala: 1000 µm. D: Colônia de iPSC na 10ª passagem. Barra de escala: 1000 µm. Imagens em contraste de fase. Microscopia óptica (EVOS™ XL Core Imaging System – Thermo Fisher Scientific).	76
Figura 12: Imagens do processo de reprogramação da iPSC VI:7 mostrando a alteração de morfologia celular, onde as células passam de individualizadas com crescimento em suspensão para células com crescimento em colônias similar a CTe. A: Células após 11 dias de cultivo, pré-nucleofecção. Barra de escala: 200 µm. B: Células dois dias após a nucleofecção. Barra de escala: 200 µm. C: Primeira colônia de iPSC 24 dias de cultivo após nucleofecção. Barra de escala: 1000 µm. D: Colônia de iPSC na 10ª passagem. Barra de escala: 1000 µm. Imagens em contraste de fase. Microscopia óptica (EVOS™ XL Core Imaging System – Thermo Fisher Scientific).	77
Figura 13: Imagens do processo de reprogramação da iPSC IV:4 mostrando a alteração de morfologia celular, onde as células passam de individualizadas com crescimento em suspensão para células com crescimento em colônias similar a CTe. A: Células após 11 dias de cultivo, pré-nucleofecção. Barra de escala: 200 µm. B: Células dois dias após a nucleofecção. Barra de escala: 200 µm. C: Primeira colônia de iPSC 24 dias de cultivo após nucleofecção. Barra de escala: 1000 µm. D: Colônia de iPSC na 10ª passagem. Barra de	

escala: 1000 µm. Imagens em contraste de fase. Microscopia óptica (EVOS™ XL Core Imaging System – Thermo Fisher Scientific).78

Figura 14: Imagem do gel de agarose 2,5 % representativo da eletroforese da PCR para detecção de contaminação por micoplasma por meio do *MycoScope* kit com todas as linhagens iPSCs geradas. CTLE+: controle positivo fornecido pelo fabricante; CTLE-: controle negativo e PM: marcador de 100 pb. Gel corado com SYBR Safe – Thermo Fisher Scientific..... 79

Figura 15: Imagem do gel de agarose 2,5 % representativo da eletroforese da RT-PCR para análise dos fatores de pluripotência. A: *OCT4* (fragmento de 142pb), B: *LIN28* (122pb), C: *KLF4* (318pb), D: *NANOG* (200pb), E: *SOX2* (323pb), F: *L-MYC* (291pb) G: gene de referência (*GAPDH*, fragmento de 414pb). A presença de bandas escuras (com grande intensidade) indica a presença dos fatores de pluripotência, enquanto que a ausência ou a presença de bandas claras (com baixa intensidade) indica a ausência de quantidade significativa dos fatores de pluripotência. O gene *GAPDH* foi usado como referência, portanto, apresenta intensidade de amplificação semelhante em todas as amostras. CTLE-: controle negativo e PM: marcador de 100pb. Gel corado com SYBR Safe – Thermo Fisher Scientific..... 80

Figura 16: Imunofluorescência indireta da iPSC da paciente V:19 mostrando a expressão dos marcadores de pluripotência *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC* e *LIN28*. Núcleos foram corados com DAPI (azul). *ImageXpress Micro High Content Screening system* (Molecular Devices)..... 81

Figura 17: Análise da expressão dos marcadores pluripotência por RT-qPCR Quantificação da expressão relativa dos genes *L-MYC*, *SOX2*, *OCT4* e *NANOG*. As reações individuais de RT-qPCR foram normalizadas em relação aos genes de referência (*TBP* e *GAPDH*) e plotadas em relação ao nível de expressão da célula parental (PBMC). 82

Figura 18: Ensaio de diferenciação *in vitro*. A-D paciente V:19 sem a duplicação, E-H paciente VI:7 com duplicação e I-L paciente IV:4 com duplicação. A, E e I: imagens da formação dos corpos embrioides. B, F e J: imagens com a confirmação do potencial de diferenciação das iPSC em endoderme. C, G e K: imagens com a confirmação do potencial de diferenciação das iPSC em mesoderme. D, H e L: imagens com a confirmação do potencial de diferenciação das iPSC em ectoderme, seta vermelha= formação de pequena colônia. Barra de escala 200 µm: A, E e I; B, C, D, F, G, H, J, K e L 100 µm. Imagens em contraste de fase. Microscopia óptica (EVOS™ XL Core Imaging System – Thermo Fisher Scientific)..... 83

Figura 19: Imagem do gel de agarose 2,5 % representativo da eletroforese da RT-PCR para análise dos marcadores dos três folhetos embrionários. A: *AFP* (fragmento de 281pb), B: *MSX1* (fragmento de 307pb), C: *PAX6* (fragmento de 317pb). Presença de bandas escuras (com grande intensidade) indica a presença dos marcadores dos folhetos embrionários, enquanto que a ausência de bandas indica a ausência dos marcadores. CTLE-: controle negativo e PM: marcador de 100 pb. Gel corado com SYBR Safe – Thermo Fisher Scientific. 85

Figura 20: Imagem do gel de agarose 2,5 % da eletroforese representativo da reação de amplificação da região Orip presente nos vetores pCE-hOCT3/4, pCE-hSK, pCE-hUL, pCE-mP53DD e da reação de amplificação da região EBNA-1 presente no vetor pCXB-EBNA1 realizada em todas as linhagens de iPSC. CTLE-: controle negativo e PM: marcador de 100pb. Gel corado com SYBR Safe – Thermo Fisher Scientific. 86

Figura 21: Análise de MLPA das linhagens iPSC V:19, VI:7 e IV:4 mostrando ausência de anormalidades cromossômicas. Na imagem temos os gráficos dos resultados obtidos com as sondas dos *kits* P070 e P036. As sondas subteloméricas estão representadas com os pontos azuis e as sondas controle com pontos verdes e vermelhos.87

Figura 22: Microssatélites analisados confirmando a identidade da iPSC da paciente V:19. Os gráficos acima indicam os picos de fluorescência dos alelos (cada pico representa um alelo) amplificados com os *primers* referentes aos marcadores: D2S1779 (heterozigoto, fragmentos de 137 pb e 149 pb) D2S2114 (heterozigoto, fragmentos de 150 pb e 152 pb), D2S443 (heterozigoto, fragmentos de 230 pb e 238 pb), D17S1783 (heterozigoto, fragmentos de 134 pb e 136 pb), D17S805 (heterozigoto, fragmentos de 222 pb e 224 pb) e D6S1610 (heterozigoto, fragmentos de 128 pb e 132 pb). 1= Amostra de sangue da paciente e 2= amostra da iPSC.88

Figura 23: Microssatélites analisados confirmando a identidade da iPSC da paciente VI:7. Os gráficos acima indicam os picos de fluorescência dos alelos (cada pico representa um alelo) amplificados com os *primers* referentes aos marcadores: D2S1779 (heterozigoto, fragmentos de 137 pb e 140 pb), D2S2114 (heterozigoto, fragmentos de 146 pb e 150 pb), D2S443 (heterozigoto, fragmentos de 234 pb e 238 pb), D17S1783 (heterozigoto, fragmentos de 128 pb e 136 pb), D17S805 (homozigoto, fragmento de 222 pb) e D6S1610 (heterozigoto, fragmentos de 134 pb e 138 pb). 1= Amostra de sangue da paciente e 2= amostra da iPSC...89

Figura 24: Microssatélites analisados confirmando a identidade da iPSC da paciente IV:4. Os gráficos acima indicam os picos de fluorescência dos alelos (cada pico representa um alelo) amplificados com os *primers* referentes aos marcadores: D2S1779 (homozigoto, fragmento de 137 pb), D2S2114 (heterozigoto, fragmentos de 150 pb e 154 pb), D2S443 (heterozigoto, fragmentos de 230 pb e 238 pb), D17S1783 (heterozigoto, fragmentos de 132 pb e 134 pb), D17S805 (heterozigoto, fragmentos de 220 pb e 222 pb) e D6S1610 (heterozigoto, fragmentos de 128 pb e 138 pb). 1= Amostra de sangue da paciente e 2= amostra da iPSC...90

Figura 25: Análise da expressão dos genes incluídos na duplicação e de gene vizinho (*FBXO48*) por qPCR evidenciando que as linhagens iPSC derivadas do sangue de portadores duplicação preservaram a duplicação. Valores ao redor de 1.5 indicam 1 cópia extra do segmento que contém os genes *PLEK*, *CNRIP1* e *PPP3R1* nas iPSC de VI:7 e IV:4, mas número normal de cópias do exon 4 do gene *FBXO48*, vizinho ao segmento duplicado, quando comparamos a iPSC de V:19 (não portadora da duplicação).91

Figura 26: Análise de expressão dos genes envolvidos na duplicação nas iPSC por RT-qPCR. Análises de genes vizinhos a duplicação.93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Algumas das principais síndromes prevalentes dentre os casos de PA pré-lingual.	27
Tabela 2: Resumo dos mecanismos de herança da surdez não-sindrômica, o quadro clínico, <i>loci</i> e genes associados.	28
Tabela 3: Relação de estudos que obtiveram sucesso no estabelecimento de linhagens iPSC de pacientes portadores de surdez síndrômica e/ou não síndrômica. Destacado em negrito aqueles trabalhos discutidos com mais detalhes nessa dissertação. F= Feminino; M= Masculino; NI= Não Informado; FD= Fibroblasto dérmico; PBMC= <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> ; U= Urina.....	48
Tabela 4: Relação das citocinas utilizadas no CEGH-CEL e NUCEL. SCF= <i>Stem Cell Fator</i> ; EPO= <i>Erythropoietin</i> ; IGF-1= <i>Insulin-Like Growth Factor</i> ; LC= <i>Lipid cholesterol</i> ; IL-3= <i>Interleukin 3</i>	56
Tabela 5: Sequência dos <i>primers</i> e ciclagem	62
Tabela 6: Relação dos anticorpos e diluições utilizados	63
Tabela 7: Sequência dos <i>primers</i> utilizados para a RT-qPCR dos marcadores de pluripotência.	65
Tabela 8: Ciclagem utilizada para a amplificação nas reações de RT-qPCR.....	65
Tabela 9: Sequência dos primers de RT-PCR utilizados na identificação funcional.	66
Tabela 10: Sequência dos <i>primers</i> utilizados na PCR de avaliação de possíveis ocorrências de integrações espontâneas dos plasmídeos episomais.	68
Tabela 11: Sequência dos primers de qPCR para a detecção da duplicação.....	69
Tabela 12: Sequência dos primers para verificar o nível de expressão dos genes duplicados.	70
Tabela 13: Relação de todas as amostras que foram utilizadas para a reprogramação com vetores episomais, com a descrição de todas as etapas do experimento e sua conclusão, ou seja, a obtenção ou não da linhagem iPSC.	74
Tabela 14: Relação do total de <i>vials</i> por passagem, em destaque os clones utilizados nesse trabalho.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aa	Aminoácidos
AD	Autossômico Dominante
AR	Autossômico Recessivo
ArrayCGH	do inglês, <i>Comparative Genome Hybridization</i>
BSA	do inglês, <i>Bovine Albumin Serum</i>
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	do inglês, <i>Complementary DNA</i>
CIBIO	Comissão Interna de Biossegurança
CT	Células-tronco
CTa	Células-tronco Adultas
CTe	Células-tronco embrionárias
Ctl	Controle
DAPI	do inglês, <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
dB	decibéis
DEPC	do inglês, <i>Diethylpyrocarbonate</i>
DFN	do inglês, <i>DeaFNess</i>
DIV	Dias <i>in vitro</i>
DMSO	do inglês, <i>Dimethyl sulfoxide</i>
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTPs	do inglês, <i>Deoxyribonucleotide Triphosphates</i>
DPBS	do inglês, <i>Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline</i>
DUP	do inglês, <i>Duplication</i> (Presença da Duplicação)
EPO	do inglês, <i>Erythropoietin</i>
ES	do inglês, <i>Essential Medium</i> (Meio Essencial)
FGF2	do inglês, <i>Fibroblast Growth Factor 2</i>
FM-USP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GJP	do inglês, <i>Gap Junction Plaque</i>
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
IGF-1	do inglês, <i>Insulin-like Growth Factor 1</i>
iPSC	do inglês, <i>induced Pluripotent Stem Cells</i>
Kb	Kilobases

lncRNA	do inglês <i>Long non-coding RNA</i>
Lig.X	Ligado ao X
MCI	Massa Celular Interna
MEFs	do inglês, <i>Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
miRNA	do inglês, <i>Micro Ribonucleic Acid</i>
MPSII	Mucopolissacaridose tipo 2
ND	do inglês, <i>No Duplication</i> (Ausência da Duplicação)
NUCEL	Núcleo de Terapia Celular e Molecular
OSKM	<i>Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc</i>
PA	Perda Auditiva
PANS	Perda Auditiva Sensorioneural
PASNBPP	Perda Auditiva Sensorioneural Bilateral Pós-lingual e Progressiva
Pb	Pares de Base
PBMC	do inglês, <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	do inglês, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PFA	do inglês, <i>Paraformaldehyde</i>
QCD	Quadro Clínico Distinto
qPCR	do inglês, <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	do inglês, <i>Ribonucleic Acid</i>
RNAi	do inglês, <i>Ribonucleic Acid interference</i>
rRNA	do inglês, <i>Ribosomal Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	do inglês, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RT-qPCR	do inglês, <i>Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
SCF	do inglês, <i>Stem Cell Factor</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SFEBq	do inglês, <i>Serum-free Culture of Embryoid Body-Like with quick-aggregation</i>
shRNA	do inglês, <i>Short hairpin Ribonucleic Acid</i>
TA	Temperatura Ambiente
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO	19
2. OBJETIVOS	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	22
3.1 PERDA AUDITIVA HEREDITÁRIA	26
3.2.1 O locus DFNA58 e os seus genes candidatos à surdez	28
3.3 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO (CT)	36
3.4 HISTÓRICO DAS CÉLULAS-TRONCO	37
3.5 CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA – iPSC.....	40
3.6 O PAPEL DOS FATORES DE REPROGRAMAÇÃO (Oct4/Sox2/Klf4/L- myc/Lin28) NA MANUTENÇÃO E REESTABELECIMENTO DA PLURIPOTÊNCIA	42
3.7 MÉTODOS UTILIZADOS PARA TRANSFEÇÃO	44
3.8 iPSC EM ESTUDOS RELACIONADOS À SURDEZ	46
4. CASUÍSTICA E MÉTODOS	53
4.1 FLUXOGRAMA	53
4.2 COMISSÃO DE ÉTICA	53
4.3 PACIENTES.....	54
4.3.1 Coleta de sangue periférico	54
4.4 CULTURA E REPROGRAMAÇÃO DAS iPSC	54
4.4.1 Isolamento das PBMC.....	54
4.4.2 Expansão das PBMC	55
4.4.3 Reprogramação das PBMC por nucleofecção	56
4.5 PROTOCOLO DE CONGELAMENTO DAS PBMC E iPSC.....	58
4.6 PROTOCOLO DE DESCONGELAMENTO DAS PBMC E iPSC	59
4.7 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR das iPSC.....	60
4.8 EXTRAÇÃO DE RNA A PARTIR DAS PBMC, iPSC, FOLHETOS EMBRIONÁRIOS E SÍNTESE DE cDNA.....	60
4.9 CARACTERIZAÇÃO DAS iPSC.....	61
4.9.1 Análise qualitativa da expressão gênica dos marcadores de pluripotência	61
4.9.2 Análise quantitativa da expressão gênica dos marcadores de pluripotência	63
4.9.3 Ensaio de formação de corpos embrióides e análise da expressão gênica de marcadores de diferenciação	65
4.10 AVALIAÇÃO DA IDENTIDADE DAS iPSC	67
4.11 AVALIAÇÃO QUANTO A ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS	67
4.12 AVALIAÇÃO QUANTO À OCORRÊNCIA DE INTEGRAÇÕES ESPONTÂNEAS.....	68

4.13 ANÁLISE PARA CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DA DUPLICAÇÃO E DA EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA DUPLICAÇÃO DO DFNA58	69
4.13.1 Análise para confirmação da presença da duplicação do DFNA58 nas iPSC.....	69
4.13.2 Análise da expressão dos genes envolvidos na duplicação do DFNA58 por RT-qPCR.....	69
5. RESULTADOS	71
5.1 EXPANSÃO E REPROGRAMAÇÃO DE PBMC EM iPSC POR VETORES EPISSOMAIIS	71
5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS iPSC DERIVADAS DE PBMC	79
5.2.1 Caracterização quanto ao potencial pluripotente.....	79
5.2.2 Caracterização quanto ao potencial de diferenciação.....	82
5.3 AVALIAÇÃO QUANTO À OCORRÊNCIA DE INTEGRAÇÕES ESPONTÂNEAS NAS iPSC.....	85
5.4 AVALIAÇÃO QUANTO A ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS	86
5.5 IDENTIDADE DAS iPSC.....	87
5.6 AVALIAÇÃO QUANTO À PRESENÇA DA DUPLICAÇÃO E DOS GENES ENVOLVIDOS	91
5.6.1 Avaliação quanto à presença da duplicação	91
5.6.2 Análise de expressão dos genes contidos na duplicação	91
6. DISCUSSÃO	93
6.1 ESTABELECIMENTO DE iPSC A PARTIR DAS PBMC POR VETORES EPISSOMAIIS E SUA CARACTERIZAÇÃO	93
6.2 PRESENÇA DA DUPLICAÇÃO NO <i>LOCUS</i> DFNA58 NAS iPSC.....	99
6.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES CONTIDOS NA DUPLICAÇÃO	100
7. CONCLUSÃO.....	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103
9. ANEXOS	117
9.1 TERMO DE APROVAÇÃO CAPPesq.....	117
9.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	117
9.3 TERMO DE APROVAÇÃO CIBio	121

1. INTRODUÇÃO

A perda auditiva (PA) é caracterizada pela perda parcial ou total da audição e afeta mais de 466 milhões de pessoas (432 milhões de adultos e 34 milhões de crianças) em todo o mundo (WHO, 2021). É considerado o defeito sensorial mais comum na espécie humana. Estima-se que, até 2050, perto de 2,5 bilhões de pessoas no mundo todo estarão vivendo com algum grau de PA, correspondente a 25% da população (WHO, 2021) o que irá gerar grandes impactos sociais e econômicos, em virtude do prejuízo nas habilidades cognitivas e linguísticas (habilidade de comunicação), bem como no comportamento social e emocional desses indivíduos (GRASEL *et al.*, 2018, BENTO; SOUZA 2019). Estima-se que 60% dos casos de PA tenham etiologia genética e que pelo menos 1% dos genes do genoma humano, correspondendo a cerca de 250 genes, sejam fundamentais para a audição (FRIEDMAN; GRIFFITH, 2003). A PA pode ser classificada em: condutiva, sensorineural e mista, sendo as formas sensorineurais as mais comumente observadas. Na maioria dos casos, a PA sensorineural resulta da morte das células ciliadas e/ou dos neurônios da cóclea, sendo essa uma condição permanente, uma vez que as células cocleares dos mamíferos não têm capacidade regenerativa (DUFNER-ALMEIDA *et al.*, 2019). No entanto, potenciais células quiescentes com capacidade de proliferação e/ou diferenciação limitadas já foram relatadas tanto no gânglio espiral humano adulto (RASK; ANDERSEN *et al.*, 2005) quanto no órgão de Corti (MASSUCCI-BISSOLI *et al.*, 2017; SENN *et al.*, 2020). Por isso, as terapias potenciais em estudo atualmente têm se baseado no transplante de células (diferenciadas ou prontas para diferenciação) ou na ativação dessas células quiescentes cocleares que poderiam vir a substituir as células perdidas (BARBOZA *et al.*, 2016; MAHARAJAN *et al.*, 2021; SENN *et al.*, 2020).

O conhecimento obtido com a descoberta dos genes da surdez revela novas vias biológicas que compõem a complexa estrutura e funcionamento da cóclea, além de apresentar os elementos-chave para a diferenciação das células ciliadas, células de suporte e neurônios auditivos a partir de células-tronco pluripotentes cultivadas. Dando assim conhecimentos fundamentais sobre como manipular as vias para atingir objetivos terapêuticos. Nas últimas duas décadas, houve um grande progresso na identificação de novos genes de surdez, graças aos avanços nas técnicas e análises de sequenciamento de nova geração (VONA *et al.*, 2015). Na verdade, 123 genes associados com PA hereditária não sindrômica já foram identificados por meio de mapeamento genético de genes de surdez segregando em famílias grandes, bem

como devido a modelos animais, especialmente camundongos, que recapitulam PA hereditária humana (VAN CAMP; SMITH 2021; DROR; AVRAHAM, 2010; RICHARDSON; MONVEL; PETIT, 2011). Os genes de surdez revelados por esses estudos codificam proteínas expressas em localizações cocleares variáveis, mas principalmente em células ciliadas internas e seus botões sinápticos, que realizam a mecanotransdução sensorial; células ciliadas externas; células de suporte que reciclam K⁺ e sustentam as células ciliadas fisicamente, além de secretarem fatores para as células ciliadas (WAN *et al.*, 2014); células da estria vascular, responsável pela manutenção do potencial endococlear; neurônios do gânglio espiral. Esses genes desempenham uma ampla variedade de funções para produzir o microambiente e a citoarquitetura elaborada da cóclea, como bombas ou canais iônicos importantes para a manutenção do potencial endococlear, fatores de transcrição, componentes da matriz extracelular (e. Membrana tectorial) e do citoesqueleto, moléculas de sinalização e transporte, receptores, reguladores de proliferação celular, enzimas, componentes de junções celulares entre outros. Assim, o desafio passou a ser não apenas identificar as variantes genéticas causadoras da surdez, mas também comprovar seu efeito patogênico e descrever o mecanismo que leva a PA, além de verificar em qual via fundamental para a audição este gene atua. Esses estudos são essenciais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas visando o restabelecimento da audição com base no mecanismo molecular e celular da fisiologia auditiva.

Células-tronco (CT) têm a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares específicos, possuem um grande potencial na regeneração e no reparo tecidual, por essas razões elas vêm sendo utilizadas na medicina como candidatas a tratamentos para diversas doenças. As células-tronco embrionárias (CTe) são as melhores candidatas para estudos relacionados a tratamentos de doenças, pois são pluripotentes e possuem um alto poder de diferenciação. As CTe são encontradas apenas nos embriões na fase de blastocisto. Em virtude das dificuldades éticas acerca da utilização de embriões humanos, surgiu a necessidade de se desenvolver metodologias que pudessem induzir células adultas a um estado pluripotente similar ao embrionário. Assim, as células-tronco de pluripotência induzidas (induced Pluripotent Stem Cells – iPSC) – geradas pela expressão de fatores de transcrição definidos em células somáticas – foram criadas por Takahashi e Yamanaka em 2006 com o objetivo de sanar essas questões.

Dada a heterogeneidade genética da PA, células diferenciadas em células ciliadas e neurônios óticos a partir de iPSC, originadas de células humanas adultas de pacientes,

permitem o estudo de inúmeras vias biológicas que podem se revelar importantes não só para a cóclea e consequentemente para a audição, mas também para outros órgãos e tecidos, conforme eles se tornam mais bem compreendidos. Esse modelo celular é o primeiro grande passo para a compreensão dos efeitos patológicos, morfológicos e funcionais para estas doenças, principalmente quando é muito difícil reproduzir o mesmo defeito genético em modelos animais. Portanto, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas também se torna factível a partir destes modelos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Nosso objetivo foi criar um modelo celular experimental para estudos sobre os mecanismos fisiopatológicos associados à surdez, por meio do estabelecimento de linhagens de células-tronco de pluripotência induzida a partir das células mononucleares do sangue periférico de pacientes com perda auditiva de origem genética.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estabelecer linhagens de iPSC a partir de células obtidas dos indivíduos da família DFNA58 portadores (afetados por PA) e não portadores (normouvintes) da duplicação;
- 2) Caracterizar *in vitro* o estado de pluripotência das linhagens iPSC;
- 3) Confirmar se as iPSC geradas dos pacientes com perda auditiva possuem a mesma duplicação tal qual as células que as originaram;
- 4) Avaliar se o padrão de expressão alterado, dos genes duplicados, observado nas células mononucleares do sangue, está presente nas iPSC.

3. REVISÃO DE LITERATURA

A perda auditiva (PA) é caracterizada pela perda parcial ou total da audição e afeta mais de 466 milhões de pessoas (432 milhões de adultos e 34 milhões de crianças) em todo o mundo (WHO, 2021). É considerado o defeito sensorial mais comum na espécie humana. Estima-se que, até 2050, perto de 2,5 bilhões de pessoas no mundo todo estarão vivendo com algum grau de PA, correspondente a 25% da população (WHO, 2021) o que irá gerar grandes impactos sociais e econômicos, em virtude do prejuízo nas habilidades cognitivas e linguísticas (habilidade de comunicação), bem como no comportamento social e emocional desses indivíduos (GRASEL *et al.*, 2018, BENTO; SOUZA 2019). Estima-se que 60% dos casos de PA tenham etiologia genética e que pelo menos 1% dos genes do genoma humano, correspondendo a cerca de 250 genes, sejam fundamentais para a audição (FRIEDMAN; GRIFFITH, 2003). A PA pode ser classificada em: condutiva, sensorineural e mista, sendo as formas sensorineurais as mais comumente observadas. Na maioria dos casos, a PA sensorineural resulta da morte das células ciliadas e/ou dos neurônios da cóclea, sendo essa uma condição permanente, uma vez que as células cocleares dos mamíferos não têm capacidade regenerativa (DUFNER-ALMEIDA *et al.*, 2019). No entanto, potenciais células quiescentes com capacidade de proliferação e/ou diferenciação limitadas já foram relatadas tanto no gânglio espiral humano adulto (RASK; ANDERSEN *et al.*, 2005) quanto no órgão de Corti (MASSUCCI-BISSOLI *et al.*, 2017; SENN *et al.*, 2020). Por isso, as terapias potenciais em estudo atualmente têm se baseado no transplante de células (diferenciadas ou prontas para diferenciação) ou na ativação dessas células quiescentes cocleares que poderiam vir a substituir as células perdidas (BARBOZA *et al.*, 2016; MAHARAJAN *et al.*, 2021; SENN *et al.*, 2020).

O conhecimento obtido com a descoberta dos genes da surdez revela novas vias biológicas que compõem a complexa estrutura e funcionamento da cóclea, além de apresentar os elementos-chave para a diferenciação das células ciliadas, células de suporte e neurônios auditivos a partir de células-tronco pluripotentes cultivadas. Dando assim conhecimentos fundamentais sobre como manipular as vias para atingir objetivos terapêuticos. Nas últimas duas décadas, houve um grande progresso na identificação de novos genes de surdez, graças aos avanços nas técnicas e análises de sequenciamento de nova geração (VONA *et al.*, 2015). Na verdade, 123 genes associados com PA hereditária não sindrômica já foram identificados por meio de mapeamento genético de genes de surdez segregando em famílias grandes, bem

como devido a modelos animais, especialmente camundongos, que recapitulam PA hereditária humana (VAN CAMP; SMITH 2021; DROR; AVRAHAM, 2010; RICHARDSON; MONVEL; PETIT, 2011). Os genes de surdez revelados por esses estudos codificam proteínas expressas em localizações cocleares variáveis, mas principalmente em células ciliadas internas e seus botões sinápticos, que realizam a mecanotransdução sensorial; células ciliadas externas; células de suporte que reciclam K⁺ e sustentam as células ciliadas fisicamente, além de secretarem fatores para as células ciliadas (WAN *et al.*, 2014); células da estria vascular, responsável pela manutenção do potencial endococlear; neurônios do gânglio espiral. Esses genes desempenham uma ampla variedade de funções para produzir o microambiente e a citoarquitetura elaborada da cóclea, como bombas ou canais iônicos importantes para a manutenção do potencial endococlear, fatores de transcrição, componentes da matriz extracelular (e. Membrana tectorial) e do citoesqueleto, moléculas de sinalização e transporte, receptores, reguladores de proliferação celular, enzimas, componentes de junções celulares entre outros. Assim, o desafio passou a ser não apenas identificar as variantes genéticas causadoras da surdez, mas também comprovar seu efeito patogênico e descrever o mecanismo que leva a PA, além de verificar em qual via fundamental para a audição este gene atua. Esses estudos são essenciais para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas visando o restabelecimento da audição com base no mecanismo molecular e celular da fisiologia auditiva.

Células-tronco (CT) têm a capacidade de se diferenciar em diversos tipos celulares específicos, possuem um grande potencial na regeneração e no reparo tecidual, por essas razões elas vêm sendo utilizadas na medicina como candidatas a tratamentos para diversas doenças. As células-tronco embrionárias (CTe) são as melhores candidatas para estudos relacionados a tratamentos de doenças, pois são pluripotentes e possuem um alto poder de diferenciação. As CTe são encontradas apenas nos embriões na fase de blastocisto. Em virtude das dificuldades éticas acerca da utilização de embriões humanos, surgiu a necessidade de se desenvolver metodologias que pudessem induzir células adultas a um estado pluripotente similar ao embrionário. Assim, as células-tronco de pluripotência induzidas (induced Pluripotent Stem Cells – iPSC) – geradas pela expressão de fatores de transcrição definidos em células somáticas – foram criadas por Takahashi e Yamanaka em 2006 com o objetivo de sanar essas questões.

Dada a heterogeneidade genética da PA, células diferenciadas em células ciliadas e neurônios óticos a partir de iPSC, originadas de células humanas adultas de pacientes,

permitem o estudo de inúmeras vias biológicas que podem se revelar importantes não só para a cóclea e consequentemente para a audição, mas também para outros órgãos e tecidos, conforme eles se tornam mais bem compreendidos. Esse modelo celular é o primeiro grande passo para a compreensão dos efeitos patológicos, morfológicos e funcionais para estas doenças, principalmente quando é muito difícil reproduzir o mesmo defeito genético em modelos animais. Portanto, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas também se torna factível a partir destes modelos.

Figura 1: Representação da orelha humana. A: Divisão do órgão auditivo em orelhas externa, média e interna com secção longitudinal da cóclea, mostrando os três compartimentos (escalas) que a formam e do órgão de Corti e seus principais tipos celulares; B: Neurônios do gânglio espiral que inervam as células ciliadas. Figura modificada de Kramer; Brown 2019: *Audiology: science to practice*; Lang H. 2016: *The Primary Auditory Neurons of the Mammalian Cochlea* e acousticslab.org.

3.1 PERDA AUDITIVA HEREDITÁRIA

A PA pode ser classificada quanto: (i) à idade de manifestação, pré-lingual (antes da aquisição da linguagem verbal) ou pós-lingual, sendo que toda surdez congênita é pré-lingual, mas nem toda surdez pré-lingual é congênita; (ii) ao tipo, sensorineural (resulta de mau funcionamento de estruturas da orelha interna e/ou no nervo vestibulococlear), condutiva (anormalidades da orelha externa e/ou ossículos da orelha média) e mista (combinação da sensorineural com condutiva); (iii) frequências atingidas (graves, médias ou agudas) e; (iv) gravidade, que é classificada conforme o valor da perda em decibéis como leve (26 a 40 dB), moderada (41 a 65 dB), severa (65 a 95 dB) e profunda (acima de 95 dB), o que mostra o quanto a surdez é heterogênea quanto ao quadro clínico (SMITH *et al.*, 1999; WHO, 2021).

A etiologia da surdez inclui fatores ambientais e genéticos. A PA por fatores ambientais pode ocorrer de forma congênita ou se manifestar ao longo da vida. A PA congênita não é necessariamente de origem genética, mas aquela que está presente ao nascimento (SMITH *et al.*, 1999). Fatores ambientais que levam a PA congênita incluem doenças durante a gravidez (como rubéola materna, citomegalovírus, sífilis etc), e o uso de ototóxicos (como por exemplo, antibióticos aminoglicosídeos, medicamentos contra malária), prematuridade entre outras causas (AURELIO *et al.*, 2014; WHO, 2021). Já a PA adquirida ao longo da vida por fatores ambientais pode decorrer também de infecções como meningite e pelo uso de medicamentos ototóxicos (além dos aminoglicosídeos, cisplatina, por exemplo, um quimioterápico), além de otites de repetição, exposição contínua a ruídos intensos, como, por exemplo, no ambiente de trabalho (indústrias, estaleiros, construções, petrolíferas, assim como em motoristas profissionais, bombeiros, militares, aviadores civis, trabalhadores ferroviários, entre outros) ou mesmo uso excessivo de fones de ouvido em volumes altos (LIE *et al.*, 2016; WHO, 2021).

Em países desenvolvidos, a PA, entre 50 a 60% dos casos, apresenta etiologia genética, podendo ser síndrômica ou não-síndrômica em uma contribuição de 30% e 70%, respectivamente (TEKIN *et al.*, 2001). A surdez síndrômica ocorre quando o indivíduo apresenta o distúrbio de audição associado à outras características clínicas. Já foram identificadas mais de 400 síndromes que apresentam surdez como um dos sinais clínicos (TORIELLO; SMITH, 2013). Algumas dessas síndromes mais prevalentes estão descritas na tabela 1.

Tabela 1: Algumas das principais síndromes prevalentes dentre os casos de PA pré-lingual.

Síndrome	Herança	Prevalência na PA pré-lingual	Genes	Principais Achados Clínicos
Pendred (MIM # 274600)	AR	5-10%	<i>SCL26A4</i>	AVA/Mondini, Disfunção vestibular, Bócio.
Usher (MIM # 276900)	AR	3-6%	<i>>10 genes</i>	Retinose Pigmentar, Disfunção vestibular.
Waardenburg tipo I (MIM # 193500)	AD	1-3%	<i>PAX3</i>	Defeitos de pigmentação e dismorfismos faciais.
Waardenburg tipo II (MIM # 193510)	AD		<i>MITF, SNAI2, SOX10</i>	
Waardenburg tipo III ou Klein-Waardenburg (MIM # 148820)	AD ou AR		<i>PAX3</i>	Defeitos de pigmentação e dismorfismos faciais e também malformação dos membros superiores.
Waardenburg tipo IV ou Doença de Waardenbrug-Hirschsprung (MIM # 277580)	AD ou AR		<i>SOX10, EDN3, EDNRB</i>	Defeitos de pigmentação e dismorfismos faciais e também megacolon ganglionico (ou outras manifestações intestinais). Pode ter associado Neuropatia periférica demielinizante, Leucodistrofia demielinizante central.
BOR (MIM# 113650)/ BOS (MIM # 166700)	AD	2%	<i>EYA1, SIX5, SIX1</i>	PA sensorineural, condutiva ou mista; defeitos da orelha, faciais, do palato, branquiais, renais etc. Os defeitos renais podem não estar presentes (BOS).
Alport (# 301050)	Lig.X, AR ou AD	1%	<i>COL4A5, COL4A3, COL4A4</i>	Glomerulonefrite c/ hematúria, anormalidades oculares.
Jervell e Lange-Nielsen (MIM # 220400)	AR		<i>KCNQ1, KCNE1</i>	Episódios de síncope no 2º-3º ano de vida, resultantes de um defeito da condução cardíaca que pode levar à morte súbita. ECG: alargamento da onda T e prolongamento do intervalo QT.

Já foram descritos diversos *loci* associados à PA não-sindrômica, os quais recebem o nome de DFN (do inglês *DeaFNess*), seguido de um número de acordo com a ordem de descoberta (tabela 2). Os *loci* com padrão de herança autossômico dominante são chamados de DFNA; autossômico recessivo DFNB e os que estão no cromossomo X são chamados de DFNX, anteriormente DFN (VAN CAMP; SMITH, 2021). A maioria dos casos de PA genética é decorrente do padrão de herança autossômico recessivo, por isso, grande parte das famílias não apresenta histórico de PA, isto é, constituem casos esporádicos na família (ALFORD *et al.*, 2014). Também já foram descritos genes mitocondriais associados à PA. O mapeamento de genes de surdez em grandes famílias levou ao conhecimento de cerca de 160 *loci* gênicos relacionados à surdez hereditária (VAN CAMP; SMITH, 2021), fornecendo subsídios extraordinários à compreensão da fisiologia da audição e consequentemente a sua perda, a surdez. No entanto, ainda existe um grande número de genes a serem identificados (tabela 2). Até o momento, já foram mapeados 72 *loci* únicos ou regiões cromossômicas

candidatas a conter genes responsáveis por surdez não-sindrômica de herança autossômica dominante. Apenas 51 deles tiveram seus genes identificados. Dentre os *loci* restantes que já foram mapeados, mas que ainda não tiveram seus genes identificados está o *locus* DFNA58. A região cromossômica do *locus* DFNA58 foi mapeada em 2p12-21 por nossa equipe, por meio dos estudos de ligação em uma grande família brasileira com muitos afetados por PA pós-lingual e progressiva (LEZIROVITZ *et al.*, 2009).

Tabela 2: Resumo dos mecanismos de herança da surdez não-sindrômica, os quadros clínicos mais prevalentes, *loci* e genes associados.

Herança	Freq. nos casos hereditários	Tipo do defeito	Idade de Manifestação	Evolução	Nº de <i>loci</i> mapeados	Nº de genes identificados
A. Recessiva	~75%	Sensorineural	pré-lingual	estacionária	99 (DFNB's)	77
A. Dominante	~20%	Sensorineural	pós-lingual	progressiva	72 (DFNA's)	51
Ligada ao X	~1%	sensorineural ou misto	pré e pós-lingual	estacionária/progressiva	6 (DFNX's)	5
Materna/ Mitochondrial	~1%	Sensorineural	variável	progressiva	-----	2
Ligada ao Y	?	Sensorineural	pós-lingual	progressiva	DFNY1?	?

3.2.1 O locus DFNA58 e os seus genes candidatos à surdez

Estudada anteriormente na dissertação de mestrado “Cálculo de Risco em doenças geneticamente heterogêneas: desenvolvimento de método e aplicação no caso de surdez congênita” (BRAGA, 1998), esta família também foi analisada pela Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum durante sua iniciação científica, mestrado “Mapeamento de locos responsáveis por surdez não-sindrômica em famílias brasileiras”, doutorado “Mapeamento de genes em doenças geneticamente heterogêneas: surdez e hemimelia tibial associada à ectrodactilia” e pós-doutorado “Identificação de novo gene de surdez: estudos funcionais dos genes candidatos ao locus DFNA58”.

Em estudos de projetos anteriores a este foram realizados testes com o DNA obtido dos indivíduos desta família que excluíram a presença das causas mais frequentes de surdez, as mutações c.35delG e c.167delT no gene *GJB2* (associada à surdez autossômica recessiva) as deleções $\Delta(GJB6-D13S1830)$ e $\Delta(GJB6-D13S1854)$ no gene *GJB6* e a variante patogênica mitocondrial A1555G no gene 12S rRNA.

O estudo de ligação dos primeiros 34 indivíduos estudados permitiu a equipe mapear um novo *locus* de surdez, o DFNA58 publicado no trabalho de Lezirovitz *et al.*, 2009. Desde a publicação deste mapeamento, a equipe continuou a investigação em busca do gene responsável pela perda auditiva, contido na região cromossômica do DFNA58, que culminou com a publicação Lezirovitz *et al.* (2020). Assim, após o mapeamento, a região cromossômica candidata mapeada foi refinada, de 30cM para 3cM (entre os microssatélites D2S2368 e D2S443, Cr2: 61,342,721-70,661,255), por meio da análise dos haplótipos de marcadores moleculares do tipo microssatélites, que foram recombinantes em amostras de três pacientes dos quais foi obtida a confirmação clínica de que eram ouvintes. Para identificar a alteração genética associada à surdez na família, foi realizada análise por WES (*Whole Exome Sequence* – Sequenciamento Completo de Exoma) em amostra de DNA de um afetado, que detectou uma duplicação de cerca de 200Kb dentro da região cromossômica candidata mapeada (2p14-p13.3), que inclui dois genes codificadores de proteína inteiros (*PLEK* e *CNRIP1*) e parcialmente, mais um gene, *PPP3R1*, além disso, outros genes menos caracterizados mapeados dentro do segmento de duplicação: parte (exons 1 e 2) de um gene não caracterizado que codifica uma nova proteína (*AC017083.3*) e quatro genes lncRNA (RNA longo não codificante) previstos, não caracterizados: *AC017083.1*, *LOC107985892*, *LOC102724389* e *LOC101927723 / AC01592069.1-201*. Essa duplicação foi confirmada por meio de array-CGH (*Comparative Genome Hybridization*) em amostras de dois afetados, por SNParray e qPCR (figura 2). Um painel MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) personalizado de dez sondas (sete localizadas dentro da região duplicada e três fora da duplicação) demonstrou a co-segregação desta duplicação nos 20 indivíduos afetados. Essa co-segregação não foi observada em nenhum dos três casos suspeitos de fenocopia, e nem nos 21 membros da família não afetados (quatro desses com idade média abaixo do início da manifestação da PA) além de três cônjuges não aparentados (figura 3) e também em outros estudos.

Figura 2: Esquema da região cromossômica da duplicação mostrando a localização das sondas MLPA e a extensão da duplicação de acordo com os diferentes métodos e combinando todos [NC_000002.12: g. (68 247 572_68 248 077) _ (68 449 525_68 452 166) dup]. GRCh38 como o conjunto do genoma de referência. Ambos os pontos de interrupção (regiões BK breakpoints- breakpoints) e dentro de elementos repetitivos. Foram observados no sangue dos portadores da duplicação superexpressão dos genes circundados. Modificada de LEZIROVITZ *et al.*, (2020).

Figura 3: Heredograma da família DFNA58, os pontos de interrogação indicam as pessoas sem queixas de PA, das quais não temos exames clínicos e que estão abaixo da idade máxima de manifestação da PA observada na família. DUP e ND indicam respectivamente, presença e ausência da duplicação, sendo que em todos os casos, a duplicação encontra-se em heterozigose. Os sinais de + e - dentro do retângulo cinza indicam respectivamente, a superexpressão e a expressão normal dos genes *CNRIPI*, *LOC107985892* e *LOC102724389* observadas por RT-qPCR, respectivamente de cima para baixo, nas células mononucleares obtidas a partir do sangue dos pacientes.

Para testar se um ou mais dos genes codificadores de proteínas duplicados e genes de RNA longos não codificadores teriam seus níveis de expressão alterados nos portadores de duplicação, foi realizado RT-qPCR. A expressão do RNA de cada um dos três genes codificadores de proteínas foi previamente detectada em células presentes no sangue e foi possível detectar sua presença em familiares não portadores, no entanto, em todos os 14 portadores da duplicação, encontramos uma suprarregulação seletiva de RNAm apenas para *CNRIP1* (média de todos os portadores = ~ 27,7X) não detectado em 14 não portadores, sendo oito membros não afetados da família e seis controles não relacionados (figura 4). Também foram avaliados, os padrões de expressão de RNAm dos quatro outros genes lncRNA não caracterizados (*LOC107985892*, *LOC102724389*, *AC017083.1* e *LOC101927723*) e dois genes codificadores de proteínas localizados perto da região mais provável de inserção de duplicação (*WDR92* e *PN01*). Para dois dos genes lncRNA, *LOC107985892* e *LOC102724389*, foi observada uma superexpressão significativa, 4,51X e 16,93X, respectivamente, nos portadores de duplicação, mas não nos não portadores, tanto olhando as médias quanto cada indivíduo para os três genes (*CNRIP1*, *LOC107985892* e *LOC102724389*). O lncRNA *AC017083.1* também apresentou superexpressão significativa da média dos níveis de RNAm de portadores, mas não em não portadores, porém em níveis mais baixos (1,42X) quando comparado aos outros dois genes lncRNA descritos anteriormente. A expressão de *LOC101927723* não diferiu entre portadores e não portadores.

Figura 4: (A – C) Resultados de RT-qPCR mostrando níveis de RNAm no sangue em portadores de duplicação (média de pelo menos 10 indivíduos, em preto) e não portadores (média de pelo menos oito sujeitos, em branco) dos genes envolvidos na duplicação ou próximos à provável posição da sua inserção: A) genes envolvidos na duplicação: *PPP3R1* (exon 1), *CNRIP1* (todos os transcritos), *PLEK* (transcrito codificador de proteína e transcrito de íntron retido) e *PPP3R1* (expressão geral de todos os transcritos). B) os níveis de RNAm de *PNO1* e *WDR92*, dois genes vizinhos da provável posição da inserção da duplicação. C) níveis de RNAm de genes lncRNA não caracterizados contidos dentro do segmento de duplicação: *LOC101927723*, *AC017083.1*, *LOC102724389* e *LOC107985892*. Os gráficos que mostram genes que são ligeiramente superexpressos (1,2-1,8X) foram indicados por uma borda de linha única: *PLEK* (transcrito de codificador de proteína), *PPP3R1* (exon 1 de todos os três transcritos) e *AC017083.1* (gene lncRNA). Gráficos mostrando genes que foram altamente superexpressos (4-27X) comparação de portadores vs não portadores foram indicados por borda de linha dupla: *CNRIP1*, *LOC102724389* e *LOC107985892*. D) Possíveis posições de inserção do segmento duplicado (?). O tamanho do segmento duplicado é indicado pela borda de linha dupla. Dependendo da posição de inserção, o novo gene *AC017083.3* pode ou não pode ser interrompido. Exemplos dos transcritos de fusão de baixa abundância *CNRIP1-PPP3R1* encontrados nos transportadores de duplicação são mostrados abaixo. Modificada de LEZIROVITZ *et al.* (2020).

Uma vez que transcritos de fusão entre os genes *PPP3R1* e *CNRIP1*, identificados pela técnica de RNA-seq, foram descritos tanto em tecido de adenocarcinoma de pulmão quanto em tecido adjacente não envolvido em câncer (GALVAN *et al.*, 2013), foi verificada a presença ou não de transcritos de fusão entre *PPP3R1* e *CNRIP1* nos portadores da duplicação, não apresentados pelos não portadores. De fato, transcritos pouco abundantes envolvendo a fusão de sequências de *PPP3R1* e *CNRIP1* foram amplificados em todos os portadores da duplicação por meio de RT-PCR, usando um primer *forward* nos exons 1 ou 2 de *PPP3R1* e um primer *reverse* no exon 2 do *CNRIP1*. Esses transcritos não foram detectados no cDNA de não portadores. O sequenciamento de Sanger revelou que esses transcritos não eram idênticos em todos os portadores da duplicação, ainda foi observado que o cDNA de alguns portadores amplificava dois ou mais transcritos diferentes quanto à composição dos exons dos seus respectivos genes, ou seja, independentemente do tamanho ou composição desses transcritos de fusão, eles incluem partes das sequências exônicas de *CNRIP1* e *PPP3R1*. Além disso, na maioria dos casos, as sequências *CNRIP1* e *PPP3R1* estavam intercaladas por uma sequência intergênica distante 1,6 Kb de 5' de *CNRIP1* e 44,4 Kb distante à 3' de *PLEK*. A formação desses transcritos de fusão entre sequências de dois genes e a orientação dos primers usados para sua amplificação permitiu concluir que a posição mais provável da duplicação está em 3' a jusante da localização da cópia selvagem do *PPP3R1*. Consequentemente, a duplicação não está inserida em qualquer um dos pontos de quebra definidos por suas bordas, nesse caso dentro do intron 1 de *PPP3R1* ou intergênico entre *PLEK* e *FBXO48*. De fato, os dados da análise de ligação indicaram uma região mais a 3' de *PPP3R1* como sendo a posição mais provável para a variante patogênica causal da perda auditiva. Dada a mais provável posição de inserção da duplicação, também foi verificado, com resultados negativos, transcritos de fusão relativos ao exon 1 de *PPP3R1* e sequências codificadoras dos genes vizinhos a 3' de *PPP3R1*, *WDR92* e *PNOL*.

Os resultados de hibridização *in situ* (HIS), em colaboração com o pesquisador Nicolas Grillet da Universidade de Stanford (EUA), demonstraram uma expressão robusta de RNAm de *Cnrip1* em neurônios do gânglio espiral e uma expressão mais fraca nas células das bordas timpânicas na cóclea de camundongos P7 (sete dias de vida). A expressão do RNAm do *Plek* estava abaixo do nível de detecção da HIS na orelha interna em camundongos P7, mas foi detectada no gânglio da raiz dorsal. A expressão do *Ppp3r1* foi detectada nas células pilares e com baixa intensidade nos neurônios do gânglio espiral em P7. Nesta idade, a expressão de RNAm desses genes não foi detectada nas células ciliadas da cóclea. No início

da vida adulta (de P21 a P35) todos os três genes (*Cnrip1*, *Ppp3r1* e *Plek*) apresentaram expressão no órgão de Corti, embora mais fraca ou difusa, e nos neurônios do gânglio espiral mais expressiva. Além disso, a expressão de *Plek* também foi observada nos fibrócitos do limbo espiral e de *Ppp3r1* nos fibrócitos do ligamento espiral.

A expressão de proteínas desses genes também foi analisada por meio de imunofluorescência indireta em camundongos, realizada em colaboração com o pesquisador Daniel J Jagger do Colégio Universitário de Londres (RU). No início da idade adulta (P21-P35), a expressão de *Cnrip1* foi evidente nos corpos das células dos neurônios do gânglio espiral e de seus neuritos, tanto nos que estendem em direção ao órgão de Corti quanto naqueles que se estendem em direção ao tronco cerebral. Uma expressão mais fraca foi observada nas células de suporte do órgão de Corti. Além disso, a imunofluorescência do *Cnrip1* apareceu relativamente mais forte em um subconjunto de neurônios do gânglio espiral que se situam ao redor da borda do gânglio. A co-marcação com o anticorpo anti-periferina confirmou sua identidade celular como sendo neurônios aferentes tipo II do gânglio espiral que inervam as células ciliadas externas. No início da idade adulta, o anticorpo *Plek* marcou fortemente os fibrócitos que revestiam a face perilinfática do limbo espiral ósseo, e mostrou uma fluorescência difusa nas células da estria vascular e do órgão de Corti. Os corpos celulares dos neurônios do gânglio espiral também foram marcados de forma distinta. Em relação ao anticorpo disponível comercialmente para identificação da proteína *Ppp3r1*, foi verificado por meio de ferramentas de alinhamento para avaliar similaridade entre sequências, que poderia reconhecer dois produtos gênicos murinos, *Pp3r1* e *Pp3r2*. Por isso, a investigação de *Ppp3r1* por imunofluorescência não pôde ser realizada. Desse modo, uma vez que expressão dos três genes codificadores de proteínas pôde ser localizada na cóclea, bem como na via neuronal aferente primária, todos os três genes podem desempenhar um papel importante na orelha interna (LEZIROVITZ *et al.*, 2020).

Com base nesses resultados de expressão gênica, observados no modelo animal e nos pacientes da família, foi formulada a hipótese de que um dos três genes duplicados teria baixa expressão na idade adulta em condições fisiológicas normais e sua superexpressão, devida à duplicação, levaria a PA de manifestação tardia no indivíduo adulto, ou ainda essa superexpressão seria prejudicial de maneira cumulativa somente na idade adulta, dado que a PA na família é progressiva e se manifestou entre a infância e os 33 anos de idade (média de 19 anos de idade). Os dados clínicos provenientes dos exames audiológicos, como PEATE (Potenciais Evocados Auditivos De Tronco Encefálico), DPOAE (Emissões Otoacústicas por

produto de Distorção, do inglês *Distortion Product Otoacoustic Emissions*) e Audiometria tonal, indicam que o defeito primário subjacente à PA no DFNA58 reside na cóclea.

Apesar desses resultados animadores que apontam o gene *CNRIP1* como melhor candidato, os outros genes tanto codificadores quanto não codificadores, também mostraram resultados promissores, além de o fato de terem sido evidenciados transcritos de fusão que poderiam ter uma função ainda desconhecida na cóclea. Além disso, não podemos excluir a possibilidade de um padrão de expressão gênica diferente na cóclea humana em relação ao que foi encontrado no sangue. Seria inclusive possível que um padrão complexo em que mais de um gene envolvido na duplicação esteja com padrão de expressão alterado levando a perda auditiva.

Em virtude da inacessibilidade da cóclea humana e a dificuldade em reproduzir a exata alteração genética (duplicação) em modelos animais, a estratégia de se criar um modelo celular, a partir das células dos pacientes portadores da duplicação e diferenciá-las nos principais tipos celulares da cóclea, representa uma poderosa estratégia para recapitular a fisiopatologia da PA no DFNA58. Com isso, contribuir para revelar uma via biológica na audição de manifestação na idade adulta, que possa servir de base para desenvolver novas abordagens terapêuticas visando restaurar a audição ou prevenir a progressão da perda, não só desta forma de perda auditiva, mas de outras de manifestação tardia ou até mesmo a perda auditiva relacionada ao envelhecimento.

3.3 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO (CT)

As CT são células primárias encontradas em todos os organismos multicelulares. Elas possuem o potencial de se diferenciar em uma vasta gama de células especializadas e são consideradas progenitoras de mais de 200 tipos celulares presentes nos indivíduos adultos (AVASTHI *et al.*, 2008).

Com base na sua capacidade de diferenciação, as CT podem ser subdivididas em: (i) Totipotente, que possui a habilidade de se diferenciar em todos os tipos celulares e tecidos, tanto embrionários quanto extraembrionários, sendo que apenas o zigoto e as células após a primeira divisão celular são classificados como tal, uma vez que são as células capazes de originar um indivíduo completo (CONDIC, 2013; KALRA; TOMAR, 2014; KOLIOS; MOODLEY, 2013); (ii) Pluripotente ou Multipotente, que possui a habilidade de originar quase todos os tipos celulares e se diferenciar em quase todos os tecidos humanos, porém não possuem a capacidade de originar os tecidos extraembrionários (TESAR, 2016; KALRA;

TOMAR, 2014); (iii) Oligopotente, células que são capazes de se diferenciar em poucos tipos celulares e; (iv) Unipotente, células capazes de se diferenciar em apenas um tipo celular (KALRA; TOMAR, 2014). Existe ainda a classificação quanto a sua natureza: embrionárias e adultas.

As CTe são encontradas apenas nos embriões na fase de blastocisto (estágio de desenvolvimento anterior à implantação no útero) e são classificadas como pluripotentes, pois possuem um alto poder de diferenciação, tendo capacidade de originar os três folhetos embrionários, isto é, endoderme, ectoderme e mesoderme (AVASTHI *et al.*, 2008).

As células-tronco adultas (CTa) são células encontradas em diversos tecidos após o desenvolvimento embrionário, como, por exemplo, medula óssea, sangue, fígado, cordão umbilical, placenta, polpa de dente decíduo etc. Ao contrário das CTe que tem função de originar os tecidos, as CTa atuam na manutenção celular, por meio da reposição de células mortas e regeneração dos tecidos lesionados (KALRA; TOMAR, 2014).

3.4 HISTÓRICO DAS CÉLULAS-TRONCO

A trajetória dos estudos com CT tem início no séc. XIX com a descoberta que as células eram à base da vida e que algumas delas eram capazes de originar outros tipos celulares (CHAUDHARY, 2015). O desenvolvimento de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) em 2006 por Shinya Yamanaka foi um grande avanço, possível graças a muitos achados de pesquisadores anteriores que estudavam CT. Aqui, temos uma breve visão geral dos principais marcos históricos que levaram a descoberta das iPSC derivadas de modelos animais e, eventualmente, as linhagens de células-tronco pluripotência induzida humanas (iPSC_h), cuja linha do tempo pode ser vista na figura 5.

Devido à facilidade de obtenção, as CT hematopoiéticas foram as primeiras a serem estudadas, tendo como exemplo o estudo realizado por Jacobson *et al.* em 1951. Os pesquisadores injetaram, por via intravenosa, células da medula óssea de camundongos normais adultos em camundongos submetidos à radiação. Observaram que as células injetadas reestabeleceram a produção das células sanguíneas em substituição ao sistema destruído. Em 1959 Thomas *et al.*, foram os pioneiros na utilização do transplante de medula óssea. O transplante foi realizado entre irmãs gêmeas idênticas e após esse tratamento, apesar de não ter ocorrido a cura, foi observado que as células da doadora saudável foram capazes de produzir células sanguíneas novas e re-popular a medula óssea da receptora, o que levou a remissão da doença. Esses estudos levaram ao conhecimento sobre a existência das CT à

comunidade científica, o que resultou em um grande avanço acerca do seu uso na medicina regenerativa.

Em 1962, John Gurdon foi o pioneiro na Abordagem de transferência nuclear de células somáticas (*somatic cell nuclear transfer* – SCNT). A técnica permitiu que ele alcançasse o primeiro exemplo de reprogramação celular, pois mostrou que os núcleos oriundos de uma célula somática epitelial de *Xenopus laevis* quando transferido para um óvulo enucleado, poderiam produzir um indivíduo viável.

Já em 1981, dois grupos de pesquisadores diferentes foram responsáveis pelo marco da descoberta das CTe de camundongo (EVANS; KAUFMAN 1981; MARTIN 1981). Os experimentos realizados por Evans & Kaufman e Martin mostraram que as CTe eram provenientes da massa celular interna de blastocistos e que essas células eram capazes de gerar qualquer tipo de célula no corpo, característica esta denominada de pluripotência. Estas descobertas foram o início para o entendimento sobre as condições ideais de cultivo *in vitro* e a existência de fatores de transcrição necessários para a manutenção de pluripotência.

Em 1995, Thomson *et al.* geraram a primeira linhagem de CTe a partir do embrião pré-implantado, na fase de blastocisto, de uma *Rhesus monkey* de 15 anos. Eles coletaram a massa celular interna do blastocisto e colocaram em cultura e observaram que essas células permaneceram indiferenciadas e que apresentavam capacidade de proliferação mesmo após um ano de cultivo *in vitro*, além de possuírem o potencial para se diferenciar nos folhetos embrionários.

Por algumas décadas a capacidade de diferenciação das CT foi estudada apenas em modelos de cultivo *in vitro*. Somente após 35 anos da descoberta da técnica de SCNT por John Gurdon, que Ian Wilmut e sua equipe utilizaram a mesma estratégia de reprogramação celular na clonagem da ovelha Dolly, o primeiro mamífero a ser gerado por clonagem somática (CAMPBELL *et al.*, 1997). Os trabalhos de Gurdon e Wilmut no campo da clonagem somática provaram que os núcleos das células somáticas diferenciadas contêm as informações genéticas necessárias para gerar um organismo inteiro e que o óvulo contém os fatores necessários para realizar esta reprogramação (OMOLE; FAKOYA, 2018).

Em 1998, na Universidade de Wisconsin, foi desenvolvida a primeira linhagem de CTe humanas (THOMSON *et al.*, 1998). Para isso, os pesquisadores utilizaram embriões nos primeiros estágios de clivagem que foram produzidos por fertilização *in vitro* e doados para fins de pesquisa clínica. Esses embriões foram cultivados até o estágio de blastocisto e então tiveram a sua massa celular interna isolada, o que resultou em cinco linhagens de CTe obtidas

a partir de cinco embriões diferentes. As linhagens possuíam cariótipo normal, permaneceram indiferenciadas e continuaram a se proliferar por 4 a 5 meses *in vitro* e, além disso, possuíam potencial para se diferenciar nos folhetos embrionários.

Devido a alta capacidade de diferenciação das CTe, Thomson *et al.* (1998) sugeriram que as doenças que resultam na morte ou disfunção de apenas um ou alguns tipos de células, como a doença de Parkinson e diabetes mellitus de início juvenil, poderiam se beneficiar da substituição das células degeneradas por outras saudáveis, nesse caso as CT, em um tratamento ao longo da vida. Mas, para isso, estratégias de prevenção à rejeição imunológica das células transplantadas precisariam ser desenvolvidas. Como as CTe apresentavam uma série de dificuldades éticas acerca da utilização de embriões humanos, para sanar essas questões éticas e ao mesmo tempo realizar estudos relacionados à rejeição dos tecidos, a estratégia de reprogramação induzida de células somáticas passou a ser empregada. O objetivo desta reprogramação é induzir células somáticas dos próprios pacientes a um estado pluripotente similar ao embrionário.

Até então o único método utilizado com sucesso para reprogramação de células somáticas foi o SCNT pelo pioneiro da técnica John Gurdon (1962) e posteriormente por Ian Wilmut (CAMPBELL *et al.*, 1997). Em 2006, Shinya Yamanaka e Kazutoshi Takahashi desenvolveram a primeira linhagem de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) a partir de células somáticas (fibroblastos de camundongo). Por meio de um método diferente de reprogramação que consiste no uso de um vetor retroviral para introduzir uma combinação de quatro fatores de transcrição diferentes que incluem: Oct 3/4 (*Octamer-binding transcription factor-3/4*), Sox2 (*Sex-determining region Y*)-box 2, Klf4 (*Kruppel Like Factor-4*) e c-MYC (*MYC Proto-Oncogene*), que ficaram conhecidos como fatores OSKM (as siglas são referentes à primeira letra do nome de cada gene) ou de Fatores Yamanaka (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). As iPSC apresentam grandes similaridades com as CTe, que inclui alta taxa de proliferação celular e habilidade de se diferenciar em diversos tecidos provenientes dos três folhetos embrionários, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Logo em seguida, em 2007, a equipe de Yamanaka aplicou o mesmo método de reprogramação em fibroblastos humanos e assim geraram com sucesso as primeiras iPSC humanas (TAKAHASHI *et al.*, 2007). No mesmo ano, o grupo de James Thomson também relatou a geração de uma linhagem de iPSC, porém o método de reprogramação utilizado foi diferente. Thomson utilizou o lentivírus e um conjunto diferente

de fatores: Oct 3/4, Sox2, Nanog (Nanog Homeobox) e Lin 28 (Lin-28 Homolog A) [YU *et al.*, 2007].

A tecnologia iPSC é uma grande promessa para terapia celular personalizada, desenvolvimento de modelos de estudos de doenças humanas e para triagem de medicamentos. Devido às descobertas revolucionárias, em 2012, dois cientistas: um japonês, Shinya Yamanaka, e outro britânico, John Gurdon, foram laureados com o prêmio Nobel de medicina, por terem conseguido pela primeira vez obter CT pluripotentes sem utilizar embriões (GURDON; YAMANAKA, 2012).

Figura 5: Linha do tempo histórica com a descrição dos principais eventos que levaram à geração das linhagens de células-tronco de pluripotente induzida (iPSC). SCNT – *Somatic cell nuclear transfer*, OSKM – Oct 3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc, OSNL – Oct 3/4, Sox2, Nanog e Lin28. Adaptado de OMOLE; FAKOYA 2018.

3.5 CÉLULAS-TRONCO DE PLURIPOTÊNCIA INDUZIDA – iPSC

No método de reprogramação celular descrito pela primeira vez por Takahashi e Yamanaka em 2006, com a finalidade de entender a influência de fatores de transcrição específicos na reprogramação celular, os pesquisadores desenvolveram um ensaio para identificar o papel da expressão gênica na indução da pluripotência em células somáticas por

meio da resistência ao G418 (Geneticina, antibiótico aminoglicosídeo que possui estrutura similar à gentamicina B1). Vinte e quatro genes foram selecionados devido a sua presença no início do desenvolvimento embrionário e na manutenção da pluripotência das CT (*Ecat1*, *Dppa5*, *Fbxo15*, *Nanog*, *Eras*, *Dnmt3l*, *Ecat8*, *Gdf3*, *Sox15*, *Dppa4*, *Dppa2*, *Fthl17*, *Sall4*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Rex1*, *Utf1*, *Tcl1*, *Dppa3*, *Klf4*, β -catenin, *c-Myc*, *Stat3* e *Grb2*) para serem expressos individualmente por meio da técnica de transdução viral em placas revestidas por fibroblastos embrionários de camundongos (MEFs, do inglês *Mouse Embryonic Fibroblasts*), cultivadas em meio celular ES (do inglês *Essential Medium*) contendo G418. No entanto, neste experimento, não houve formação de colônias celulares resistentes, indicando que apenas um fator de transcrição não era suficiente para ativar a pluripotência. Desse modo, os 24 genes foram transduzidos e expressos juntos, o que resultou em 22 colônias resistentes a G418. Ainda, para determinar qual dos genes era crucial para a indução da pluripotência, foram realizados novos testes, mas com os fatores de transcrição em diferentes combinações, chegando assim aos quatro genes *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* e *C-Myc*, que foram denominados de fatores OSKM.

Diversos estudos foram publicados desde então confirmando a reprodutibilidade da indução de pluripotência em células somáticas humanas (adipócitos, linfócitos, queratinócitos, fibroblastos, células progenitoras da urina, dentre outras) e murinas por meio da transdução dos vetores virais contendo os genes OSKM (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; OKITA *et al.*; 2007; TAKAHASHI *et al.*, 2007; WERNIG *et al.*, 2007; PARK *et al.*, 2008), expressando os genes *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG* e *LIN28* (YU *et al.*, 2007) ou expressando alguns destes fatores, como *OCT3/4*, *SOX2* e *KLF4* (NAKAGAWA *et al.*, 2008). Atualmente já foram produzidas iPSC de diversos animais, sendo exemplos: homem, camundongo (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2007), primata *Rhesus* (LIU *et al.*, 2008), porco (ESTEBAN *et al.*, 2009) e boi (SUMER *et al.*, 2011).

Assim como as CTe, as iPSC apresentam alta taxa de proliferação celular e habilidade de se diferenciar em diversos tecidos provenientes dos três folhetos embrionários, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Dentre as vantagens na utilização das iPSC podemos destacar: (i) a relativa facilidade de obtenção e acessibilidade das células cuja pluripotência será induzida, quando comparada a outras CTa multipotentes; (ii) capacidade de originar células ou tecidos dos três folhetos embrionários e (iii) a sua utilização como modelo celular para estudos funcionais e terapêuticos por meio do estabelecimento de linhagens de iPSC a partir de células de pacientes com diferentes doenças.

Já das desvantagens se destacam: (i) a possibilidade de que a memória de seu antigo fenótipo permaneça, o que pode limitar seu potencial de diferenciação; (ii) o fato de que as iPSC indiferenciadas residuais nos locais alvo podem se proliferar incontrolavelmente formando teratomas (tumores contendo uma variedade de tecidos originários dos três folhetos embrionários após o transplante subcutâneo destas células em camundongos), (iii) possível presença de aberrações cromossômicas e (iv) os vírus que se integram no genoma da célula hospedeira apresentam riscos intrínsecos em relação à transformação celular, porém atualmente, existem técnicas cuja integração não é um problema, pois no lugar de se utilizar retrovírus, podem ser utilizados com sucesso os plasmídeos episomais. Porém, apesar de o uso ser vantajoso é fundamental ter cautela na sua utilização (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; YU *et al.*, 2007; NAKAGAWA *et al.*, 2008; AMABILE *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010; POLO *et al.*, 2010; OTSU *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015).

3.6 O PAPEL DOS FATORES DE REPROGRAMAÇÃO (Oct4/Sox2/Klf4/L-myc/Lin28) NA MANUTENÇÃO E REESTABELECIMENTO DA PLURIPOTÊNCIA

Durante a embriogênese dos mamíferos, a partir do momento em que as células do primeiro estágio de desenvolvimento iniciam sua diferenciação em linhagens celulares distintas, elas perdem gradualmente seu potencial de pluripotência. No entanto, apesar de o estado de pluripotência *in vivo* ser transiente, *in vitro* as CTe mantêm essa capacidade indefinidamente (SHI; JIN 2010).

Fatores de transcrição são proteínas que controlam a ativação e a desativação dos genes, por meio de sua ligação a regiões reguladoras (sequência regulatória, uma região do cromossomo que controla a expressão gênica) do genoma, ou seja, eles atuam no controle da expressão gênica (LATCHMAN, 1997; SANCHEZ; SHARMA, 2009). A seguir, discutiremos o papel que cada um dos fatores OSKM desempenha na manutenção e no reestabelecimento da pluripotência.

Em humanos, o *OCT4* (*octamer-binding transcription factor 4*) também conhecido como *POU5F1* (*POU domain, class 5, transcription factor 1*) é codificado pelo gene *POU5F1* (ZEINEDDINE *et al.*, 2014). Durante o desenvolvimento embrionário, é altamente expresso nas CTe, sendo necessário para a manutenção da pluripotência na massa celular interna (MCI) e no epiblasto (camada de células superior a blastocelo). Já foi observado *in vitro* que a sua superexpressão induz à diferenciação das CTe em células da linhagem

endodérmica extraembrionária (NIWA *et al.*, 2000). Os estudos funcionais com CTe humanas de Martin *et al.*, (2004), Hay *et al.*, (2004) e Zaehres *et al.*, (2005) mostram que o Oct4 é de suma importância para o processo de autorenovação e manutenção do estado de pluripotência das células. Nesses trabalhos, por meio da técnica de RNA de interferência (RNAi), os pesquisadores demonstraram que além da redução da expressão do Oct4 estar associada a redução de marcadores presentes nas CTe (SSEA1, SSEA3, e TRA-1-60), também induz a diferenciação destas células em linhagens trofoectodérmica e endodérmica.

O Sox2, também conhecido como Sry (*sex determining region Y box 2*) pertence a família Sox, sendo em humanos codificado pelo gene de mesmo nome, *SOX2*. Apresenta alta expressão durante o desenvolvimento embrionário, sendo essencial no período peri-implantacional e de formação do trofoblasto. Assim como Oct4, é expresso na MCI do blastocisto e no epiblasto e, desempenha um papel importante na diferenciação da ectoderme extraembrionária, tecidos neurais, endoderme intestinal, esôfago e traqueia (AVILION *et al.*, 2003; WILLIAMSON *et al.*, 2006; WOOD; EPISKOPOU, 1999). Para determinar o papel de Sox2 no reestabelecimento da pluripotência, Fong *et al.* (2008) reduziram a expressão desse gene *in vitro* em CTe, por meio da técnica de RNAi, e observaram a perda do estado indiferenciado dessas células. Adicionalmente, os autores demonstraram que o *knockdown* resulta na redução de expressão de Oct4 e Nanog, o que sugere que esses fatores estão juntos em uma mesma rede regulatória.

A proteína Lin28, ao contrário de outros fatores de reprogramação, não é considerada como um fator de transcrição propriamente dito, mas uma proteína de ligação ao RNA. É altamente expressa durante a embriogênese e ausente na maioria dos tecidos adultos. O *let-7* miRNA (RNA endógeno pequeno, com cerca de 22 nucleotídeos, que atua como silenciador pós-transcricional) atua como um supressor de tumor, e sua perda tem sido associada à oncogênese (JOHNSON *et al.*, 2005; TAKAMIZAWA *et al.*, 2004). Lin28 se liga ao precursor de *let-7*, reprimindo o seu processo de maturação. O miRNA *let 7* está ausente ou presente em baixas quantidades em CT e células progenitoras, sugerindo que sua repressão é importante para estabelecer o estado pluripotente (VISWANATHAN; DALEY, 2010; NISHINO *et al.*, 2008; MOSS *et al.*, 1997).

Relacionados à oncogênese, os fatores de transcrição C-Myc e Klf4 têm a capacidade de acelerar o processo de proliferação celular (JAENISCH; YOUNG, 2008), por essa razão, a possibilidade do aparecimento de tumores durante todo o processo, não pode ser descartada, visto que já foi demonstrado, após a injeção subcutânea de células iPSC em camundongos,

que a alta capacidade proliferativa induz a ocorrência de teratomas (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

Em CTe, a expressão ectópica de MYC restaura a pluripotência, a exclusão de Myc, desestabiliza o estado de pluripotência, resultando na diferenciação das células em endoderme e mesoderme (SMITH *et al.*, 2010; VARLAKHANOVA *et al.*, 2010). Não usar C-Myc tem desvantagens em relação ao estabelecimento de células iPSC seguras, Nakagawa *et al.*, (2010) resolveram esse dilema substituindo C-Myc por L-Myc, o que melhorou a eficiência do estabelecimento de iPSC sem maiores riscos de tumorigenicidade.

CTe com superexpressão de Klf4 apresentam grande capacidade para a autorrenovação com base na formação de corpos embrióides (EB, do inglês, *embryonic bodies*). EB expressaram níveis mais altos de Oct4, suportando a hipótese de que Klf4 regula a autorrenovação de células ES (Li *et al.*, 2005). A fim de identificar fatores adicionais que pudessem estabelecer iPSC, Nakagawa *et al.*, (2008) substituiu os diferentes fatores usados na reprogramação por seus respectivos homólogos. Foi relatado o estabelecimento bem-sucedido de iPSC após a substituição de Klf2 por Klf4 ou L-Myc por C-Myc. Nenhuma iPSC foi estabelecida na ausência de Klf4. Posteriormente, foi comprovado que Oct4 e Klf4 são requisitos essenciais para reprogramação de células somáticas (DI STEFANO *et al.*, 2008; SHI *et al.*, 2008).

3.7 MÉTODOS UTILIZADOS PARA TRANSFEÇÃO

A transfecção é o procedimento que visa introduzir materiais genéticos (DNAs e RNAs) nas células para produzir células geneticamente modificadas. Os materiais genéticos introduzidos existem nas células de forma integrativa ou não integrativa, dependendo da natureza desse material (RECILLAS-TARGA, 2006). Além disso, os métodos de reprogramação podem ser agrupados em duas categorias: (i) sistemas integrativos, que envolvem a integração de material genético exógeno no genoma do hospedeiro e, (ii) sistemas não integrativos, que não envolvem a integração de material genético no genoma do hospedeiro. Os métodos integrativos incluem o uso de vetores virais (retrovírus, lentivírus e lentivírus indutíveis) e vetores não virais (fragmentos de DNA linear / plasmídeo). Os métodos não integrativos incluem o uso de vetores virais (adenovírus e vírus Sendai) e vetores não virais (vetores episômicos de DNA) (OMOLE; FAKOYA 2018).

Os retrovírus foram usados nos experimentos pioneiros da geração de iPSC, para introduzir na célula os fatores de transcrição para indução da pluripotência (TAKAHASHI;

YAMANAKA, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2007; WERNIG *et al.*, 2007; OKITA *et al.*, 2007; MAHERALI *et al.*, 2007). O estudo desenvolvido por Yamanaka envolveu o uso de diferentes vetores, em especial o retrovírus, cada um contendo apenas um tipo de fator de transcrição. Os retrovírus são uma forma eficiente de transfecção, pois requer apenas uma célula somática em divisão ativa para se integrar ao genoma.

Embora vetores retrovirais sejam usualmente silenciados em CTe (JAHNER *et al.*, 1982; STEWART *et al.*, 1982) e iPSC (PARK *et al.*, 2008; NAKAGAWA *et al.*, 2008), o silenciamento nem sempre é eficiente e podem ser reativados mais tarde. Eles podem se integrar aleatoriamente no genoma do hospedeiro e gerar um aumento do risco de mutagênese insercional (OKITA *et al.*, 2007).

O lentivírus também tem sido usado com sucesso para a introdução de transgenes (gene ou material genético transferido entre dois organismos) durante a reprogramação celular (YU *et al.*, 2007; BLELLOCH *et al.*, 2007). Como os outros vetores retrovirais, o lentivírus integra-se ao genoma do hospedeiro com o risco de mutagênese insercional, sendo possível a reativação ineficiente de silenciamento entre transgenes. Ao contrário dos demais retrovírus utilizados nestes experimentos, eles podem se integrar tanto nas células que estão ou não em divisão (VODICKA, 2001).

No geral, os métodos de transfecção com a utilização de retrovírus apresentam um risco de integração no genoma do hospedeiro, visto que essa é uma etapa de replicação obrigatória para todos os retrovírus, e por esta razão pode limitar sua aplicação. Dessa forma, surgiu a necessidade de se desenvolver novos métodos onde esta integração não ocorra. Uma alternativa são os adenovírus e os vírus sendai, pois o DNA desses vírus não se integra ao genoma do hospedeiro.

Zhou & Freed (2009) foram capazes de gerar iPSC livres de transgênicos, sem integração de DNA exógeno ao genoma celular, a partir de fibroblastos humanos com uso de vetores adenovirais. No entanto, o processo de reprogramação requer múltiplas infecções, e a produção de adenovírus é muito trabalhosa.

O vírus Sendai é outro vetor viral que vem sendo usado com sucesso para geração de iPSC (FUSAKI *et al.*, 2009; SEKI *et al.*, 2010; BAN *et al.*, 2011; NISHISHITA *et al.*, 2012; ONO *et al.*, 2012; SEKI *et al.*, 2012; MACARTHUR *et al.*, 2012; CHAN *et al.*, 2018 entre outros), dada a sua alta eficiência na transferência de genes em uma ampla variedade de células.

No entanto, apesar do sucesso de sua aplicabilidade para obtenção de iPSC, uma das desvantagens do uso de vírus, de modo geral, é a necessidade de trabalhar em nível de biossegurança superior, o que demanda maior investimento em infra-estrutura e treinamento especializado de quem irá manipulá-lo. Uma alternativa aos vetores virais é a transfecção, por lipossomos ou eletroporação, de DNA plasmídeo ou linear, uma vez que eles são removidos da célula hospedeira através da divisão celular (WANG; LOH 2019). Porém, nesse método a eficiência da transdução é muito menor, com apenas algumas células capturando o conjunto completo de fatores de reprogramação (OMOLE; FAKOYA 2018).

Os vetores episomais fornecem alternativa para o uso dos vírus. Episomas são DNAs extracromossômicos capazes de se replicar dentro de uma célula independentemente do DNA cromossômico. Os fatores de reprogramação podem ser transitoriamente transfectados nas células somáticas usando vetores episômicos como plasmídeos (OKITA *et al.*, 2008; OKITA *et al.*, 2011 entre outros). Ao contrário dos retrovírus e lentivírus, esta técnica é relativamente simples e fácil de usar e não envolve integração no genoma do hospedeiro. No entanto, como a expressão do vetor episômico é apenas transitória, eles requerem múltiplas transfecções consecutivas.

Na maioria dos casos, os métodos de transfecção onde ocorre a integração têm uma maior eficiência de reprogramação do que métodos onde não ocorre a integração, mas são menos seguros devido ao risco de mutagênese insercional, portanto o uso de métodos onde não ocorre a integração para gerar iPSC são os mais recomendados para serem utilizados em ambientes clínicos.

3.8 iPSC EM ESTUDOS RELACIONADOS À SURDEZ

Muito do nosso conhecimento sobre as vias moleculares que levam a PA em humanos veio de modelos animais genéticos, em particular, camundongos. As semelhanças entre as estruturas e função auditiva humana e de camundongos, e o alto nível de concordância entre genes ortólogos críticos, para a função auditiva, foram determinantes para que o camundongo se tornasse o organismo modelo predominante para a pesquisa auditiva. No entanto, existem diferenças consideráveis entre ambos os genomas, com muitos moduladores genéticos sendo específicos aos humanos (OHLEMILLER; JONES; JOHNSON, 2016; MORETTI, *et al.*, 2013). Além disso, como é o caso da duplicação DFNA58, nem sempre é possível reproduzir a mesma variante patogênica humana em camundongos. Outro desafio é que, até o momento, não se conhecem ortólogos murinos aos genes lncRNA

contidos no segmento duplicado, e é possível que não existam dadas as particularidades dos sistemas auditivos de cada organismo, sendo que ao menos dois destes genes de lncRNA se mostraram bons candidatos a explicar a PA em virtude da expressão alterada no sangue.

Os recentes avanços na tecnologia de edição gênica e da obtenção de iPSC têm proporcionado uma nova base para o estudo da biologia de CT (WATTANAPANITCH, 2019) e sua utilização em terapias celulares. Além disso, as iPSC também podem ser utilizadas como modelo experimental para estudos relacionados aos mecanismos fisiopatológicos da doença em questão, como a surdez, como também servir para testar terapias gênicas ou farmacológicas. Na tabela 3, temos uma relação dos estudos já publicados cujo objetivo foi o estabelecimento de linhagens iPSC de pacientes portadores de surdez síndrômica e/ou não síndrômica.

Tabela 3: Relação de estudos que obtiveram sucesso no estabelecimento de linhagens iPSC de pacientes portadores de surdez síndrômica e/ou não síndrômica. Destacado em negrito aqueles trabalhos discutidos com mais detalhes nessa dissertação. F= Feminino; M= Masculino; NI= Não Informado; FD= Fibroblasto dérmico; PBMC= *Peripheral Blood Mononuclear Cell*; U= Urina.

Quant.	Sexo	Idade	Doença	Padrão de herança	Gene: Variante patogênica associada	Célula de origem			Método de reprogramação			Modificação genética Sim (S), Não (N)	Ausência de anomalias cromossômicas (cariótipo)	Confirmação do potencial pluripotente			Confirmação do potencial de diferenciação nos folhetos embrionários			Método de confirmação de mesma variante patogênica do doador da linhagem de iPSC	Referência
						FD	PBMC	U	Retro vírus	Sendai vírus	Plasmídeos episomais			RT-qPCR	RT-PCR	Imuno fluorescência	Formação de teratoma em camundongos imunodeprimidos	Formação espontânea de corpos embriões	Diferenciação <i>in vitro</i> nos três folhetos germinativos		
1	F	46a	Síndrome MELAS	Mitochondrial	<i>ND5</i> : m.3243A>G	X	----	----	X	----	----	N	X	----	----	X	X	----	X	RT-qPCR	Fujikura et al., 2012
1	M	38a																			
1	F	18m	PANS	AR	<i>GJB2</i> : c.235delC	X	----	----	----	----	X	N	X	X	----	X	X	----	X	Sequenciamento Sanger	JIN et al. 2015
1	M	23a																			
1	F	48a	Síndrome de Behr	AR	<i>OPA1</i> : c.610+364G>A/ c.1311A>G	X	----	----	----	----	X	N	X	X	----	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	Hauser et al., 2016
1	F	7a		AR	<i>MYO7A</i> : c.1184G>A/c.4118C>T	----	----	X	X	----	----	S	X	----	X	X	X	----	----	Sequenciamento Sanger	*Tang et al., 2016
1	M	32a			<i>MYO7A</i> : c.1184G>A/ nI																
1	F	4a	Síndrome de Pendred	AR	<i>SLC26A4</i> : c.1229C>T/ c.1229C>T <i>SLC26A4</i> : c.2168A>G/c.2168A>G <i>SLC26A4</i> : c.439 A> G/ c.2168 A> G	----	X	----	----	----	X	N	X	----	----	X	----	----	----	Sequenciamento Sanger	Hosoya et al., 2017
1	F	7a																			
1	F	34a																			
1	F	39a	PANS	Mitochondrial	<i>MTRNR1</i> : m.1555A>G	----	X	----	----	X	----	N	X	----	----	X	X	----	X	Pirosequenciamento SNPs – single nucleotide polymorphisms	Hsu et al., 2017
1	F	25a	Síndrome de Alport	AR	<i>COL4A3</i> : c.345delG/ c.345delG	X	----	----	----	----	X	N	X	----	----	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	Kuebler et al., 2017a
1	M	41a	Síndrome de Alport	Ligado ao X	<i>COL4A5</i> : c.3722G>A <i>COL4A5</i> : c.4052G>A	X	----	----	----	----	X	N	X	----	----	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	Kuebler et al., 2017b
1	M	25a																			
1	F	NI	Síndrome de Wolfram tipo 2	AD	<i>CISD2</i> : c.103+1G>A/ c.103+1G>A <i>CISD2</i> : c.103+1G>A/ c.103+1G>A <i>CISD2</i> : c.103+1G>A/nI <i>CISD2</i> : c.103+1G>A/nI	X	----	----	----	----	X	N	X	X	----	X	----	X	X	RT-PCR	La Spada et al., 2017
1	F	NI																			
1	M	NI																			
1	F	4a	PANS	AR	<i>GJB2</i> : c.109G>A/ c.109G>A	----	X	----	----	X	----	N	X	----	X	X	----	X	X	Sequenciamento Sanger	Chan et al., 2018
1	F	33a	Síndrome do QT Longo tipo 1	Digênica	<i>KCNQ1</i> : c.1394-2A>G/nI e <i>KCNE1</i> : c.112A>G/nI	----	X	----	----	X	----	N	X	----	----	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	Kasai-Brunswick et al., 2018
1	M	3a	Síndrome de Jervell e Lange-Nielsen	AR	<i>KCNQ1</i> : c.1394-2A>G/ c.1394-2A>G e <i>KCNE1</i> : c.112A>G/nI (polimorfismo)	----	X	----	----	X	----			----	----	X	----	----			

Tabela 3 final

Quant.	Sexo	Idade	Doença	Padrão de herança	Gene: Variante patogênica associada	Célula de origem			Método de reprogramação			Modificação genética Sim (S), Não (N)	Ausência de anomalias cromossômicas (cariótipo)	Confirmação do potencial pluripotente			Confirmação do potencial de diferenciação nos folhetos embrionários			Método de confirmação de mesma variante patogênica do doador da linhagem de iPSC	Referência
						FD	PBMC	U	Retro virus	Sendai virus	Plasmídeos episomais			RT-qPCR	RT-PCR	Imuno fluorescência	Formação de teratoma em camundongos imunodeprimidos	Formação espontânea de corpos embriões	Diferenciação <i>in vitro</i> nos três folhetos germinativos		
1	F	3a	Mucopolissacaridose tipo III	AR	<i>NAGLU</i> : c.1073C>T/c.1073C>T	X	----	----	----	----	X	N	X	----	----	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	Vallejo-díez <i>et al.</i> , 2018
1	F	59a	Síndrome de Usher tipo2	AR	<i>USH2A</i> : c.2299delG/ c.2299delG	X	----	----	----	X	----	N	X	X	X	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	Sanjurjo-Soriano <i>et al.</i> , 2018
1	F	40a	Síndrome de MERRF	Mitochondrial	<i>tRNA^{lys}</i> : m.8344A>G	X	----	----	----	X	----	N	X	----	X	X	X	----	X	Pirosequenciamento SNPs	Wu <i>et al.</i> , 2018
1	M	NI	Síndrome de Usher tipo 2	AR	<i>USH2A</i> : c.2276G>T/c.2276G>T	X	----	----	----	X	----	N	X	X	----	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	Zurita-Díaz <i>et al.</i> , 2018
1 1 1	F F M	54a 31a 7a	----	AD	<i>P2RX2</i> : c.178G>T/nl	----	----	X	----	X	----	S	X	X	----	X	X	X	----	Sequenciamento Sanger	**Dong <i>et al.</i> , 2019
1	M	43a	Mucopolissacaridose tipo IV	AR	<i>GALNS</i> : c.181G>A/c.1213_1218del	X	----	----	----	X	----	N	X	----	----	X	X	----	----	Sequenciamento de nova geração	Li <i>et al.</i> , 2019
1	F	63a	Síndrome de Usher tipo 2	AR	<i>USH2A</i> : c.2209C>T/ c.8693A>C	X	----	----	----	X	----	N	X	----	X	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	Riera <i>et al.</i> , 2019
1 1	F F	18a 18a	Síndrome de Usher tipo2	AR	<i>USH2A</i> : c.949C>A/c.1256G>T	X	----	----	----	----	X	N	X	X	----	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	McLenachan <i>et al.</i> , 2019
1	M	9a	Síndrome de Pendred	AR	<i>SLC26A4</i> : c.919-2A>G/ c.919-2A>G	----	X	----	----	X	----	N	X	X	X	X	----	----	X	Sequenciamento Sanger	Cheng <i>et al.</i> , 2019
1	F	10a	Síndrome de Jervell e Lange-Nielsen	AR	<i>KCNQ1</i> : c.568 C>T/ c.1781G>A	X	----	----	X	----	----	N	X	----	X	X	----	X	----	Sequenciamento Sanger	Mura <i>et al.</i> , 2019
1	F	12a	PANS	AR	<i>GJB2</i> : c.109G>A/ c.109G>A	----	X	----	----	X	----	N	X	----	----	X	----	X	----	Sequenciamento Sanger	Fukunaga <i>et al.</i> , 2020
1	M	4a	PANS	AR	<i>GJB2</i> : c.109G>A/ c.109G>A	----	X	----	----	X	----	N	X	----	X	X	X	X	----	Sequenciamento Sanger	Lu <i>et al.</i> , 2020
1	M	8a	Síndrome de Waardenburg	AD	<i>SOX10</i> : c.937_947del/nl e <i>GJB2</i> : c.235delC/nl	X	----	----	----	----	X	N	X	X	----	X	X	----	----	Sequenciamento Sanger	Wang <i>et al.</i> , 2020
1	M	7a	PANS	AR	<i>GJB2</i> : c.235delC/ c.235delC	----	X	----	----	X	----	N	X	----	X	X	X	X	----	Sequenciamento Sanger	Huang <i>et al.</i> , 2020

A tecnologia de reprogramação em associação com outras ferramentas de edição gênica são abordagens poderosas para compreensão dos mecanismos fisiopatológicos de uma variante patogênica ou para testes de possíveis drogas ou intervenções terapêuticas. Por isso, cabe destacar os trabalhos realizados por Dong *et al.*, (2019) e Tang *et al.*, (2016) [tabela 3] que além do estabelecimento das iPSC utilizaram a ferramenta de edição gênica CRISPR/Cas9 para recapitular o efeito das variantes patogênicas em heterozigose ou homozigose em modelos celulares. Isso nos mostra um leque de possibilidades tanto para o desenvolvimento de modelos para o estudo *in vitro* da PA tanto quanto realizar comparações morfológicas e funcionais da variante patogênica em células homozigotas versus heterozigotas.

No estudo de Dong *et al.*, (2009), foi estabelecida uma linhagem de iPSC a partir células epiteliais renais coletadas da urina de três pacientes com PA sensorineural, progressiva e de herança autossômica dominante associada a presença da variante patogênica c.178G>T no gene *P2RX2*. Dois dos três pacientes eram do sexo feminino (54 e 31 anos) e um do sexo masculino (7 anos). A transfecção foi realizada com o Sendai vírus que continha os fatores OSKM e a confirmação da variante patogênica c.178G>T no gene *P2RX2* em heterozigose foi realizada por sequenciamento de Sanger. As iPSC expressavam os fatores de pluripotência e possuíam a capacidade de diferenciação nos folhetos embrionários, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Adicionalmente, por meio da técnica de CRISPR/Cas9 (técnica de edição gênica utilizada para modificar sequências de DNA), os pesquisadores estabeleceram, a partir das iPSC geradas dos pacientes, uma linhagem de iPSC com a variante patogênica (c.178G>T no gene *P2RX2*) em homozigose. O estabelecimento dessas duas linhagens obtidas, em combinação com a técnica de CRISPR/Cas9, permite que no futuro seja possível comparar os efeitos patológicos, morfológicos e funcionais da variante patogênica nos homozigotos *versus* heterozigotos.

As células ciliadas e os neurônios auditivos de mamíferos não têm capacidade regenerativa, portanto os danos a esses tipos de células são permanentes e levam a PA. Até o momento, com exceção das próteses auditivas e implantes cocleares, não há tratamento para restaurar a função auditiva, portanto, as terapias regenerativas com CT representam uma alternativa promissora (DUFNER-ALMEIDA *et al.*, 2019; BENTO; SOUZA 2019). Estudos acerca da indução de células semelhantes a células ciliadas e neurônios óticos a partir de iPSC *in vitro* vem crescendo (OHNISHI *et al.*, 2015, GUNWARDENE *et al.*, 2014, CUI *et al.*, 2020, BODDY *et al.*, 2020, BADEMCI *et al.*, 2020) no entanto, existem poucos relatos que

vão além do estabelecimento de linhagens iPSC com algum padrão de variante patogênica, diferenciando-as em linhagens de células da orelha interna.

Nesse cenário tem destaque o estudo de Tang *et al.*, (2016), realizado a partir do estabelecimento de linhagens iPSC por transfecção retroviral dos fatores OSKM em células epiteliais renais coletadas da urina: (i) de uma paciente do sexo feminino com PA e portadora das variantes patogênicas c.1184G>A e c.4118C>T no gene *MYO7A* em heterozigose composta, (ii) do seu pai assintomático e portador da variante patogênica c.1184G>A (*MYO7A*) em heterozigose e (iii) de um controle normal, ouvinte e não portador de nenhuma variante patogênica no *MYO7A*. Todas as iPSC expressavam os fatores de pluripotência, possuíam cariótipo normal e capacidade de diferenciação nos folhetos embrionários, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Os resultados do sequenciamento de Sanger do gene *MYO7A* da iPSC apresentaram as mesmas variantes que as identificadas nas células originais da paciente e de seu pai. Para diferenciação direta em progenitores óticos epiteliais (POE), as colônias de iPSC foram dissociadas e mantidas em meio suplementado com FGF3 e FGF10 por 12 dias, em seguida os POE foram diferenciados em células fenotipicamente semelhantes a células ciliadas por meio de cultivo aderente com células estromais do utrículo de galinha mitoticamente inativas (*mitotically inactivated chicken utricle stromal cells*) e meio de cultura suplementado com ácido retinóico e EGF por 4 semanas. Ao final da diferenciação, as células obtidas mostraram dupla marcação para ATOH1/POU4F3 e POU4F3/MYO7A por imunofluorescência, confirmando o fenótipo similar ao das células ciliadas. Também por imunofluorescência com os marcadores F-actina e MYO7A, foram observadas nessas células, protrusões semelhantes aos estereocílios das células ciliadas. Essas protrusões foram estudadas por microscopia eletrônica de varredura e sua morfologia foi compatível com as estruturas dos estereocílios localizados no ápice das células ciliadas da orelha interna. Embora a diferenciação e função dos POE derivados das três iPSC não tenham mostrado diferença, a morfologia das protrusões semelhantes a estereocílios encontradas nas células diferenciadas a partir das iPSC do paciente heterozigoto composto diferiam daquelas protrusões encontradas nas células diferenciadas a partir das iPSC do controle normal e do seu pai heterozigoto assintomático. As protrusões semelhantes a estereocílios encontradas nas células diferenciadas das iPSC do controle normal e do pai heterozigoto possuíam aparência rígida e retas, com algumas grudadas. As protrusões semelhantes a estereocílios encontradas nas células diferenciadas das iPSC do heterozigoto composto eram curvas, desalinhadas, espalhadas e não exibiam ligação umas com as outras. Os dados do pai assintomático e

heterozigoto e da filha, com PA e heterozigota composta indicaram que a presença de um único alelo normal é suficiente para a expressão da proteína MYO7A e que essa expressão é capaz manter a morfologia normal dessas protrusões semelhantes a estereocílios. Nesse estudo, também foi analisada a atividade funcional dos canais de mecanotransdução (MET) nas células semelhantes a células ciliadas provenientes de todas as iPSC por meio de incubação com corante fluorescente FM1-43FX. O corante FM1-43FX é frequentemente utilizado para avaliar a presença da atividade dos canais MET em repouso, uma vez que os canais MET funcionais são necessários para a internalização deste corante fluorescente nas células ciliadas (GALE *et al.*, 2001; KAWASHIMA *et al.*, 2011). As células fenotipicamente diferenciadas das três iPSC mostraram rápida absorção do corante FM1-43FX. No entanto, a quantidade de células diferenciadas derivadas do heterozigoto composto marcadas com FM1-43FX foi muito menor do que as do controle normal e pai heterozigoto assintomático. A fim de confirmar que as diferenças fenotípicas entre essas três linhagens de iPSC foram causadas por mutações no gene *MYO7A*, e para restaurar o fenótipo normal das células semelhantes a células ciliadas derivadas da iPSC do heterozigoto composto, a variante patogênica c.4118C>T em *MYO7A* foi selecionada para ser corrigida usando o método CRISPR/Cas9, pois essa era a variante ausente na iPSC proveniente do pai assintomático. As iPSC corrigidas foram diferenciadas em células ciliadas e as protrusões semelhantes aos estereocílios resgataram a mesma forma organizacional que as células diferenciadas derivadas das iPSC do controle normal e pai heterozigoto, além disso, foi observado que a taxa de captação de FM1-43 foi semelhante entre a encontrada nas células diferenciadas a partir das iPSC do controle normal e pai heterozigoto, sugerindo que o canal MET havia se recuperado. Portanto, isso indica que a correção realizada foi suficiente para resgatar a função das células ciliadas (TANG *et al.*, 2016). Assim, este estudo de Tang *et al.*, 2016 (tabela 3) demonstrou o principal fenótipo celular associado a essas variantes e também testou uma possível intervenção terapêutica.

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 FLUXOGRAMA

Figura 6: Fluxograma com a descrição sucinta das etapas realizadas nesse estudo.

4.2 COMISSÃO DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado sob o protocolo de pesquisa nº 87939718.0.0000.0068, pela CAPPesq (Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) aprovado em 04/2018 e pela CIBIO (Comissão Interna de Biossegurança) sob o protocolo 002/2018 aprovado em 03/2018. O estudo da família do DFNA58 estava contemplado em projeto CONEP sob processo de nº 25000.143724/2003-29 (Registro CONEP 9106) e o outro aprovado em

06/2009 no Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências da USP, onde o estudo foi iniciado pela Dra. Karina Lezirovitz.

4.3 PACIENTES

Como dito anteriormente, a família alvo desse estudo também foi analisada pela Dra. Karina Lezirovitz Mandelbaum durante sua iniciação científica, mestrado, doutorado e pós-doutorado. Inicialmente, foram obtidas amostras de DNA de 34 pessoas (das quais 12 são de indivíduos afetados) no Instituto de Biociências da USP. Para este estudo recrutamos novamente os pacientes desta família, que foram atendidos no Ambulatório de Surdez Genética do Departamento de Otorrinolaringologia do HCFMUSP. Todas as pessoas reconvidadas que compareceram ao serviço de aconselhamento genético assinaram o termo de consentimento para a coleta de sangue para os testes genéticos, estabelecimento da cultura e a utilização dos dados para pesquisa.

4.3.1 Coleta de sangue periférico

Para reprogramação das iPSC foram utilizadas células mononucleares do sangue periférico (PBMC do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*).

As amostras de sangue (5 mL) foram coletadas em tubos de EDTA pelos profissionais do laboratório central HCFMUSP. Assim que coletadas as amostras foram imediatamente processadas para que não houvesse hemolização da amostra.

4.4 CULTURA E REPROGRAMAÇÃO DAS iPSC

As etapas de isolamento e expansão das PBMC e reprogramação em iPSC foram realizados em colaboração com o Dr. Gerson Kobayashi e a Dra. Danielle P. Moreira do Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células Tronco – USP (CEGH-CEL) e o Dr. Fernando Lojudice do Núcleo de Terapia Celular e Molecular (NUCEL).

4.4.1 Isolamento das PBMC

O mesmo protocolo de isolamento foi realizado tanto no CEGH-CEL quanto no NUCEL. As iPSC foram obtidas a partir das PBMC, que foram separadas por meio de gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences, MA, USA). Em um tubo de

centrífuga de 15 mL foi adicionado 5 mL de sangue diluído em 3 mL de Solução Salina tamponada com Fosfato (*Phosphate-Buffered Saline*-PBS), contendo 2 % de Soro Fetal Bovino (SFB) [ambos Gibco/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA]. Em seguida o sangue diluído foi lentamente transferido pela parede do tubo de centrífuga de 15 mL contendo 3 mL de Ficoll. Em seguida, as células foram centrífuga a 400 xg por 30 minutos, sem freio. Após a separação, o anel de linfócitos contendo as PBMC foi transferido para um novo tubo de centrífuga completando o volume para 15 mL de PBS contendo 2 % SFB, as células foram levadas a centrífuga a 300 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 15 mL de PBS contendo 2 % SFB. Em seguida as células foram lavadas, levadas a centrífuga a 200 xg por 10 minutos e o sobrenadante descartado, por fim o *pellet* foi ressuspensionado em 5 mL de PBS contendo 2 % SFB. Antes de seguir com o cultivo, foi efetuada a contagem em câmara de *Neubauer* para verificar a quantidade e viabilidade das células com o uso do corante azul de tripan 0,4% (Gibco/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), a contagem de acordo com a fórmula descrita na figura 7. Do total obtido de células, de $3-5 \times 10^6$ foram congeladas (conforme descrito no item 4.5) para possíveis repetições.

$$\text{Nº de células/mL} = \frac{\text{Nº total de células}}{\text{Nº de quadrantes contados}} \times \text{Fator de diluição} \times 10.000$$

Figura 7: Fórmula utilizada para contagem do número total de células por mL em câmara de *Neubauer*.

4.4.2 Expansão das PBMC

O mesmo protocolo de expansão foi realizado tanto no NUCEL quanto no CEGH-CEL, com exceção das citocinas que estão descritas na tabela 4. Do total de PBMC obtidas na etapa de isolamento, 1×10^6 foram cultivadas com meio *StemSpan* (Stemcell Technologies Inc, Vancouver, Canadá) suplementado com as citocinas da tabela 4 em placas de 24 poços própria para cultura de células em suspensão, sendo a troca do meio realizada em dias alternados. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 1 mL do meio de expansão e transferido para um novo poço da placa de 24 poços. As células foram cultivadas entre 8 a 11 dias a 37 °C, em incubadora com CO₂ a 5 %, para depois serem submetidas à reprogramação.

Tabela 4: Relação das citocinas utilizadas no CEGH-CEL e NUCCEL. SCF= *Stem Cell Fator*; EPO= *Erythropoietin*; IGF-1= *Insulin-Like Growth Factor*; LC= *Lipid cholesterol*; IL-3= *Interleukin 3*

CEGH-CEL			NUCEL		
Citocinas	Concentração	Marca	Citocinas	Concentração	Marca
SCF	50 ng/mL	Peprotech	SCF	50 ng/mL	Peprotech
EPO	2 U mL		EPO	2 U mL	
IGF-1	40 ng/mL	ThermoFischer	IGF-1	40 ng/mL	Sigma
Dexametasona	1 µM	Sigma	Dexametasona	1 µM	
LC	40 µg/mL		<i>Holo-transferrin</i>	100 µg/mL	
IL-3	10 ng/mL	ThermoFischer	IL-3	10 ng/mL	
Gentamicina	10 µg/mL		1-Thioglycerol	200 µM	

4.4.3 Reprogramação das PBMC por nucleofecção

As PBMC cultivadas por 8-14 dias foram submetidas a reprogramação por meio da transfecção dos plasmídeos episomais (figura 8). Após nova contagem celular, do total obtido de células, três amostras foram separadas, contendo 1×10^6 cada. Uma foi submetida ao protocolo de extração de RNA, para ser utilizada nas análises de RT-PCR e RT-qPCR relacionadas ao estado de pluripotência celular, outra foi congelada em *vials* (tubos para criopreservação – Corning Inc., Corning, Nova York, USA) para experimentos futuros de reprodutibilidade (item 4.5). Por fim, a terceira amostra foi utilizada para a obtenção da iPSC.

Figura 8: Plasmídeos utilizados neste estudo: CAG, promotor CAG; WPRE, elemento regulador pós-transcricional da hepatite de marmota (do inglês Woodchuck Hepatitis Post-transcriptional Regulatory Element); pA: calda poliA, shRNA suprimindo p53 Adaptada de Okita *et. al.*, 2011.

Em um microtubo foi preparada e mantida em gelo, uma solução contendo 2 µg de cada um dos três plasmídeos (pCXLE-hOCT3/4-shp53 expressando OCT3/4 e shRNA contra p53, pCXLE-hSK expressando SOX2 e KLF4, pCXLE-hUL expressando L-MYC e LIN28) todos Addgene (Watertown, MA, USA). Em outro microtubo foi preparada a solução de

nucleofecção contendo 82 µL de solução de nucleofecção e 18 µL de suplemento 1 fornecido no kit *Human CD34+ Cell Nucleofector* (Lonza Group AG, Basileia, SWI).

As células reservadas para nucleofecção foram levadas a centrífuga a 200 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido na solução de nucleofecção e em seguida foi adicionada a solução com os plasmídeos. As células foram transferidas para uma cubeta (fornecida pelo kit) seguido da transfecção por electroporação com o equipamento *Amaza nucleofector II* e do *Kit* (Lonza Group AG, Basileia, SWI) utilizando o programa T-016. Após a transfecção, as células foram gentilmente transferidas para uma placa de 24 poços contendo 1,5 mL de meio de expansão e a placa foi mantida a 37°C, em incubadora com CO₂ a 5% durante a noite. No dia seguinte, o meio foi cuidadosamente trocado a fim de remover as células mortas e a solução de nucleofecção.

Nessa etapa as células reprogramadas no CEGH-CEL e NUCEL tiveram uma pequena diferença metodológica.

Passados três dias, as células reprogramadas no CEGH-CEL foram plaqueadas em placas previamente revestidas com 3×10^4 /cm² MEFs – *mouse embryonic fibroblast* (Gibco ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) e o meio de expansão foi trocado para o meio ESC [20 % de soro nocaute (*knockout serum replacement*), 2 mM GlutaMAX™, 0.1 mM de solução de aminoácidos não essenciais, 0,1mM β-mercaptoetanol, 10 µg/mL gentamicina em meio *Knockout Dulbecco's modified Eagle* (Gibco ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado com 2 µM de inibidor da via TGF-β (SB431542), 0,5 µM inibidor da via MEK (PD0325901), 2 µM Tiazovivina, 0,5 mM ácido valproico (VPA – do inglês *Valproic acid*), 0,25 mM Nitrosoanabasina (NaB – do inglês *Nitrosoanabasine*), 10 ng/mL Fator de crescimento fibroblástico básico (do inglês *Basic fibroblast growth factor* – bFGF). Entre os dias 10 e 15 pós nucleofecção, o meio ESC foi suplementado com os mesmos suplementos, com exceção do VPA e NaB e depois do dia 15 o meio foi suplementado apenas com bFGF.

Já as células reprogramadas no NUCEL foram plaqueadas em placas previamente revestidas com matrigel (Corning Inc., Corning, Nova York, USA) e o meio de expansão foi trocado para o meio Essencial 8 (E8 Gibco/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). As células permaneceram em cultura com meio sendo trocado em dias alternados até o surgimento das primeiras colônias.

Deste ponto em diante, as células reprogramadas no CEGH-CEL e NUCEL seguiram o mesmo processo.

Dentre o 15° e 21° DIV (*Dias In Vitro*), as colônias celulares obtidas foram colhidas manualmente sob o microscópio digital invertido EVOS™ XL Core Imaging System (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) dentro do fluxo laminar. Para essa etapa, primeiro o meio de cultura foi removido e foi adicionado 1 mL de meio E8. Com o auxílio de uma ponteira de 10 µL, as células foram “cortadas” em um padrão de grade de modo a formar pequenos quadrados. Em seguida esses “quadrados” foram gentilmente levantados com o auxílio de um *cell lifter* (Corning Inc., Corning, Nova York, USA) e transferidos para novos poços de placas de 6 poços com o auxílio de uma pipeta sorológica de 10 mL, pois o diâmetro da ponta impede que a colônia celular se desfaça. Os “quadrados de células” foram transferidos para três poços previamente revestidos com 1 mL de matrigel. Após a transferência foi adicionado mais 1 mL do meio E8 e a placa de cultura foi mantida em incubadora a 37 °C e com CO₂ a 5 %, e o meio trocado diariamente. O repique é repetido quando as células atingem a confluência entre 60 % e 75 %. Na 5ª passagem foram realizados os testes para verificar a presença de contaminação por micoplasma, com o *MycoScope kit* (Genlantis, San Diego, CA, USA), seguindo protocolo do fabricante. Após a confirmação da ausência de contaminação, as células foram utilizadas para confirmação do estado de pluripotência, extração de DNA/RNA e diferenciação nos três folhetos embrionários.

4.5 PROTOCOLO DE CONGELAMENTO DAS PBMC E iPSC

As PBMC obtidas no item 4.4.1 foram levadas a centrífuga a 200 Xg por 10 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em meio RPMI 1640 (Gibco ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) contendo 10% DMSO (*Dimethyl sulfoxide* –Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA). De 3-5 x 10⁶ células foram congeladas por *vials* (Corning Inc., Corning, Nova York, USA). Os *vials* então foram colocados em um recipiente próprio para congelamento com isopropanol os banhando externamente (*Mr Frosty* – Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA) e permaneceram durante a noite a - 80 °C. Em seguida, foram transferidos para o nitrogênio líquido para armazenamento à longo prazo e para experimentos futuros de reprodutibilidade.

As iPSC foram congeladas em colônias, foram utilizadas placas de petri de 60 mm com aproximadamente 75 % de confluência. Com o auxílio de uma ponteira de 10 µL, as células foram “cortadas” em quadrados (assim como no item 4.4.3). Em seguida esses “quadrados” foram gentilmente levantados com o auxílio de um *cell lifter* (Corning Inc.,

Corning, Nova York, USA), transferidos para um tubo de 15 mL e levados a centrífuga a 300 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensionado em meio de criopreservação *CryoStor CS10* (Stemcell Technologies Inc, Vancouver, Canadá), cada placa de 60 mm foi congelada em 3 *vials*. Os *vials* então foram colocados no *Mr Frosty* e permaneceram durante a noite a -80°C . Em seguida, foram transferidos para o nitrogênio líquido para armazenamento à longo prazo e para experimentos futuros de reprodutibilidade.

4.6 PROTOCOLO DE DESCONGELAMENTO DAS PBMC E iPSC

Os *vials* contendo as PBMC foram removidos do nitrogênio líquido e imediatamente imergidos em banho maria a 37°C girando gentilmente o tubo até que as células estejam descongeladas. Uma vez descongelados, os *vials* foram descontaminados com álcool 70 % e levados ao fluxo laminar. As células descongeladas foram transferidas para um tubo de 15 mL e incubadas por 2 minutos em PBS contendo 20 % de SFB gelado, após a incubação as células foram levadas a centrífuga por 10 minutos a 400 xg. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado em 2 mL de meio de expansão e transferido para uma placa de 24 poços próprias para células em suspensão.

Os *vials* contendo as iPSC foram removidos do nitrogênio líquido e imediatamente imergidos em banho maria a 37°C girando gentilmente o tubo até que as células estejam descongeladas. Uma vez descongelados, os *vials* foram descontaminados com álcool 70 % e levados ao fluxo laminar. As células foram transferidas para um tubo de centrífuga de 15 mL contendo 10 mL de meio DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12*, (Gibco ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) a temperatura ambiente (TA), em seguida as células foram e levadas a centrífuga a 400 xg por 3 minutos a TA. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células gentilmente ressuspensionado em 2 mL de meio E8 a TA suplementado com $10\text{ }\mu\text{M}$ de Y-27632 *dihydrochloride* (ROCK *inhibitor* – Enzo Biochem, Inc. Farmingdale, Nova York, USA) para assegurar a aderência das células. Em seguida, as células foram transferidas para placas previamente revestidas com Matrigel (tamanho de placa e poços a depender do experimento de destino) e mantidas durante a noite em incubadora a 37°C com CO_2 a 5 %. O meio E8 foi trocado diariamente (sem ROCK *inhibitor*).

4.7 EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR das iPSC

A extração de DNA foi realizada com o *Quick-DNA Miniprep Plus Kit* (Zymo Research, CA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Foi utilizado um poço da placa de 6 poços (obtidas no item 4.4.3). As células foram transferidas para um microtubo de 1,5 mL e levadas a centrífuga a 500 xg por 2 minutos e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 200 µL de *DNA Elution Buffer*. Em seguida foi adicionado 200 µL *BioFluid & Cell Buffer* e 20 µL Proteinase K, a solução foi homogeneizada por 15 segundos e então incubado a 55°C por 10 minutos. Após a incubação foi adicionado 420 µL de *Genomic Binding Buffer* e a amostra foi homogeneizada por 15 segundos. Todo o volume foi transferido para a coluna de extração e tubo coletor (fornecida pelo fabricante) seguida de uma centrifugação a 12.000 xg por 1 minuto e descarte do fluido que passou pela coluna. Em seguida a coluna foi lavada com 400 µL de *DNA Pre-Wash Buffer* seguida de uma centrifugação a 12.000 xg por 1 minuto e descarte do fluido que passou pela coluna. Foram realizadas mais duas lavagens, sendo uma com 700 µL e outra com 200 µL de *g-DNA Wash Buffer* seguida de uma centrifugação a 12.000 xg por 1 minuto e descarte do fluido que passou pela coluna. A coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e o DNA foi eluído em 30 µL de *DNA Elution Buffer* por meio de centrifugação a 12.000 xg por 1 minuto. O DNA obtido nesta etapa foi utilizado nas análises de PCR para verificar a integração do plasmídeo nas células, para verificar a presença de anormalidades cromossômicas por meio de *kits* de MLPA, para verificar a identidade das células por microssatélites e qPCR para confirmar a presença da variante patogênica tal qual as células que originaram as iPSC.

4.8 EXTRAÇÃO DE RNA A PARTIR DAS PBMC, iPSC, FOLHETOS EMBRIONÁRIOS E SÍNTESE DE cDNA

Para a extração de RNA foi utilizado 1×10^6 das PBMC pré reprogramação ou um poço da placa de 6 poços de iPSC (obtidas no item 4.4.3), ou um poço de placa de 6 poços de cada folheto embrionário (obtidas no item 4.9.3) que foram homogeneizados em 1 mL de reagente trizol (Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA) e incubadas por cerca de 30 minutos, em seguida foi realizada a extração do RNA com o *miRNeasy serum/plasma kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Ao trizol foram adicionados 200 µL de clorofórmio e a amostra foi agitada vigorosamente por 15 segundos, em seguida incubada por 3 minutos a TA. Após a incubação a amostra foi levada a centrífuga

a 12.000 xg por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação foram formadas 3 fases e a fase superior (aquosa e transparente de aproximadamente 600 µL) foi transferida para um microtubo de 1,5 mL, adicionado 900 µL de etanol 100 %, e o volume de amostra mais etanol foi transferido para a coluna de extração com tubo coletor (fornecida pelo fabricante) seguida de uma centrifugação a 8.000 xg por 30 segundos e descarte do fluído que passou pela coluna. Em seguida, foi efetuada uma lavagem com 350 µL de *Buffer RWT*, a coluna foi levada a centrífuga a 8.000 xg por 30 segundos e descarte do fluído que passou pela coluna foi efetuado. Após a lavagem, foi realizada uma incubação com DNase na coluna (Qiagen, Hilden, Alemanha) por 15 minutos a TA. Após a incubação foi realizada uma nova lavagem com 350 µL de *Buffer RWT* seguida de uma centrifugação a 8.000 xg por 30 segundos e descarte do fluído que passou pela coluna. Foram realizadas mais duas lavagens de 500 µL cada, a primeira com *Buffer RPE* e a segunda com etanol 80 % por 30 segundos e 2 minutos, respectivamente, a 8.000 xg descartando o fluído que passou pela coluna ao final da centrifugação. Por fim a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 mL e o RNA foi eluído em 14 µL de H₂O *DEPC* por meio de centrifugação a 8.000 xg por 1 minuto.

A síntese de cDNA foi realizada com o kit *SuperScript III* (Invitrogen, Life Technologies, Califórnia, USA) a partir de 1 µg (iPSC) e ~150 ng (folhetos embrionários) de RNA obtido na extração descrita anteriormente. Para cada amostra foi adicionado 1 µL *oligoDT*, 1 µL *Random Hexamer* e 1 µL *dNTPmix*, seguido de incubação a 65°C por 5 minutos e em seguida por 1 minuto no gelo. Foi adicionado 2 µL de *RT buffer*, 4 µL de MgCl₂, 2 µL de *DTT*, 1 µL de *RNAseOUT* e 1 µL de *SuperScript III*, seguida de incubação a 25 °C por 10 minutos, 50 °C por 50 minutos e 85 °C por 5 minutos. Depois foi adicionado 1 µL de *RNAse H* e as amostras foram incubadas a 37 °C por 20 minutos. O cDNA obtido nesta etapa foi utilizado nos ensaios de RT-PCR (verificar a expressão dos fatores de OSKM e verificar a expressão dos genes relacionados a diferenciação nos três folhetos embrionários) e RT-qPCR (verificar o nível de expressão dos fatores de OSKM e verificar o nível de expressão dos genes envolvidos na duplicação tal qual as células que originaram as iPSC).

4.9 CARACTERIZAÇÃO DAS iPSC

4.9.1 Análise qualitativa da expressão gênica dos marcadores de pluripotência

4.9.1.1 Análise qualitativa da expressão gênica dos marcadores de pluripotência por RT-PCR

As reações de RT-PCR foram realizadas com *Taq DNA polymerase recombinant Brasil kit* (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) e volume

final de 25 µl, contendo: 1X *Buffer*, 1,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs, 0,4 µM dos *primers forward* e *reverse* (tabela 5), 1,5 U de Taq DNA polimerase, 250 ng de cDNA. A reação foi levada ao termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) para amplificação cuja ciclagem utilizada pode ser encontrada na tabela 5. O resultado foi avaliado em gel de agarose 2,5 %.

Tabela 5: Sequência dos *primers* e ciclagem

Tabela 3: Sequência dos primers e ciclagem			
Gene	Sequência		Tamanho do amplicon
<i>OCT3/4</i>	F-TTACAGAACCACACTCGGAC R-AGCGAACCAGTATCGAGAAC		142 pb
<i>NANOG</i>	F- GGTCTCGTATTTGCTGCATCG R- GCAGTGTCTCAGCTAATTTC		200 pb
<i>KLF4</i>	F-TACCAAGAGCTCATGCCACC R-GGTGGTCCGACCTGGAAAAT		318 pb
<i>SOX2</i>	F-CAGCGCATGGACAGTTACG R-CTGGAGTGGGAGGAAGAGGTA		323 pb
<i>LIN28A</i>	F- GTTCGGCTTCCTGTCCATGAC R-CTGCCTCACCTCCTTCAAGC		122 pb
<i>L –MYC</i>	F- TCCATCATACGCCGTGACTG R- CCGAATACCCAGAGACTGCC		291 pb
<i>GAPDH</i> gene de ref.	F- GAATGGGCAGCCGTTAGGAA R- GACTCCACGACGTACTCAGC		414 pb
Ciclagem			
Passo1 (1 ciclo)	Passo 2 (10 ciclos)	Passo 3 (30 ciclos)	Passo 4 (1 ciclo)
	95 °C - 30s	95 °C - 30s	
95 °C - 5 min	69 °C - 30s (-0.5°C/ciclo)	62 °C - 30s	72 °C - 5 min
	72 °C -1 min	72 °C - 1 min	

4.9.1.2 Imunofluorescência indireta analisada por *high content screening* das iPSCs

Foram utilizadas células obtidas na 5ª passagem como descrito no item 4.4.3. As células foram transferidas para uma placa de cultura preta de 96 poços (Corning Inc., Corning, Nova York, USA) previamente revestidos com Matrigel contendo 300 µl de meio E8 e foram

cultivadas por 48 horas e o meio trocado diariamente. Para isso, o meio foi aspirado e foi adicionada a mesma quantidade de meio E8 fresco. Após as 48 horas, as células foram fixadas com Paraformaldeído a 4 % – PFA 4 % (*Electron Microscopy Sciences*, Hatfield, PA, USA) por 15 minutos e em seguida lavadas 1X com Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS, do inglês, *Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline*) [Gibco/ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA]. A permeabilização foi realizada com Triton X-100 0,2 % diluído em DPBS (Sigma – Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) por 20 minutos. Após a permeabilização foi realizado o bloqueio com Albumina séria bovina (BSA, do inglês, *Bovine serum albumin*) [Sigma – Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA] a 2 % em DPBS por 30 minutos, seguido de uma nova lavagem com DPBS. As células foram incubadas durante a noite a 4 °C com os anticorpos primários (anticorpos e diluições estão descritos na tabela 6), diluídos em DPBS. Uma nova lavagem foi realizada com DPBS seguida de incubação por 1 hora a TA com os anticorpos secundários conjugados com fluorocromos Alexa Fluor 488 ou Alexa Fluor 546 (*Molecular Probes* Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) diluídos em DPBS, na proporção 1:500. Depois foram lavadas novamente em DPBS, seguida de coloração com 0,5 µg/mL de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) [*Molecular Probes* Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA] em DPBS por 2 minutos a TA para marcar os núcleos celulares. Após uma última lavagem foi adicionado 100 µl de DPBS para cada poço e em seguida as células foram analisadas no equipamento *ImageXpress Micro High Content Screening system* (*Molecular Devices*, LLC, Sunnyvale, CA, USA) e as imagens foram capturadas por meio do software *Cell Scoring MetaXpress software* (*Molecular Devices*, LLC, Sunnyvale, CA, USA).

Tabela 6: Relação dos anticorpos e diluições utilizados

Anticorpos	Marca	Diluição
OCT4	R&D Systems	1:100
SOX2	Thermo Fisher	1:100
KLF4	R&D Systems	1:100
L-MYC	Novus Biologicals	1:100
LIN28A	Thermo Fisher	1:100

4.9.2 Análise quantitativa da expressão gênica dos marcadores de pluripotência

A análise quantitativa da expressão gênica foi realizada por meio da técnica de RT-qPCR. Para cada amostra, em duplicata, foi utilizado *PowerUp SYBR Green Master Mix* 1X (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) e de 0,1 a 0,35 µM de cada *primer* (tabela 7). Na placa de 48 poços *MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate* ou

MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip (ambos Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA), em cada poço foram adicionados 8 µL do mix (SYBR + Primers) e 2 µL de cDNA (40-500 ng por reação, a depender do nível de expressão do gene) obtido na etapa 4.9. As corridas de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *Step One* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) obedecendo à ciclagem da tabela 8. Para os primers do gene *SOX2* adicionamos 5 % de DMSO a reação. Em todos os experimentos foi realizada a curva de *melting* a 98°C após o final da amplificação das regiões de interesse a fim de evidenciar a presença de um único pico, demonstrando que a PCR estava específica e semelhante entre as diferentes amostras amplificadas com o mesmo par de *primers*. A eficiência de amplificação de cada par de *primers* foi verificada por meio de curva padrão de diluições seriadas. Utilizamos *primers* com eficiência entre 1,9 e 2,1, isto é, de 90% a 110%. O modelo matemático utilizado para determinar a quantificação relativa de cada sequência alvo em comparação a uma sequência de referência foi o método proposto por Pfaffl (2001) que leva em consideração a eficiência dos *primers* no cálculo da quantificação relativa (figura 9). Foram utilizados os genes de referência *GADH* e/ou *TBP* e utilizadas as médias geométricas ou medianas entre seus valores. Nos casos em que os desvios padrão das amostras estavam acima de 0,3, o experimento foi repetido.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}(\text{control} - \text{sample})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta CP_{\text{ref}}(\text{control} - \text{sample})}}$$

Figura 9: Equação utilizada nos cálculos de quantificação relativa de expressão gênica proposto por Pfaffl (2001). Ratio = Quantificação relativa a amostra calibradora ou controle, E = Eficiência dos *primers*. $\Delta CP_{\text{target}}$ = diferença nos limiares *Cp* ou *Ct* (*cycle threshold*) entre controle e amostra (*sample*) relativo ao gene alvo ou teste; ΔCP_{ref} = diferença nos limiares *Cp* ou *Ct* (*cycle threshold*) entre controle e amostra (*sample*) relativo ao gene de referência, endógeno ou *housekeeping*.

Tabela 7: Sequência dos *primers* utilizados para a RT-qPCR dos marcadores de pluripotência.

Gene	Sequência	Tamanho do amplicon
<i>OCT3/4</i>	F - AGCGAACCAGTATCGAGAAC R – TTACAGAACCACACTCGGAC	142 pb
<i>NANOG</i>	F - CTCAGCCTCCAGCAGATGC R – TAGATTTATTCTCTGGTTCTGG	94 pb
<i>SOX2</i>	F- AGGATAAGTACACGCTGCCC R – TAACTGTCCATGCGCTGGTT	115 pb
<i>L –MYC</i>	F - CGAGAGCCCAAGCGACTC R - ACCCAGAGACTGCCTCTTCT	70 pb
<i>GAPDH</i> <i>ref.</i>	F- CATGAGAAGTATGACAACAGCCT R – AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	113 pb

Tabela 8: Ciclagem utilizada para a amplificação nas reações de RT-qPCR.

Passo	Temperatura	Tempo	Ciclos
Ativação UDG	50°C	2 min	1
<i>Dual-lock DNA polymerase</i>	95°C	2 min	1
Desnaturação	95°C	15s	40-50
Anelamento/Extensão	60°C	1 min	

4.9.3 Ensaio de formação de corpos embrióides e análise da expressão gênica de marcadores de diferenciação

A capacidade de diferenciação das iPSC foi avaliada *in vitro* através do ensaio de formação de corpos embrióides (EB, do inglês, *embryonic bodies*) conforme descrito por Galera *et al.*, (2016). Para a formação dos EB, as iPSC foram fragmentadas em pedaços grandes em meio E8 a TA. Em seguida as células foram plaqueadas em placa de 6 poços de baixa aderência e mantida a 37 °C, em incubadora com CO₂ a 5 % por 5 dias sem troca de meio. Após o cultivo em suspensão, os EB foram transferidos para placa de 6 poços previamente revestidas com gelatina 0,1 % (Sigma-Aldrich, Inc, MO, USA) para diferenciação espontânea e foram mantidas a 37 °C, em incubadora com CO₂ a 5 % por mais 15 dias nos seguintes meios: Endoderme = DMEM/F12 suplementado com 20% SFB, 2 mM Glutamina, 0,1 mM β -mercaptoethanol, 1X aminoácidos não essenciais e 1X Penicilina/Estreptomicina; Mesoderme = DMEM/F12 suplementado com 20 % SFB, 2 mM Glutamina, 0,1 mM β -mercaptoethanol, 1X aminoácidos não essenciais, 100 μ M ácido

ascórbico e 1X Penicilina/Estreptomicina; Ectoderme = 50 % DMEM/F12, 50 % meio neurobasal, 1X GlutaMAX™ (2 mM), 1X aminoácidos não essenciais e 1X Penicilina/Estreptomicina, 0,1 mM β -mercaptoethanol, 1X N2 e 1X B27 (todos Gibco ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) e em todos os casos o meio foi trocado em dias alternados. Após 15 dias, as células foram coletadas para extração de RNA e síntese de cDNA (conforme descrito no item 4.8).

Após extração de RNA e síntese de cDNA, as reações de RT-PCR foram realizadas com volume final de 15 μ l, contendo: 1X Buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 0,25 mM de dNTPs, 0,4 μ M dos *primers forward* e *reverse* (tabela 9), 1,5 U de *Taq DNA polymerase recombinant* Brasil, 180 ng de cDNA. A reação foi levada ao *Veriti 96 Well Thermal Cycler* para amplificação. O resultado foi avaliado em gel de agarose 2,5 %.

Tabela 9: Sequência dos primers de RT-PCR utilizados na identificação funcional.

Gene	Sequência	Tamanho do amplicon	Função
AFP	F-AATGCTGCAAACCTGACCACGCTGGAAC R-TGGCATTCAAGAGGGTTTTCAGTCTGGA	281pb	Verificar a indução em endoderme
MSX1	F- CGAGAGGACCCCGTGGATGCAGAG R- GGCGGCCATCTTCAGCTTCTCCAG	307pb	Verificar a indução em mesoderme
PAX6	F- ACCCATTATCCAGATGTGTTTGCCCGAG R-ATGGTGAAGCTGGGCATAGGCGGCAG	317pb	Verificar a indução em ectoderme
Ciclagem			
Passo 1 (1 ciclo)	Passo 2 (10 ciclos)	Passo 3 (30 ciclo)	Passo 4 (1 ciclo)
	95°C - 45 s	95°C - 45 s	
95°C - 5 min	67°C - 45 s (-1°C/ciclo)	57°C - 30 s	68°C - 5 min
	68°C - 1 min	68°C - 1 min	

4.10 AVALIAÇÃO DA IDENTIDADE DAS iPSC

Marcadores moleculares do tipo microssatélites (D2S1779, D2S2114 e D2S443, que fazem parte da região cromossômica candidata, e D17S1783, D17S805 e D6S1610 escolhido por estarem disponíveis no laboratório) foram utilizados com a finalidade de verificar a identidade das linhagens iPSC, comparamos os alelos nas amostras de sangue e das iPSC geradas a partir delas para cada paciente. Para a amplificação dos microssatélites, o volume final de cada reação foi 10 µl, contendo entre 50 ng de DNA genômico, 0,1 µM de cada primer sendo o primer *forward* correspondente a cada um dos loci foi marcado com fluorescência, 1,5 U de Taq polimerase e 0,24 mM dCTP, 0,24 mM dTTP, 0,24 mM dGTP e 0,24 mM dATP; 1,5 mM MgCl₂, 20 mM TRIS pH = 8,4; 50 mM KCl. A reação foi levada ao termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) para amplificação cuja ciclagem utilizada foi: desnaturação inicial a 95 °C por 12 minutos, 10 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos, “*annealing*” a 55 °C por 15 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, 20 ciclos de desnaturação a 89 °C por 15 segundos, “*annealing*” a 54 °C por 15 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos, extensão final por 10 min a 72 °C. O produto da PCR foi diluído 1:8 e 0,5 µl deste foi misturado a 9,25 µl de Fromamida mais 0,25 µl de padrão de peso molecular utilizado *Size Standard GeneScan™ - 500 LIZ™* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) e corrido para separação dos fragmentos no sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA). Para análise dos dados foi utilizado o programa *GeneMarker® The Biologist Friendly Software* (SoftGenetics, LLC, State College, PA, USA).

4.11 AVALIAÇÃO QUANTO A ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS

Para detectar a presença de anormalidades cromossômicas nas regiões subteloméricas, foram realizados ensaios de Amplificação Multiplex de Sondas Dependente de Ligação (do inglês *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* – MLPA). O MLPA é uma reação que envolve a desnaturação do DNA, seguida de seu *annealing* nas sondas específicas à região cromossômica de interesse. Foram usados dois *kits* para detecção de desequilíbrios subteloméricos (P070 e P036 - MRC Holland, Amsterdam, Holanda) e o ensaio foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante, em parceria com nossos colaboradores do CEGH-CEL. A corrida das amostras para separação dos fragmentos foi realizada no

sequenciador automático ABI 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) e a análise dos dados utilizando o programa *GeneMarker® The Biologist Friendly Software* (SoftGenetics, LLC, State College, PA, USA).

4.12 AVALIAÇÃO QUANTO À OCORRÊNCIA DE INTEGRAÇÕES ESPONTÂNEAS

Para avaliar a presença de integrações espontâneas dos plasmídeos episomais utilizados nas células para estabelecimentos das iPSC, realizamos um rastreamento por PCR com dois conjuntos de *primers* diferentes (tabela 10), desenhados a partir de sequências pré-estabelecidas no *Epi5 Episomal iPSC Reprogramming Kit User Guide* (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA) para a identificação dos vetores utilizados nessa reprogramação. Foi utilizada iPSC gerada na 5ª passagem e, como controle positivo, o DNA do próprio plasmídeo.

Tabela 10: Sequência dos *primers* utilizados na PCR de avaliação de possíveis ocorrências de integrações espontâneas dos plasmídeos episomais.

Transgene	Sequência	Tamanho do amplicon	Plasmídeo episomal reconhecido
<i>OriP</i>	F-TTCCACGAGGGTAGTGAACC R-CGGGGGTGTTAGAGACAAC	544 pb	pCE-hOCT3/4 pCE-hSK pCE-hUL pCE-mP53DD
<i>EBNA-1</i>	F-ATCGTCAAAGCTGCACACAG R-CCAGGAGTCCCAGTAGTCA	666 pb	pCE-hOCT3/4 pCE-hSK pCE-hUL pCE-mP53DD pCXB-EBNA1
Ciclagem			
Passo 1	Passo 2	Passo 3	Passo 4
(1 Ciclo)	(10 Ciclos)	(30 Ciclos)	(1 Ciclo)
	95 °C - 30 s	95 °C - 30 s	
95 °C - 5 min	69 °C - 30 s (-0.5 °C/ciclo)	62 °C - 30 s	72 °C - 5 min
	72 °C - 1 min	72 °C - 1 min	

4.13 ANÁLISE PARA CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DA DUPLICAÇÃO E DA EXPRESSÃO DOS GENES ENVOLVIDOS NA DUPLICAÇÃO DO DFNA58

4.13.1 Análise para confirmação da presença da duplicação do DFNA58 nas iPSC

Para confirmar a presença da duplicação do DFNA58, foram utilizados *primers* dos genes incluídos na duplicação: *PPP3R1* (exon 1), *CNRIP1* e *PLEK* e *primers* para o gene de referência *B2M*, conforme tabela 11. Para cada reação foi utilizado *PowerUp SYBR Green Master Mix* 1X (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) e de 0,1 a 0,2 μ M de cada *primer*. Na placa de 48 poços *MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate* ou *MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip* (ambos Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA), foram adicionados 8 μ L do mix (SYBR+primers) e 2 μ L do DNA genômico a 5 ng/ μ L em cada poço. As corridas de qPCR foram realizadas no equipamento *Step One* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) obedecendo a ciclagem da tabela 8 (item 4.9.2). O modelo matemático utilizado para determinar o número de cópias dos genes incluídos na duplicação (*PLEK* exon 2, *CNRIP1* exon 3, *PPP3R1* exon 1) e gene vizinho (*FBXO48* exon 4) em comparação a uma sequência de referência (gene constitutivo *B2M*) foi o método proposto por Pfaffl (2001) que leva em consideração a eficiência dos *primers* no cálculo da quantificação relativa (figura 9).

Tabela 11: Sequência dos primers de qPCR para a detecção da duplicação.

Gene	Sequência	Onde anela?	Tamanho do amplicon
<i>CNRIP1</i>	F–AGACACGCAGTCTGATGTGG R–GTGGCATGCCTTGTTTAAGG	Exon 3 do transcrito 1 Exon 3 do transcrito 1	131 pb
<i>PPP3R1</i>	F–AGACACGCAGTCTGATGTGG R–CCTGCGCTGGTTTATCTAAAAGTAG	Exon 1 do transcrito 3 Exon 1 do transcrito 3	99 pb
<i>PLEK</i>	F–CCCATGTGGGTTGTATTGTTAG R–AGTCAGAGTGCTCCCTTTCAG	Exon 2 Exon 2	102 pb
<i>FBXO48</i>	F–CTCAGGGCTAAAGTTTGTCCA R–ACCAGGCTAGTGTGGCATTTC	Exon 4 Exon 4	129 pb
<i>B2M</i> (ref.)	F–TGTCTTTCAGCAAGGACTGG R–CAAAGTCACATGGTTCACACG	Exon 2 Exon 2	101 pb

4.13.2 Análise da expressão dos genes envolvidos na duplicação do DFNA58 por RT-qPCR

Foram utilizados *primers* para o cDNA dos três genes codificadores de proteína, assim como dos três dos quatro genes lcnRNA incluídos na duplicação e também de dois genes de referência *TBP* e *GAPDH*, conforme tabela 12. Para cada amostra foi utilizado

PowerUp SYBR Green Master Mix 1X (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA) e de 0,1 a 0,2 μ M de cada *primer*. Na placa de 48 poços *MicroAmp® Fast Optical 48-Well Reaction Plate* ou *MicroAmp™ Optical 8-Tube Strip* (ambos Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc, MA USA), foram adicionados 8 μ L do mix e 2 μ L por poço de cDNA (diluído 1:10) obtido na etapa 4.5. As corridas de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *Step One* (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) obedecendo à ciclagem da tabela 8 (item 4.9.2). O modelo matemático utilizado para determinar a quantificação relativa de cada sequência alvo em comparação a uma sequência de referência foi o método proposto por Pfaffl (2001) que leva em consideração a eficiência dos *primers* no cálculo da quantificação relativa (figura 9).

Tabela 12: Sequência dos primers para verificar o nível de expressão dos genes duplicados.

Gene	Sequência	Tamanho do amplicon
<i>CNRIP1</i>	F- TGTGACCCCAACGAAGAGTG R- CCACACTGTCTCGAAGGTCC	125 pb
<i>PPP3R1ex1 (189aa)</i>	F- CTGGAGTAGGGGGCTAGCTT R- TGGACACTGAGGTTGCATAGG	99 pb
<i>PLEK</i>	F- CTTGAGAGGCTGTGTGGTGA R- CACTCTGTGCGCTCCTTG	141 pb
<i>LOC107985892ex2F</i>	F- TGCAAGCCTGGTCCACTTTT R- GCCAGTGGGTTGTAAGACCA	152 pb
<i>LOC102724389ex1</i>	F- ACCCAGTGAGTCTTAAGTGCC R- ACTGGCCATCAGCTGAGTTT	102 pb
<i>LOC101927723ex1</i>	F- AAGCACCTGAAGGAAGGCAC R- GTCCTGTGGGCAACACCTAT	102 pb
<i>PNO1</i>	F- GAAACCAAGGATGTTAGTGCTCTG R- AGGAAGAGGTCATCCAACCTG	113 pb
<i>WDR92</i>	F- GAGACTGTTGGACTGTGGCA R- GTTTGTCTCCCACCGTAATGC	128 pb
<i>GAPDH</i>	F- CATGAGAAGTATGACAACAGCCT R- AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	113 pb
<i>TBP</i>	F- GTTCTGGGAAAATGGTGTGC R- GCTGGAAAACCCAACCTTCTG	100 pb
<i>PPP3R1-ex2F</i> <i>CNRIP1-ex2R</i>	F- AATGAGGCAAGTTATCCTTTGG R- ACAACTCTGTCCCCATCAGG	variável

5. RESULTADOS

5.1 EXPANSÃO E REPROGRAMAÇÃO DE PBMC EM iPSC POR VETORES EPISSOMAIS

Foram coletadas amostras de sangue de onze pacientes pertencentes à família DFNA58 ao longo de um ano (figura 8 e tabela 13). Desse total, nove são de indivíduos afetados que apresentam a duplicação, e duas são de não portadores da duplicação. Dos não portadores, uma é afetada por PA unilateral de causa distinta e outra pertence a uma normouvinte. Em cada coleta, compareceram de um a quatro membros da família.

Figura 10: Heredograma da família DFNA58. Os pontos de interrogação indicam as pessoas sem queixas de PA, das quais não temos exames clínicos e que estão abaixo da idade máxima de manifestação da PA observada na família. DUP e ND indicam respectivamente, presença e ausência da duplicação, em todos os casos, a duplicação encontra-se em heterozigose. Os sinais de + e - dentro do retângulo cinza indicam respectivamente, a superexpressão e a expressão normal do gene *CNRIP1*, *LOC107985892* e *LOC102724389* observadas por RT-qPCR. Retângulos vermelhos indicam as culturas que não resultaram em linhagens iPSC, retângulos verdes indicam linhagens iPSC estabelecidas.

As PBMC coletadas dos pacientes foram submetidas à expansão por 11-14 dias (tabela 13), com trocas de meio em dias alternados. Para que as células mantivessem um crescimento adequado e não houvesse morte por limitação de espaço para crescimento, as mesmas foram submetidas ao *Split* (divisão – técnica que permite manter a cultura de células viva e em crescimento, consistindo em transferir parte das células de uma cultura anterior para um novo poço/placa ou garrafa contendo meio de crescimento fresco) a cada 4-5 DIV dependendo do crescimento celular, que por sua vez foi avaliado por meio de contagem do número de células viáveis em câmara de *Neubauer* no 7º DIV e no último DIV (11-15 dias) antes da transfecção. Do total de onze amostras iniciais, apenas cinco atingiram o número mínimo de PBMC para poder prosseguir com a transfecção (tabela 13). Para considerarmos uma expansão bem sucedida foi necessário ao menos 3×10^6 (1×10^6 para congelamento, extração de RNA e para a transfecção).

Dessas cinco amostras, quatro eram de afetados (VI:2, V:25, VI:7 e IV:4) da família e portadores da duplicação (sendo um do sexo masculino e os demais, feminino) e uma amostra era de um indivíduo normouvinte (V:19, sexo feminino). Todas as cinco amostras foram submetidas a reprogramação por nucleoporação com plasmídeos episomais e ao final de todo o processo, dentre as cinco, somente três linhagens de iPSC foram estabelecidas com sucesso: VI:7 e IV:4 pertencente aos indivíduos afetados e com a duplicação e o controle normouvinte; V:19 (tabela 13). Após a nucleoporação, as primeiras colônias foram observadas aproximadamente em 15 dias para a linhagem normouvinte (V:19) e repicadas no 20º DIV, enquanto que em ambas as linhagens obtidas de indivíduos afetados portadores da duplicação (VI:7 e IV:4), as primeiras colônias surgiram em 18 dias e repicadas no 24º DIV. Foram observadas grandes alterações na morfologia das células reprogramadas das três amostras (V:19, VI:7 e IV:4) que passaram de um estado de células individualizadas, pequenas e arredondadas que crescem em suspensão para uma morfologia de células pequenas, justapostas, aderidas e de crescimento em colônias, similar as CTe (figuras 11, 12 e 13).

Tabela 13: Relação de todas as amostras que foram utilizadas para a reprogramação com vetores episomais, com a descrição de todas as etapas do experimento e sua conclusão, ou seja, a obtenção ou não da linhagem iPSC.

Paciente	Sexo	Idade	DUP/ ND	PASNBPP/ QCD/ Normouvinte	Local da expansão/ transfecção	Dias em expansão	Expansão bem sucedida	Nº células obtida pós- expansão	Nº células transfectadas	Dias em cultura pós transfecção (Surgimento dos clones)	Nº de colônias obtidas	Primeiro repique	Linhagem estabelecida
VI:2	M	40	DUP	PASNBPP	CEGH-CEL	12	Sim	4x10 ⁶	1x10 ⁶	----	0	----	Não
V:25	F	35	DUP	PASNBPP	CEGH-CEL	12	Sim	3x10 ⁶	1x10 ⁶	----	0	----	Não
V:7	F	51	DUP	PASNBPP	NUCEL	15	Não	----	----	----	----	----	Não
IV:22	F	51	DUP	PASNBPP	NUCEL	15	Não	----	----	----	----	----	Não
IV:19	F	56	DUP	PASNBPP	NUCEL	15	Não	----	----	----	----	----	Não
V:9	F	45	DUP	PASNBPP	NUCEL	15	Não	----	----	----	----	----	Não
V:12	F	58	DUP	PASNBPP	NUCEL	15	Não	----	----	----	----	----	Não
V:19	F	45	ND	Normouvinte	NUCEL	14	Sim	3,5x10 ⁶	1x10 ⁶	15	5	20º dia	Linhagem estabelecida
IV:21	F	46	ND	QCD	NUCEL	15	Não	----	----	----	----	----	Não
VI:7	F	35	DUP	PASNBPP	CEGH-CEL	11	Sim	4x10 ⁶	1x10 ⁶	18	4	24º dia	Linhagem estabelecida
IV:4	F	75	DUP	PASNBPP	CEGH-CEL	11	Sim	3x10 ⁶	1x10 ⁶	18	4	24º dia	Linhagem estabelecida
Total: 11	F: 10 M: 1	----	¹ DUP: 9 ND: 2	² PASNBPP: 9 Normouvinte: 1 QCD:1	CEGH-CEL: 4 NUCEL: 7	----	Sim: 5 Não: 6	----	----	----	----	----	Não: 8 Estabelecida com sucesso: 3

¹ Portador da duplicação (DUP)/Não portador da duplicação (ND)

² Afetado por PASNBPP (perda auditiva sensorioneural bilateral pós-lingual e progressiva)/ Quadro clínico distinto (QCD)/Normouvinte

Todas as colônias obtidas das três linhagens foram isoladas individualmente, onde cada colônia representa um clone. Foram obtidos: cinco clones da iPSC V:19 (clone 1, 2, 3, 4 e 5), quatro da VI:7 (clone 1, 2, 3 e 4) e quatro clones da IV:4 (clone 1, 2, 3 e 4). Estes clones foram expandidos no mínimo até a 2ª e no máximo até a 10ª passagem (tabela 14), sendo os clones 4 (V:19), 1 (VI:7) e 3 (IV:4) utilizados para todos os experimentos.

Tabela 14: Relação do total de *vials* por passagem, em destaque os clones utilizados nesse trabalho.

Paciente	Clone	Total de <i>vials</i>	Quantidade de <i>vials</i> por Passagem (P)
V:19	1	9	P1=3 P2=3 e P3=3
	2	9	P1=3 P2=3 e P3=3
	3	9	P1=3 P2=3 e P3=3
	4	23	P1=3; P2=3; P3=2; P5=2; P6=2; P7=2; P8=3; P9=3; P10=3
	5	9	P1=3 P2=3 e P3=3
VI:7	1	23	P1=3; P2=3; P3=2; P5=2; P6=2; P7=2; P8=3; P9=3; P10=3
	2	6	P1=3 e P2=3
	3	6	P1=3 e P2=3
	4	6	P1=3 e P2=3
IV:4	1	6	P1=3 e P2=3
	2	6	P1=3 e P2=3
	3	23	P1=3; P2=3; P3=2; P5=2; P6=2; P7=2; P8=3; P9=3; P10=3
	4	6	P1=3 e P2=3

Figura 11: Imagens do processo de reprogramação da iPSC V:19, mostrando a alteração de morfologia celular, onde as células passam de individualizadas com crescimento em suspensão para células com crescimento em colônias similar a CTe. A: células após 14 dias de cultivo, pré-nucleofecção. Barra de escala: 200 μm . B: Células aderidas ao Matrigel seis dias após nucleofecção. Barra de escala: 200 μm . C: Primeira colônia de iPSC obtida 18 dias de cultivo após nucleofecção. Barra de escala: 1000 μm . D: Colônia de iPSC na 10ª passagem. Barra de escala: 1000 μm . Imagens em contraste de fase. Microscopia óptica (EVOS™ XL Core Imaging System – Thermo Fisher Scientific).

Figura 12: Imagens do processo de reprogramação da iPSC VI:7 mostrando a alteração de morfologia celular, onde as células passam de individualizadas com crescimento em suspensão para células com crescimento em colônias similar a CTe. A: Células após 11 dias de cultivo, pré-nucleofecção. Barra de escala: 200 μm . B: Células dois dias após a nucleofecção. Barra de escala: 200 μm . C: Primeira colônia de iPSC 24 dias de cultivo após nucleofecção. Barra de escala: 1000 μm . D: Colônia de iPSC na 10ª passagem. Barra de escala: 1000 μm . Imagens em contraste de fase. Microscopia óptica (EVOS™ XL Core Imaging System – Thermo Fisher Scientific).

Figura 13: Imagens do processo de reprogramação da iPSC IV:4 mostrando a alteração de morfologia celular, onde as células passam de individualizadas com crescimento em suspensão para células com crescimento em colônias similar a CTe. A: Células após 11 dias de cultivo, pré-nucleofecção. Barra de escala: 200 μm . B: Células dois dias após a nucleofecção. Barra de escala: 200 μm . C: Primeira colônia de iPSC 24 dias de cultivo após nucleofecção. Barra de escala: 1000 μm . D: Colônia de iPSC na 10ª passagem. Barra de escala: 1000 μm . Imagens em contraste de fase. Microscopia óptica (EVOS™ XL Core Imaging System – Thermo Fisher Scientific).

Cabe destacar que após o estabelecimento das linhagens, foram realizados ensaios de PCR para detecção de contaminação por micoplasma após a 5ª passagem. Podemos ver na figura 14 que todas as linhagens se mostraram negativas quanto a presença de micoplasma nas culturas.

Figura 14: Imagem do gel de agarose 2,5 % representativo da eletroforese da PCR para detecção de contaminação por micoplasma por meio do *MycoScope kit* com todas as linhagens iPSCs geradas. CTLE+: controle positivo fornecido pelo fabricante; CTLE-: controle negativo e PM: marcador de 100 pb. Gel corado com SYBR Safe – Thermo Fisher Scientific.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS iPSC DERIVADAS DE PBMC

As iPSC de PBMC, geradas a partir da inserção de vetores episomais, proliferaram-se com robustez sob condições de cultura de iPSC, mantendo-se indiferenciadas e morfologicamente iguais por 10 passagens. Todas as linhagens de iPSC mostraram uma morfologia de células justapostas de crescimento em colônias, característica de células-tronco pluripotentes (Figuras 11D, 12D e 13D). No entanto, para confirmarmos que de fato o método foi capaz de gerar colônias pluripotentes, foram realizadas: (i) avaliação qualitativa da pluripotência por RT-PCR e imunofluorescência, e quantitativa por RT-qPCR, (ii) avaliação do potencial de diferenciação através da formação de corpos embrióides, (iii) avaliação quanto a presença de anormalidades cromossômicas e (iv) a avaliação quanto à presença de integrações espontâneas.

5.2.1 Caracterização quanto ao potencial pluripotente

5.2.1.1 Análise qualitativa quanto ao potencial pluripotente

Foram desenhados *primers* para os cinco fatores de pluripotência Oct4/Sox2/Klf4/L-Myc/Lin28 (fatores OSKM) e Nanog. A expressão de cada marcador foi confirmada na iPSC por meio de RT-PCR em todas as três linhagens iPSC (figura 15). Como controle negativo foram utilizadas PBMC pré-reprogramação.

Figura 15: Imagem do gel de agarose 2,5 % representativo da eletroforese da RT-PCR para análise dos fatores de pluripotência. A: *OCT4* (fragmento de 142pb), B: *LIN28* (122pb), C: *KLF4* (318pb), D: *NANOG* (200pb), E: *SOX2* (323pb), F: *L-MYC* (291pb) G: gene de referência (*GAPDH*, fragmento de 414pb). A presença de bandas escuras (com grande intensidade) indica a presença dos fatores de pluripotência, enquanto que a ausência ou a presença de bandas claras (com baixa intensidade) indica a ausência de quantidade significativa dos fatores de pluripotência. O gene *GAPDH* foi usado como referência, portanto, apresenta intensidade de amplificação semelhante em todas as amostras. CTLE-: controle negativo e PM: marcador de 100pb. Gel corado com SYBR Safe – Thermo Fisher Scientific.

Os ensaios de imunofluorescência realizados com a linhagem da paciente V:19 confirmaram a presença de quatro marcadores de pluripotência, Sox2, Klf4, L-Myc e Lin28 (figura 16). Para as iPSCs das pacientes VI:7 e IV:4, os mesmos ensaios foram realizados, porém não foi possível a captura das imagens, pois as colônias se mantiveram nas bordas da placa, onde o equipamento não consegue fazer a leitura, além disso, constatamos que a análise com *High Content Screening system* não é a melhor abordagem para visualização das células em colônia, sendo assim, será repetida a imunofluorescência, mas dessa vez com a adesão das células em sistema de montagem de lâminas/lamínulas para análises em microscopia de imunofluorescência e/ou confocal.

Figura 16: Imunofluorescência indireta da iPSC da paciente V:19 mostrando a expressão dos marcadores de pluripotência SOX2, KLF4, L-MYC e LIN28. Núcleos foram corados com DAPI (azul). *ImageXpress Micro High Content Screening system* (Molecular Devices)

5.2.1.2 Análise quantitativa quanto ao potencial pluripotente

O ensaio de RT-qPCR (figura 17) foi utilizado para a quantificação da expressão dos genes de pluripotência *L-MYC*, *SOX2*, *OCT4* e *NANOG*. As PBMC apresentaram níveis indetectáveis de *SOX2* e *L-MYC* e as iPSC, limiares de detecção de amplificação (Ct) ao redor de 23 ciclos, quando utilizamos 40 ng a 100 ng de cDNA na reação de RT-qPCR. Para a amplificação de *SOX2* (Ct 40) e *L-MYC* (Ct 40) em PBMC foram necessários 500 ng de cDNA. Foi estimado que as iPSC expressaram 500X, 27.000X, e 125X vezes mais *OCT4*, *SOX2* e *NANOG*, respectivamente, do que na amostra parental.

Ambas as técnicas (RT-PCR e RT-qPCR) confirmaram o potencial pluripotente dessas células.

Figura 17: Análise da expressão dos marcadores pluripotência por RT-qPCR. Quantificação da expressão relativa dos genes *L-MYC*, *SOX2*, *OCT4* e *NANOG*. As reações individuais de RT-qPCR foram normalizadas em relação aos genes de referência (*TBP* e *GAPDH*) e plotadas em relação ao nível de expressão da célula parental (PBMC).

5.2.2 Caracterização quanto ao potencial de diferenciação

As iPSC foram capazes de formar estruturas esféricas denominadas corpos embrióides (EB) quando cultivadas em suspensão em condições específicas (vide métodos). Os EB são estruturas formadas pelo cultivo *in vitro* a partir de células pluripotentes, os quais possuem capacidade de desenvolvimento de diversos tipos celulares e tecidos. Após a formação dos EB, as células foram cultivadas aderidas com meios específicos para sua diferenciação em endoderme, mesoderme e ectoderme (figura 18).

Figura 18: Ensaio de diferenciação *in vitro*. A-D paciente V:19 sem a duplicação, E-H paciente VI:7 com duplicação e I-L paciente IV:4 com duplicação. A, E e I: imagens da formação dos corpos embrióides. B, F e J: imagens com a confirmação do potencial de diferenciação das iPSC em endoderme. C, G e K: imagens com a confirmação do potencial de diferenciação das iPSC em mesoderme. D, H e L: imagens com a confirmação do potencial de diferenciação das iPSC em ectoderme, seta vermelha= formação de pequena colônia. Barra de escala 200 μ m: A, E e I; B, C, D, F, G, H, J, K e L 100 μ m. Imagens em contraste de fase. Microscopia óptica (EVOS™ XL Core Imaging System – Thermo Fisher Scientific).

As três linhagens apresentaram a mesma capacidade de gerar os EB (figura 18A, E e I), quanto a diferenciação em endoderme, é possível ver que a iPSC da normovinte (V:19) e afetada (VI:7) apresentam morfologia semelhante na colônia (figura 18B e F), porém a afetada IV:4 não permaneceu em colônia e apresentou células dispersas (figura 18J), o que não foi visto nas demais células. Quanto a mesoderme, foi possível observar um padrão claro de colônia apenas nas células da paciente VI:7 (figura 18G), enquanto que nas células da paciente V:19 ainda em colônia, apresentaram algumas células dispersas (figura 18C) e as células de IV:4 não se mantiveram em colônias (figura 18K). A diferenciação em ectoderme se mostrou distinta para cada uma das células. As células de V:19 e VI:7 apresentaram células se “desprendendo” dos EB (figura 18D e H) semelhante às culturas de tecido com a técnica explante (técnica de estabelecimento de culturas primárias onde pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo, posteriormente desinfetados e cultivados assepticamente até que as células se desprendam do tecido), ainda que semelhantes, podemos notar que apenas as células de V:19 começaram a formar uma pequena colônia (seta vermelha na figura 18D). Já as células de IV:4 não apresentaram formação de colônias e não se mantiveram em cultura semelhante ao explante (figura 18L).

Apesar de todas as diferenças em relação a morfologia aqui descritas, a amplificação de genes por RT-PCR demonstrou que, após a diferenciação, todas as células expressam os marcadores de endoderme (*AFP*), mesoderme (*MSX1*) e ectoderme (*PAX6*), enquanto que o mesmo não foi observado no controle negativo (iPSC não diferenciada) [Figura 19].

Figura 19: Imagem do gel de agarose 2,5 % representativo da eletroforese da RT-PCR para análise dos marcadores dos três folhetos embrionários. A: *AFP* (fragmento de 281pb), B: *MSX1* (fragmento de 307pb), C: *PAX6* (fragmento de 317pb). Presença de bandas escuras (com grande intensidade) indica a presença dos marcadores dos folhetos embrionários, enquanto que a ausência de bandas indica a ausência dos marcadores. CTLE-: controle negativo e PM: marcador de 100 pb. Gel corado com SYBR Safe – Thermo Fisher Scientific.

5.3 AVALIAÇÃO QUANTO À OCORRÊNCIA DE INTEGRAÇÕES ESPONTÂNEAS NAS iPSC

Para avaliar a ocorrência de integração dos vetores pCE-hOCT3/4, pCE-hSK, pCE-hUL, pCE-mP53DD e pCXB-EBNA1 foi realizada uma reação de PCR com o DNA das iPSC na 5ª passagem, como controle positivo foi utilizado DNA do plasmídeo utilizado na reprogramação. Foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 2,5 % (figura 20), que mostrou amplificação de ambos os vetores apenas no controle positivo, o que indica que não ocorreu integração do vetor em nenhuma iPSC estabelecida.

Figura 20: Imagem do gel de agarose 2,5 % da eletroforese representativo da reação de amplificação da região Orip presente nos vetores pCE-hOCT3/4, pCE-hSK, pCE-hUL, pCE-mP53DD e da reação de amplificação da região EBNA-1 presente no vetor pCXB-EBNA1 realizada em todas as linhagens de iPSC. CTLE-: controle negativo e PM: marcador de 100pb. Gel corado com SYBR Safe – Thermo Fisher Scientific.

5.4 AVALIAÇÃO QUANTO A ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS

Foram realizadas análises de MLPA para detectar a presença de possíveis anormalidades cromossômicas nas iPSC, evento que pode ocorrer em diversas culturas de células tronco (AMPS *et al.*, 2011). Na figura 21 temos os gráficos com os resultados plotados de todas as sondas analisadas pertencentes aos *kits* com sondas subteloméricas P070 e P036, para as três iPSC. Os resultados são considerados anormais quando a proporção relativa da altura do pico está abaixo de 0,70 ou acima de 1,30. Apesar de ter sido observado algumas alterações em relação às sondas do *kit* P070 para a iPSC V:19, o mesmo resultado não foi observado para as sondas do *kit* P036, onde todas as iPSCs apresentaram resultados normais. Dessa forma, concluímos que as linhagens estudadas não apresentam anomalias nos cromossomos, quanto às sondas subteloméricas pesquisadas.

Figura 21: Análise de MLPA das linhagens iPSC V:19, VI:7 e IV:4 mostrando ausência de anormalidades cromossômicas. Na imagem temos os gráficos dos resultados obtidos com as sondas dos *kits* P070 e P036. As sondas subteloméricas estão representadas com os pontos azuis e as sondas controle com pontos verdes e vermelhos.

5.5 IDENTIDADE DAS iPSC

Utilizamos marcadores moleculares do tipo microssatélites para confirmar a identidade das iPSC, dessa forma, amostras originadas da mesma pessoa devem apresentar os mesmos picos, que representam os alelos, como verificamos de fato nas figuras 22, 23 e 24. Para este experimento, poderíamos ter utilizado qualquer conjunto de marcadores polimórficos e, nesse caso, os microssatélites são ideais por serem altamente polimórficos. Utilizamos os marcadores que estavam disponíveis no laboratório. Os marcadores D2S1779, D2S2114 e D2S443 estão dentro da região cromossômica candidata, os demais foram escolhidos aleatoriamente.

Figura 22: Microsatélites analisados confirmando a identidade da iPSC da paciente V:19. Os gráficos acima indicam os picos de fluorescência dos alelos (cada pico representa um alelo) amplificados com os *primers* referentes aos marcadores: D2S1779 (heterozigoto, fragmentos de 137 pb e 149 pb), D2S2114 (heterozigoto, fragmentos de 150 pb e 152 pb), D2S443 (heterozigoto, fragmentos de 230 pb e 238 pb), D17S1783 (heterozigoto, fragmentos de 134 pb e 136 pb), D17S805 (heterozigoto, fragmentos de 222 pb e 224 pb) e D6S1610 (heterozigoto, fragmentos de 128 pb e 132 pb). 1= Amostra de sangue da paciente e 2= amostra da iPSC.

Figura 23: Microsatélites analisados confirmando a identidade da iPSC da paciente VI:7. Os gráficos acima indicam os picos de fluorescência dos alelos (cada pico representa um alelo) amplificados com os *primers* referentes aos marcadores: D2S1779 (heterozigoto, fragmentos de 137 pb e 140 pb), D2S2114 (heterozigoto, fragmentos de 146 pb e 150 pb), D2S443 (heterozigoto, fragmentos de 234 pb e 238 pb), D17S1783 (heterozigoto, fragmentos de 128 pb e 136 pb), D17S805 (homozigoto, fragmento de 222 pb) e D6S1610 (heterozigoto, fragmentos de 134 pb e 138 pb). 1= Amostra de sangue da paciente e 2= amostra da iPSC.

Figura 24: Microsatélites analisados confirmando a identidade da iPSC da paciente IV:4. Os gráficos acima indicam os picos de fluorescência dos alelos (cada pico representa um alelo) amplificados com os primers referentes aos marcadores: D2S1779 (homozigoto, fragmento de 137 pb), D2S2114 (heterozigoto, fragmentos de 150 pb e 154 pb), D2S443 (heterozigoto, fragmentos de 230 pb e 238 pb), D17S1783 (heterozigoto, fragmentos de 132 pb e 134 pb), D17S805 (heterozigoto, fragmentos de 220 pb e 222 pb) e D6S1610 (heterozigoto, fragmentos de 128 pb e 138 pb). 1= Amostra de sangue da paciente e 2= amostra da iPSC.

5.6 AVALIAÇÃO QUANTO À PRESENÇA DA DUPLICAÇÃO E DOS GENES ENVOLVIDOS

5.6.1 Avaliação quanto à presença da duplicação

A presença da duplicação nas linhagens derivadas do sangue de portadoras da duplicação foi confirmada por meio de qPCR (figura 25). Os histogramas relativos ao gene *FBXO48* não apresentam desvio padrão, pois foram realizados em monoplicata, pois os insumos acabaram e, estamos no aguardo da liberação da compra de novos reagentes.

Figura 25: Análise da expressão dos genes incluídos na duplicação e de gene vizinho (*FBXO48*) por qPCR evidenciando que as linhagens iPSC derivadas do sangue de portadores duplicação preservaram a duplicação. Valores ao redor de 1.5 indicam 1 cópia extra do segmento que contém os genes *PLEK*, *CNRIP1* e *PPP3R1* nas iPSC de VI:7 e IV:4, mas número normal de cópias do exon 4 do gene *FBXO48*, vizinho ao segmento duplicado, quando comparamos a iPSC de V:19 (não portadora da duplicação).

5.6.2 Análise de expressão dos genes contidos na duplicação

Conforme mencionado acima e no *paper* Lezirovitz *et al.*, 2020, foi observada superexpressão do gene codificador de proteína *CNRIP1*, como também dos genes lncRNA ainda não caracterizados *LOC102724389* e *LOC107985892*. Por isso, analisamos a expressão destes e dos demais genes incluídos na duplicação nas amostras das iPSC. Semelhante ao que

foi observado no sangue dos pacientes, também verificamos a superexpressão de *CNRIP1*, *LOC102724389* e *LOC107985892* (figura 26). Observamos superexpressões médias de 6,2X, 5,5X e 6,6X, respectivamente para estes genes. Quanto ao exon 1 do gene *PPP3R1* e o gene *PLEK* foi observada leve superexpressão, 2X e 1,8X respectivamente quanto a média dos dois afetados portadores da duplicação em relação ao não duplicado. Já para o gene de lncRNA *LOC101927723*, foi observada hiper-regulação de 570X, enquanto na amostra da paciente sem a duplicação a expressão deste gene estava muito próxima ao limite de detecção da nossa RT-qPCR. A análise de expressão dos genes vizinhos a duplicação a 3' do gene *PPP3R1* não mostraram diferença entre duplicados e não duplicado. Seria interessante repetir os experimentos com todos os genes, seja com os mesmos *primers* ou com novos, talvez incluir iPSC de controle de fora da família, para obter desvios padrão menores, embora os valores não deixem dúvidas que há aumento significativo da expressão dos genes, já observada no sangue, além de mais um gene com expressão alterada.

Como o RNA das pacientes com duplicação VI:7 e IV:4 não chegou a tempo de entrar no *paper* Lezirovitz *et al.*, (2020), não tinha sido feita a reação para amplificar os transcritos de fusão anormais envolvendo exons do *CNRIP1* e *PPP3R1*. De fato, a partir do sangue da paciente IV:4 conseguimos amplificar transcrito de fusão e o sequenciamento revelou ser semelhante aos transcritos de fusão mais comuns observados entre os demais afetados. No entanto, não foi possível amplificar transcrito de fusão a partir das iPSC obtidas a partir das portadoras da duplicação e da não portadora, e também a partir do sangue de VI:7.

Figura 26: Análise de expressão dos genes envolvidos na duplicação nas iPSC por RT-qPCR. Análises de genes vizinhos a duplicação.

6. DISCUSSÃO

6.1 ESTABELECIMENTO DE iPSC A PARTIR DAS PBMC POR VETORES EPISSOMAIS E SUA CARACTERIZAÇÃO

O estabelecimento de linhagens iPSC necessita que inúmeras escolhas de abordagens sejam feitas no decorrer do processo e que podem ter impacto no sucesso final. Fez-se necessário escolher a fonte de células, meios e fatores de crescimento para expansão, método de transfecção, meios e fatores de crescimento após a transfecção, etc. Quanto à fonte de células, estudos na literatura específica frequentemente utilizam fibroblastos dermais para indução das iPSC, por oferecerem uma eficácia maior. Nos trabalhos que estabeleceram iPSC de pacientes com PA genética, quinze foram a partir de fibroblastos, oito a partir de sangue e dois a partir de urina. No entanto, a obtenção de fibroblastos dermais requerem biópsias de pele por meio de um explante da pele (muitas vezes do antebraço), um procedimento que além de invasivo, precisa que as células sejam expandidas por 2-3 semanas para obtenção das primeiras células (ZHANG, 2013). Neste trabalho, foi utilizado sangue periférico, pois é uma fonte de células mononucleares (PBMC) que não requer biópsias e sua obtenção é menos invasiva. As células PBMC podem ser obtidas em abundância a partir de uma pequena amostra de sangue de punção venosa (1.5×10^6 de células por mL) e o cultivo pré-transfecção

das PBMC é um dos menos demorados (cerca de 15 dias). Também contribuiu para essa escolha o fato de que o protocolo estava em padronização no laboratório e, por isso, a coleta de mais de uma amostra do mesmo paciente poderia ser necessária, o que favorece a maior concordância com o procedimento por parte dos pacientes.

As PBMC coletadas dos pacientes deste estudo foram submetidas a uma expansão em meio específico para enriquecimento da população eritroblastóide, contendo eritropoietina (EPO, do inglês *erythropoietin*) e fator de crescimento de CT (SCF, do inglês *stem cell factor*). O EPO é um hormônio glicoproteico, que influencia a produção de células progenitoras de eritrócitos por meio da eritropoiese, um processo essencial para a formação contínua de novos glóbulos vermelhos. Como as células progenitoras têm baixa sensibilidade a EPO, é necessária à adição de outros fatores para sobrevivência e proliferação celular. Nesse caso, é indicado o SCF (HAYAT *et al.*, 2008). Em conjunto, essas duas citocinas favoreceram o crescimento exclusivo das células progenitoras, que são utilizadas na nucleofecção. Dessa forma, acaba havendo uma seleção na qual as células que não são progenitoras de eritroblastos morrem nos primeiros sete dias de cultura. No início, realizamos as primeiras culturas no NUCEL, lá tivemos dificuldades quanto a padronização das frequências de troca dos meios das PBMC, como resultado, as células dos pacientes V:7, IV:22, IV:19, V:9, V:12 e IV:21, não expandiram corretamente. Houve uma grande diferença entre o número de culturas de PBMC no NUCEL que não foram bem sucedidas, em relação ao CEGH-CEL (tabela 13), apesar desta diferença, não podemos concluir que ela se deve às pequenas diferenças entre ambos os protocolos, ou a manipulação, uma vez que não foram realizados maiores testes para determinar a eficiência entre os protocolos.

As células pertencentes aos pacientes VI:2, V:25, VI:7 e IV:4 V:19 apresentaram um bom crescimento durante a fase de expansão, porém, não obtivemos sucesso na reprogramação dos pacientes VI:2 e V:25. Por outro lado, a reprogramação das pacientes V:19, VI:7 e IV:4 foi realizada de forma eficiente, resultando em cinco colônias para V:19 e quatro para VI:7 e IV:4. CTe e iPSC são definidas unicamente pelo seu potencial de diferenciação pluripotente e a habilidade de auto-renovação ilimitada (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Apesar dessa aparente vantagem quanto à eficiência de reprogramação da linhagem normouvinete comparada com as duas linhagens dos pacientes (relatada no item 5.1), não podemos relacionar isso com a presença ou ausência da duplicação uma vez que elas foram obtidas em colaboração com laboratórios diferentes, em períodos diferentes e com pequenas diferenças nos protocolos das etapas de expansão das PBMC (tabela 4, item 4.4.2) e

reprogramação em iPSC (item 4.4.3). A inclusão de uma amostra controle normal oriunda do mesmo laboratório onde as linhagens das portadoras da duplicação foram obtidas pode auxiliar na discriminação de quais diferenças são devidas ao protocolo e quais devidas a presença da duplicação.

A escolha do método de transfecção dos fatores de pluripotência precisa levar em conta não só a taxa de eficiência da transfecção, mas também as necessidades técnico-estruturais e os efeitos colaterais não só para a linhagem, mas também no que se refere ao objetivo final da maioria desses protocolos que é a translação para a prática clínica.

Durante a embriogênese dos mamíferos, a partir do momento em que as células do primeiro estágio de desenvolvimento iniciam sua diferenciação em linhagens celulares distintas, elas perdem gradualmente seu potencial de pluripotência. O estado de pluripotência *in vivo* é transiente, porém *in vitro* as CTe mantêm essa capacidade indefinidamente (SHI; JIN 2010). No presente trabalho, demonstramos o estabelecimento de três linhagens de iPSC, obtidas a partir das PBMC de uma paciente normovintes (não portadora da duplicação) e duas pacientes afetadas (portadoras da duplicação) da família DFNA58, através de nucleoporação dos vetores episomais expressando os fatores Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 e Lin28 e que também carrega a informação para fazer o shRNA para silenciamento do gene p53. Esses vetores baseiam-se na inclusão do gene *EBNA1* e da sequência OriP (Origem de replicação plasmidial) do vírus Epstein-Barr, permitindo que um plasmídeo, após uma única transfecção, se replique extra-cromossomicamente, como um epissoma circular, em vários tipos celulares (LINDNER; SUGDEN, 2007). As iPSC são obtidas a partir da expressão induzida dos fatores relacionados à pluripotência, e knockdown da expressão do p53, revertendo o estado adulto a um semelhante ao embrionário. A introdução desses genes exógenos ativa a expressão de genes endógenos pertencentes à rede autorregulatória transcricional de pluripotência. A regulação positiva dos fatores endógenos leva ao silenciamento dos genes exógenos através da metilação dos promotores dos plasmídeos. Em iPSC totalmente reprogramadas os fatores exógenos estão silenciados e a manutenção da pluripotência é inteiramente dependente do circuito transcricional endógeno (HOTTA; ELLIS, 2008; JAENISCH; YOUNG, 2008) e além disso, os vetores episomais, usados neste estudo, são usualmente eliminados nas divisões celulares geralmente após 10^a passagem (OKITA *et al.*, 2011), mas integrações podem ocorrer (SCHLAEGER *et al.*, 2015). A nucleoporação é um método de transferência de DNA para células de mamíferos, com base no método físico de eletroporação, onde uma combinação de corrente e tensão (parâmetros

elétricos) e reagentes específicos para o tipo celular de interesse ocasionam a formação de poros na membrana celular, permitindo que o material genético transfectado seja transferido diretamente para o citoplasma celular e núcleo. A reprogramação de células sanguíneas por nucleofecção é um processo altamente complexo, com baixa taxa de eficácia ($P < 0.05$) [OKITA *et al.*, 2011]. Apesar da utilização de vetores virais oferecerem uma taxa de eficácia mais elevada, eles tipicamente envolvem desvantagens como riscos de segurança devido à inserção no genoma do hospedeiro, em locais que potencialmente podem causar câncer, portanto o uso de métodos onde não ocorre a integração para gerar iPSC podem ser utilizados em ambientes clínicos. Além disso, a manipulação de vírus em laboratório requer nível de biossegurança adicional, acarretando em maior demanda de infra-estrutura, equipamentos e insumos.

As análises quanto ao potencial de pluripotência das nossas células comprovaram que de fato obtivemos iPSC. Na maioria dos estudos, as análises utilizadas para testar o potencial de pluripotência incluem RT-PCR e/ou RT-qPCR que busca constatar a regulação positiva de genes de pluripotência, imunofluorescência para detecção de marcadores de pluripotência e formação de corpos embrióides para testar a capacidade de diferenciação em células/tecidos dos três folhetos embrionários *in vitro*, como ilustrado na tabela 3 (ZHANG; DE ALMEIDA; WU, 2012). Todas as linhagens de iPSC estabelecidas apresentaram a presença de todos os fatores OSKM descritos por Okita *et al.*, (2011) por RT-PCR. Como o RT-PCR nos dá a informação de presença e ausência, ele não é o método ideal para analisar pequenas diferenças de expressão gênica, como por exemplo, o gene *KLF4* ou o gene *NANOG*, que possuem expressão nas PBMC, resultando em bandas de fraca intensidade. Por essa razão, a fim de analisar as pequenas diferenças, realizamos ensaios de RT-qPCR dos fatores L-Myc, Sox2, Oct4 e Nanog. Ensaios de imunofluorescência para as células obtidas da paciente normovinte V:19 também foram realizados e não deixam dúvidas quanto ao potencial pluripotente destas células. No entanto, como dito anteriormente, a técnica de captura das imagens utilizada não mostrou ser a melhor abordagem para ver as colônias como um todo, mas apenas fragmentos. Para solucionar esta questão, foram realizados novos ensaios de imunofluorescência com todas as linhagens estabelecidas e desta vez em sistema de lâminas/lamínulas para aquisição das imagens em microscopia de imunofluorescência e/ou confocal, porém ainda não foi possível realizar a captura das imagens devido a paralisação dos laboratórios parceiros por conta da pandemia.

CTe e iPSC são definidas pelo seu potencial de diferenciação pluripotente e a habilidade de auto-renovação ilimitada (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006; THOMSON *et al.*, 1998), o teste mais efetivo para avaliar a capacidade das iPSC em formar tecidos de todos os três folhetos embrionários *in vivo* é na forma de tumores encapsulados denominados teratomas (BRIVANLOU *et al.*, 2003; HENTZE *et al.*, 2009; NELAKANTI; KOOREMAN; WU, 2015). Uma alternativa *in vitro* importante para o ensaio de teratoma é uma abordagem envolvendo a geração de EB a partir de iPSC. Os EB são agregados de células tridimensionais formadas em cultura não aderente a partir de células pluripotentes, que se assemelham a estrutura do embrião em desenvolvimento possuindo assim a capacidade de se diferenciar em células de todos três folhetos embrionários (JAENISCH; YOUNG, 2008). A formação de EB é uma abordagem frequentemente utilizada no estágio inicial da diferenciação das iPSC em diferentes linhagens celulares (KUROSAWA, 2007).

Para testar a capacidade de diferenciação em células dos três folhetos embrionários *in vitro*, todas as linhagens de iPSC foram submetidas a ensaios de formação de EB e depois estes foram submetidos a diferenciação nos três tecidos embrionários. Todas as linhagens se mostram capazes de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários (capacidade comprovada pela amplificação de genes expressos em cada folheto por RT-PCR). Resultado semelhante foi encontrado por Galera *et al.*, (2016) onde os EB, após serem submetidos a condições específicas no meio de cultura (como por exemplo a adição de ácido ascórbico para estabelecimento da mesoderme e meio neurobasal com N2 e B27 para ectoderme), expressaram os marcadores correspondentes a endoderme, mesoderme e ectoderme. Como dito anteriormente, apesar das diferenças observadas na morfologia entre as iPSC da normotípica e afetadas, todas as linhagens se mostraram capazes de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários. Não foram encontrados relatos na literatura quanto a diferença entre morfologia de EB ou de células dos folhetos embrionários entre pacientes afetados e não afetados por uma variante patogênica, porém em geral, as diferenças nos ensaios funcionais das iPSC podem ser proporcionadas pela variabilidade genética, induzida durante a reprogramação ou como uma característica da instabilidade genômica subjacente à doença estudada (BURROWS *et al.*, 2016), sendo assim serão necessários mais estudos a fim de determinar se as diferenças encontradas são relacionadas a duplicação do DFNA58 e ainda se essas diferenças podem interferir na diferenciação em células semelhantes fenotipicamente as encontradas na orelha interna.

A partir do momento que constatamos que o estabelecimento das iPSC foi realizado com sucesso, é preciso certificar de que não houve nenhum efeito adverso no decorrer do processo. Um dos riscos inerentes a processos de transfecção, principalmente envolvendo vetores retrovirais, é a integração destes vetores ao genoma da célula receptora, um dos motivos pela escolha dos vetores episomais. Por meio da técnica de PCR, utilizando dois conjuntos de *primers* específicos para detecção do DNA dos vetores episomais, não foi detectado o DNA dos vetores nas linhagens analisadas após cinco passagens. Resultados similares foram encontrados por Wen *et al.*, (2017) e Wen *et al.*, (2018), em que o DNA do plasmídeo tornou-se indetectável após a quinta passagem.

O processo de estabelecimento de iPSC é longo e requer múltiplas expansões a fim de se obter o número adequado de células para os experimentos, muitas vezes são estabelecidas linhagens de diferentes pacientes. Portanto faz se necessário o monitoramento da identidade da linhagem e a ocorrência de anormalidades cromossômicas. Para isso, foram realizadas análises com marcadores do tipo microssatélites (também conhecido como *short tandem repeat* – STR) nas iPSC e no DNA obtido a partir das PBMC dos seus respectivos doadores e foi constatado que todas as linhagens estabelecidas possuem os mesmos alelos de microssatélites que as amostras das quais foram originadas. Este método é amplamente utilizado para verificação da identidade celular (FAN *et al.*, 2021; YUAN *et al.*, 2021; LON *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2020; ZANON, *et al.*, 2019), sendo um passo de suma importância para publicação de novas linhagens de iPSC. Outra etapa fundamental para garantir a segurança das iPSC é a confirmação da ausência de anormalidades cromossômicas. Utilizando a técnica de MLPA, nenhuma das linhagens apresentou anormalidades cromossômicas. O cariótipo com bandeamento G é o teste mais frequentemente utilizado. Os cromossomos metafásicos são analisados com resolução de 400 a 550 bandas, porém alterações cromossômicas que afetam segmentos menores que 5 Mb não são detectadas nesse nível de resolução. A fim de melhorar as análises e sanar estas questões, Yunis (1976) desenvolveu uma técnica para o estudo dos cromossomos humanos em alta resolução (650 a 850 bandas) o que aumentou a possibilidade de detecção de anormalidades menores. Porém, esse é um método que exige muita experiência do citogeneticista o que em muitos casos não está disponível. Uma técnica capaz de detectar rearranjos menores como microdeleções e microduplicações, e que também não exige um citogeneticista experiente, é o MLPA. Jehee *et al.*, (2011) descreveram a combinação de *kits* (P070 e P036) para detectar alterações cromossômicas subteloméricas em pacientes com múltiplas anomalias congênitas e atraso mental, esta combinação aumentou o

número total de detecção de desequilíbrios patogênicos (mais de três vezes) em comparação ao cariótipo convencional. Em outro estudo, a mesma combinação de *kits* (P070 e P036) foi utilizada como um método de triagem de aneuploidia e rearranjos cromossômicos terminais desequilibrados em abortos espontâneos. Entre as amostras que foram submetidas ao cariótipo, o MLPA foi capaz de detectar todas as aneuploidias esperadas e revelou deleções e duplicações não visíveis no nível de resolução de 550 bandas. Por essa razão a combinação desses *kits* começa a ser utilizada também para verificar anormalidades cromossômicas em iPSC (MILLER *et al.*, 2017; CAIRES-JÚNIOR *et al.*, 2018).

6.2 PRESENÇA DA DUPLICAÇÃO NO *LOCUS* DFNA58 NAS iPSC

Foi confirmada por meio de qPCR a presença da duplicação nas linhagens, na quinta passagem, originadas a partir do sangue das pacientes com a duplicação. A tecnologia de reprogramação sem sombra de dúvidas é capaz de originar iPSC com as características genéticas das células originais dos pacientes, como foi demonstrado nos estudos da tabela 3. O estabelecimento de iPSC a partir de pacientes diagnosticados com microdeleções ou duplicações cromossômicas, conhecidas como CNV (do inglês *copy number variants*), apresentam uma oportunidade de investigar mecanismos fisiopatológicos associados as suas variantes patogênicas, como no caso relatado por Arioka *et al.*, (2018) onde foram estabelecidas três linhagens de iPSC derivadas de um paciente com síndrome de duplicação 15q11. 2-q13. 1. Duplicações na região 15q11.2-q13.1 (15dup) estão relacionadas a transtornos psiquiátricos, atraso no desenvolvimento psicomotor e transtorno do espectro do autismo. As iPSC foram estabelecidas a partir das PBMC com o uso de vetores episomais. Foram realizadas análises de *array-CGH* usando DNA genômico das iPSC confirmando que as iPSC mantiveram a 15dup, tal qual a amostra parental. As iPSC possuíam morfologia típica, expressavam os fatores de pluripotência e possuíam a capacidade de diferenciação nos folhetos embrionários *in vitro*.

É conhecido que algumas CNVs (deleções e duplicações) retrocedem da população celular ao longo das passagens, sendo mais presentes em passagens iniciais (passagem 5-8), isto sugere que elas podem ser negativamente selecionadas durante as passagens pelo mecanismo de reparação do DNA (LAURENT *et al.*, 2011; HUSSEIN *et al.*, 2011). Neste estudo, foram utilizadas células na quinta passagem, para maior probabilidade da presença da duplicação nas iPSCs. Assim como no estudo de Arioka *et al.*, (2018) nossas linhagens também mantiveram a duplicação assim como as amostras parentais, além disso possuem

morfologia típica de iPSC, expressam os fatores de pluripotência e possuem a capacidade de diferenciação nos folhetos embrionários *in vitro*.

6.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES CONTIDOS NA DUPLICAÇÃO

No gene *PLEK* e no exon 1 do gene *PPP3R1*, observamos leve superexpressão (1,5-2X) a semelhança do que foi observado no sangue. Observamos também, assim como no sangue a superexpressão mais elevada dos genes *CNRIP1*, *LOC107985892* e *LOC102724389*. As pacientes cujo sangue originou as linhagens iPSC só puderam ser reconvocadas após a publicação do estudo Lezirovitz *et al.*, (2020). Como observado no material suplementar do *paper*, embora todos os duplicados tivessem expressão bem mais elevada, essa expressão variou entre diferentes pessoas e mesmo também quanto as condições experimentais. Por isso não devemos comparar os valores de superexpressão do gene *CNRIP1*, nas linhagens iPSC (~6X) em relação a ordem de grandeza do que foi observado no sangue para a média de todos os duplicados (27X). A fim de podermos comparar de forma mais precisa os níveis de expressão dos genes com padrão mais alterado (*CNRIP1*, *LOC107985892* e *LOC102724389*) nas iPSC e no sangue dos portadores da duplicação, teríamos que repetir o experimento como todas as amostras na mesma placa, das mesmas pessoas, sangue (portadores da duplicação vs não portadores) e iPSC (portadores da duplicação vs não portadores). Não foram detectados os transcritos de fusão nas iPSC semelhante ao que se observou em quase todas as amostras de sangue das afetadas, exceto VI:7, mostrando de fato que o padrão de expressão do sangue pode não refletir o da cóclea.

Surpreendentemente, o gene de lcnRNA *LOC101927723*, cujo padrão de expressão se mostrou semelhante no sangue de duplicados e não duplicados, mostrou a mais elevada superexpressão nas iPSC das pacientes com duplicação em comparação a iPSC da paciente sem duplicação. Este resultado confirma a importância da criação desse modelo celular para posterior obtenção de células com características fenotípicas semelhantes às células da cóclea a fim de determinar a fisiopatologia do DFNA58. Não é possível assegurar se as alterações de expressão gênica observadas no sangue ou nas iPSC estão presentes também na cóclea e ainda em níveis parecidos. Idealmente, os padrões de expressão dos genes candidatos devem ser testados no material de origem com padrões de expressão representativos da doença, mas o tecido coclear humano raramente está disponível para biópsia, na literatura ou em nosso estudo. Da mesma maneira, com a estratégia emergente e promissora de usar RNAseq para a descoberta do gene da doença, o principal desafio é ter um tecido representativo da doença

para este tipo de análise de expressão gênica. Uma vez que as amostras da orelha interna não podem ser obtidas a partir de pacientes, recorreremos às amostras de sangue. A relevância do sangue como um substituto para estudar os padrões de expressão gênica de doenças pode variar dependendo dos tecidos-alvo e da patologia. Por exemplo, em distúrbios neuromusculares, o sangue não se mostrou representativo da expressão de miotubos (GONORAZKY *et al.*, 2019). Apesar disso, análise dos padrões de expressão alterados no sangue já tiveram sucesso em apontar genes candidatos ligados ao fenótipo de doenças raras de fisiopatologias variadas, incluindo doenças neurológicas, onde o sangue a priori não era considerado um tecido representativo (ZENG *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2016; FRÉSARD *et al.*, 2019).

Os genes lncRNA pertencem a uma classe heterogênea de transcritos intergênicos, RNAs *enhancers* (eRNAs) e transcritos senso ou antisenso que se sobrepõem a outros genes (DERRIEN *et al.*, 2012), e alguns anotados como lncRNAs na verdade codificam para pequenas proteínas (ANDERSON *et al.*, 2015; MATSUMOTO *et al.*, 2017). As diversas funções hipotetizadas do lncRNA incluem a regulação da transcrição em *cis* ou *trans*, a organização de domínios nucleares e a regulação de proteínas ou moléculas de RNA (ULITSKY; BARTEL, 2013). Apesar do alto número de lncRNA estimado em humanos (20.000-100.000), o papel biológico da maioria deles permanece enigmático (HARROW *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2016; KOPP; MENDEL, 2018). Dada a baixa expressão e má conservação, entre outras evidências, ainda é possível que alguns deles não tenham função (KOPP; MENDEL, 2018). Até o momento, não há conhecimento sobre a função ou ortólogos desses quatro genes lncRNA. *LOC102724389* é um gene lncRNA intergênico distante ~13 Kb de *CNRIP1* e 19 Kb de *PLEK* (MA *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2019). *LOC107985892* pode ser considerado antisenso sobreposto a *CNRIP1* e *PLEK*, uma vez que seu exon 1 está localizado no intron 1 de *PPP3R1* e exon 2 localizado no intron 2 do *CNRIP1*, e é transcrito na direção oposta a *PPP3R1* e *CNRIP1* (MA *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2019). Parte da sequência exônica do gene lncRNA *AC017083.1* se sobrepõe à sequência exônica de um novo gene codificador de proteína *AC017083.3*, mas transcrito na direção oposta, que pode ser classificado como um lncRNA antisenso sobreposto (MA *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2019). *LOC101927723* pode ser um lncRNA antisenso sobreposto ao gene *PLEK*, uma vez que seu primeiro exon é completamente contido dentro do intron 1 de *PLEK* e seu segundo exon não tem sobreposições com genes codificadores de proteínas (MA *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2019).

Dessa forma, o estabelecimento destas linhagens pode ser considerado o mais importante ponto de partida para posterior obtenção de células ciliadas e neurônios óticos. Estratégia igualmente importante seria realizar RNA-seq/Transcriptoma das iPSC, tanto indiferenciadas quanto diferenciadas, a fim de comparar os níveis de expressão de todos os genes, mesmo aqueles não previstos como potencialmente afetados pela duplicação, assim como caracterizar outros possíveis transcritos de fusão (além do já detectado no sangue dos pacientes, vide publicação).

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho estabelecemos linhagens de iPSC livres de integração provenientes de células do sangue de duas pacientes afetadas por PA e portadoras da duplicação que constitui o defeito genético subjacente ao locus DFNA58, bem como de um controle normouvinete da família.

As linhagens estabelecidas possuem o mesmo panorama genético, são capazes de se auto renovar indefinidamente em cultura, além disso, se mostraram capazes de se diferenciar em células dos três folhetos embrionários, porém algumas diferenças morfológicas foram observadas entre as células, sendo assim serão necessários novos experimentos para verificar se essas alterações são decorrentes da duplicação do DFNA58, e ainda se essa duplicação afeta o potencial de diferenciação em células cocleares. Sendo assim, o estabelecimento dessas linhagens representa uma ferramenta valiosa para um melhor entendimento do mecanismo fisiopatológico da duplicação do DFNA58,

Identificamos que o gene de lcnRNA *LOC101927723* possui mais elevada superexpressão nas iPSC com duplicação em comparação a sem duplicação, diferente do que aconteceu com a amostra parental, onde a expressão se mostrou semelhante nos portadores da duplicação e não portadores. Este resultado aumenta a necessidade de continuar os estudos a fim de obter células com características semelhantes às células presentes no tecido coclear (células ciliadas e neurônios do gânglio espiral) a fim de contribuir para o conhecimento da fisiopatologia do DFNA58.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFORD, R. L.; ARNOS, K. S.; FOX, M.; LIN, J. W.; PALMER, C. G.; PANDYA, A.; REHM, H. L.; ROBIN, N. H.; SCOTT, D. A.; YOSHINAGA-ITANO, C.; ACMG WORKING GROUP ON UPDATE OF GENETICS EVALUATION GUIDELINES FOR THE ETIOLOGIC DIAGNOSIS OF CONGENITAL HEARING LOSS; PROFESSIONAL PRACTICE AND GUIDELINES COMMITTEE. American College of Medical Genetics and Genomics guideline for the clinical evaluation and etiologic diagnosis of hearing loss. **Genetics in Medicine**, Baltimore, v. 16, n. 4, p. 347, 2014.

AMABILE, G.; MEISSNER, A. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v. 15, n. 2, p. 59-68, 2009.

AMPS, K. *et al.* Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. **Nature biotechnology**, New York, v. 29, n. 12, p. 1132–1144, 2011.

ANDERSON, D. M.; ANDERSON, K. M.; CHANG, C. L.; MAKAREWICH, C. A.; NELSON, B. R.; MCANALLY, J. R.; KASARAGOD, P.; SHELTON, J. M.; LIU, J.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E. N. A micropeptide encoded by a putative long noncoding RNA regulates muscle performance. **Cell**, Cambridge, v. 160, n. 4, p. 595-606, 2015.

ARIOKA, Y.; KUSHIMA, I.; MORI, D.; OZAKI, N. Three lines of induced pluripotent stem cells derived from a 15q11. 2-q13. 1 duplication syndrome patient. **Stem cell research**, Oxford, v. 31, p. 240-243, 2018.

AURÉLIO, F. S.; DUTRA, Í. P.; SILVA, V. B.; SAMPAIO, A. L.; OLIVEIRA, C. A. Prevalence of hearing loss in newborns of mothers who had malaria and were treated with antimalaric drugs in pregnancy. **The international tinnitus journal**, Brooklyn, v. 19, n. 1, p. 68-76, 2014.

AVASTHI, S.; SRIVASTAVA, N. R.; SINGH, A. M.; SRIVASTAVA, M. Stem cell: past, present and future--a review article. **Internet Journal of Medical Update**, Lucknow, v. 3, n. 1, p. 22-31, 2008.

AVILION, A. A.; NICOLIS, S. K.; PEVNY, L. H.; PEREZ, L.; VIVIAN, N.; LOVELL-BADGE, R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. **Genes & development**, New York, v. 17, n. 1, p. 126-140, 2003.

BADEMCI, G. *et al.* Long-range cis-regulatory elements controlling GDF6 expression are essential for ear development. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 130, n. 8, p. 4213-4217, 2020.

BARBOZA, L. C. JR.; LEZIROVITZ, K.; ZANATTA, D. B.; STRAUSS, B. E.; MINGRONI-NETTO, R. C.; OITICICA, J.; HADDAD, L. A.; BENTO, R. F. Transplantation and survival of mouse inner ear progenitor/stem cells in the organ of Corti after cochleostomy

of hearing-impaired guinea pigs: preliminary results. **Brazilian journal of medical and biological research**, São Paulo, v. 49, n. 4, p. e5064, 2016.

BENTO, R. F.; DE SOUZA, N. C. Hearing Health: A Major Concern for the 21st Century. **International archives of otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 23, n. 03, p. e254-e255, 2019.

BLELLOCH, R.; VENERE, M.; YEN, J.; RAMALHO-SANTOS, M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. **Cell stem cell**, Cambridge, v. 1, n. 3, p. 245-247, 2007.

BODDY, S. L.; ROMERO-GUEVARA, R.; JI, A. R.; UNGER, C.; CORNS, L.; MARCOTTI, W.; RIVOLTA, M. N. Generation of Otic Lineages from Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells Reprogrammed by mRNAs. **Stem cells international**, London, v. 2020, p. 3692937, 2020.

BODMER, D. Protection, regeneration and replacement of hair cells in the cochlea: implications for the future treatment of sensorineural hearing loss. **Swiss Medical Weekly**, Basel, v. 138, p. 47-48, 2008.

BRAGA, M. C. C. **Cálculo de riscos em doenças geneticamente heterogêneas: desenvolvimento de método e aplicação no caso da surdez congênita**. 1998. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

BURROWS, C. K.; BANOVICH, N. E.; PAVLOVIC, B. J.; PATTERSON, K.; GALLEGOM ROMERO, I.; PRITCHARD, J. K.; GILAD, Y. Genetic variation, not cell type of origin, underlies the majority of identifiable regulatory differences in iPSCs. **PLoS genetics**, San Francisco, v. 12, n. 1, p. e1005793, 2016.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. *et al.* Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature communications**, London, v. 9, n. 1, p. 475-485, 2018.

CAMPBELL, D. A.; MCHALE, D. P.; BROWN, K. A.; MOYNIHAN, L. M.; HOUSEMAN, M.; KARBANI, G.; PARRY, G.; JANJUA, A. H.; NEWTON, V.; AL-GAZALI, L.; MARKHAM, A. F.; LENCH, N. J.; MUELLER, R.F. A new locus for non-syndromal, autosomal recessive, sensorineural hearing loss (DFNB16) maps to human chromosome 15q21-q22. **Journal of Medical Genetics**, London, v. 34, n. 12, p. 1015-7, 1997.

CHAN, Y. H.; CHENG, Y. F.; CHEN, Y. T.; HUANG, C. Y.; LIN, C. H.; HU, C. J.; LU, Y. C.; WU, C. C.; HSU, C. J. Generation of induced pluripotent stem cells from a patient with hearing loss carrying GJB2 p. V37I mutation. **Stem cell research**, Oxford, v. 33, p. 51-55, 2018.

CHAUDHARY, J. K. Harnessing stem cell potential for regenerative medicine and cell-based therapy. **Journal of Studies in Dynamics and Change (JSDC)**, ISSN: 2348-7038, v. 2, n. 1, p. 339-343, 2015.

CONDIC, M. L. Totipotency: what it is and what it is not. **Stem Cells and Development**, Larchmont, v. 23, n. 8, p. 796-812, 2013.

CUI, L.; ZHENG, J.; ZHAO, Q.; CHEN, J. R.; LIU, H.; PENG, G.; WU, Y.; CHEN, C.; HE, Q.; SHI, H.; YIN, S.; FRIEDMAN, R. A.; CHEN, Y.; GUAN, M. X. Mutations of MAP1B encoding a microtubule-associated phosphoprotein cause sensorineural hearing loss. **JCI insight**, Michigan, v. 5, n. 23, p. e136046, 2020.

DERRIEN, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. **Genome research**, Cold Spring Harbor, v. 22, n. 9, p. 1775-1789, 2012.

DI STEFANO, B.; PRIGIONE, A.; BROCCOLI, V. Efficient genetic reprogramming of unmodified somatic neural progenitors uncovers the essential requirement of Oct4 and Klf4. **Stem cells and development**, Larchmont, v. 18, n. 5, p. 707-716, 2009.

DONG, Y.; PENG, T.; WU, W.; TAN, D.; LIU, X.; XIE, D. Efficient introduction of an isogenic homozygous mutation to induced pluripotent stem cells from a hereditary hearing loss family using CRISPR/Cas9 and single-stranded donor oligonucleotides. **The Journal of international medical research**, Northampton, v. 7, n. 4, p. 1717-1730, 2019.

DROR, A. A.; AVRAHAM, K. B. Hearing impairment: a panoply of genes and functions. **Neuron**, Cambridge, v. 68, n. 2, p. 293-308, 2010.

DUFNER-ALMEIDA, L. G.; CRUZ, D. B. D.; MINGRONI NETTO, R. C.; BATISSOCO, A. C.; OITICICA, J.; SALAZAR-SILVA, R. Stem-cell therapy for hearing loss: are we there yet?. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 85, n. 4, p. 520-529, 2019.

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

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, London, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981.

FAN, Y.; LIU, F.; FAN, L. Y.; MAO, C. Y.; LIU, H.; ZHANG, C.; YUAN, Y. P.; YANG, J.; WANG, Y. L.; LIU, Y. T.; SHI, C. H.; XU, Y. M. Generation of an induced pluripotent stem cell line (ZZUi020-A) from a patient with Parkinson's disease harboring the intermediate-length GGC repeat expansions in the NOTCH2NLC gene. **Stem Cell Research**, Kidlington, v. 52, p. 102257, 2021.

FERNANDES, J. C. R.; ACUÑA, S. M.; AOKI, J. I.; FLOETER-WINTER, L. M.; MUXEL, S. M. Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. **Non-coding RNA**, Basel, v. 5, n. 1, p. 1-25, 2019.

FONG, H.; HOHENSTEIN, K. A.; DONOVAN, P. J. Regulation of self renewal and pluripotency by Sox2 in human embryonic stem cells. **Stem cells**, Dayton, v. 26, n. 8, p. 1931-1938, 2008.

FRÉSARD, L. *et al.* Identification of rare-disease genes using blood transcriptome sequencing and large control cohorts. **Nature medicine**, New York, v. 25, n. 6, p. 911–919, 2019.

FRIEDMAN, T. B.; GRIFFITH, A. J. Human nonsyndromic sensorineural deafness. **Annual review of genomics and human genetics**, Palo Alto, v. 4, p. 341–402, 2003.

FUJIKURA, J.; NAKAO, K.; SONE, M.; NOGUCHI, M.; MORI, E.; NAITO, M.; TAURA, D.; HARADA-SHIBA, M.; KISHIMOTO, I.; WATANABE, A.; ASAKA, I.; HOSODA, K.; NAKAO, K. Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation. **Diabetologia**, Berlin, v. 55, n. 6, p. 1689–1698, 2012.

FUKUNAGA, I.; FUJIMOTO, A.; HATAKEYAMA, K.; AOKI, T.; NISHIKAWA, A.; NODA, T.; MINOWA, O.; KUREBAYASHI, N.; IKEDA, K.; KAMIYA, K. In Vitro Models of GJB2-Related Hearing Loss Recapitulate Ca²⁺ Transients via a Gap Junction Characteristic of Developing Cochlea. **Stem Cell Reports**, Cambridge, v. 7, n. 6, p. 1023–1036, 2016.

GALE, J. E.; MARCOTTI, W.; KENNEDY, H. J.; KROS, C. J.; RICHARDSON, G. P. FM1-43 dye behaves as a permeant blocker of the hair-cell mechanotransducer channel. **The Journal of neuroscience**, Baltimore, v. 21, n. 18, p. 7013–7025, 2001.

GALERA, T.; ZURITA, F.; GONZÁLEZ-PÁRAMOS, C.; MORENO-IZQUIERDO, A.; FRAGA, M. F.; FERNÁNDEZ, A. F.; GARESSE, R.; GALLARDO, M. E. Generation of a human iPSC line from a patient with Leigh syndrome. **Stem cell research**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 63–66, 2016.

GALVAN, A.; FRULLANTI, E.; ANDERLINI, M.; MANENTI, G.; NOCI, S.; DUGO, M.; AMBROGI, F.; DE CECCO, L.; SPINELLI, R.; PIAZZA, R.; PIROLA, A.; GAMBACORTI-PASSERINI, C.; INCARBONE, M.; ALLOISIO, M.; TOSI, D.; NOSOTTI, M.; SANTAMBROGIO, L.; PASTORINO, U.; DRAGANI, T. A. Gene expression signature of non-involved lung tissue associated with survival in lung adenocarcinoma patients. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 34, n. 12, p. 2767–2773, 2013.

GONORAZKY, H. D.; NAUMENKO, S.; RAMANI, A. K.; NELAKUDITI, V.; MASHOURI, P.; WANG, P.; KAO, D.; OHRI, K.; VITHTHIYAPASKARAN, S.; TARNOPOLSKY, M. A.; MATHEWS, K. D.; MOORE, S. A.; OSORIO, A. N.; VILLANOVA, D.; KEMALADEWI, D. U.; COHN, R. D.; BRUDNO, M.; DOWLING, J. J. Expanding the boundaries of RNA sequencing as a diagnostic tool for rare Mendelian disease. **American journal of human genetics**, Baltimore, v. 104, n. 5, p. 1007–1025, 2019.

GRASEL, S.; GRETERS, M.; GOFFI-GOMEZ, M. V. S.; BITTAR, R.; WEBER, R.; OITICICA, J.; BENTO, R. F. P3 Cognitive Potential in Cochlear Implant Users. **International archives of otorhinolaryngology**, São Paulo, v. 22, n. 04, p. 408–414, 2018.

GROFF, J. A.; LIBERMAN, M. C. Modulation of cochlear afferent response by the lateral olivocochlear system: activation via electrical stimulation of the inferior colliculus. **Journal of neurophysiology**, Washington, v. 90, n. 5, p. 3178–3200, 2003.

GUNewardene, N.; BERGEN, N. V.; CROMBIE, D.; NEEDHAM, K.; DOTTORI, M.; NAYAGAM, B. A. Directing human induced pluripotent stem cells into a neurosensory lineage for auditory neuron replacement. **BioResearch open access**, New Rochelle, v. 3, n. 4, p. 162-175, 2014.

GUO, X.; JI, W.; NIU, C.; DING, Y.; CHEN, Z.; CHEN, C.; TONG, H.; HAN, Z.; CHU, M. Generation of an urine-derived induced pluripotent stem cell line from a 5-year old X-linked Alport syndrome (X-LAS) patient. **Stem Cell Research**, Kidlington, v. 49, p. 102085, 2020.

HARROW, J. *et al.* GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. **Genome research**, Cold Spring Harbor, v. 22, n. 9, p. 1760-1774, 2012.

HAY, D. C.; SUTHERLAND, L.; CLARK, J.; BURDON, T. Oct4 knockdown induces similar patterns of endoderm and trophoblast differentiation markers in human and mouse embryonic stem cells. **Stem cells**, Dayton, v. 22, n. 2, p. 225-235, 2004.

HAYAT, A.; HARIA, D.; SALIFU, M. O. Erythropoietin stimulating agents in the management of anemia of chronic kidney disease. **Patient preference and adherence**, Auckland, v. 2, p. 195, 2008.

HOPKINS, K. Deafness in cochlear and auditory nerve disorders. **Handbook of clinical neurology**, Amsterdam, v. 129, p. 479-494, 2015.

HOSOYA, M.; FUJIOKA, M.; SONE, T.; OKAMOTO, S.; AKAMATSU, W.; UKAI, H.; UEDA, H. R.; OGAWA, K.; MATSUNAGA, T.; OKANO, H. Cochlear Cell Modeling Using Disease-Specific iPSC Unveils a Degenerative Phenotype and Suggests Treatments for Congenital Progressive Hearing Loss. **Cell reports**, Cambridge, v. 18, n. 1, p. 68-81, 2017.

HOTTA, A.; ELLIS, J. Retroviral vector silencing during iPS cell induction: an epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. **Journal of cellular biochemistry**, New York, v. 105, n. 4, p. 940-948, 2008.

HSU, Y. H.; WU, Y. T.; HUANG, C. Y.; HO, M. C.; CHENG, Y. C.; SYU, S. H.; LU, H. E.; CHEN, Y. C.; TSAI, C. L.; LIN, H. C.; WEI, Y. H.; HSU, Y. C.; HSIEH, P. C. H. Generation of an induced pluripotent stem cell line from a 39-year-old female patient with severe-to-profound non-syndromic sensorineural hearing loss and a A1555G mutation in the mitochondrial MTRNR1 gene. **Stem Cell Research**, Kidlington, v. 25, p. 245-249, 2017.

HUANG, C. Y.; TSAI, Y. H.; TSAI, Y. C.; LU, Y. C.; CHAN, Y. H.; HSU, C. J.; CHIOU, S. H.; WU, C. C.; CHENG, Y. F. Establishment of an induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 7-year-old male patient with profound hearing loss carrying c.235delC in GJB2 gene. **Stem cell research**, Oxford, v. 45, p. 101795, 2020.

HUSSEIN, S. M.; BATADA, N. N.; VUORISTO, S.; CHING, R. W.; AUTIO, R.; NÄRVÄ, E.; NG, S.; SOUROUR, M.; HÄMÄLÄINEN, R.; OLSSON, C.; LUNDIN, K.; MIKKOLA, M.; TROKOVIC, R.; PEITZ, M.; BRÜSTLE, O.; BAZETT-JONES, D. P.; ALITALO, K.; LAHESMAA, R.; NAGY, A.; OTONKOSKI, T. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. **Nature**, London, v. 471, n. 7336, p. 58-62, 2011.

JACOBSON, L. O.; SIMMONS, E. L.; MARKS, E. K.; ELDREDGE, J. H. Recovery from radiation injury. **Science**, New York, v.113, n. 2940, p. 510-511, 1951.

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

JIN, X.; FU, R.; ZHU, W.; LIU, Z.; GU, T.; JIAO, G.; YANG, H.; ZHOU, Q.; GAO, Z.; ZHAO, X. Y. Derivation of non-integration induced pluripotent stem cells from fibroblast of severe deafness patients with GJB2 mutation. **Journal of genetics and genomics**, Beijing, v. 42, n. 8, p. 455-458, 2015.

JOHNSON, S. M.; GROSSHANS, H.; SHINGARA, J.; BYROM, M.; JARVIS, R.; CHENG, A.; LABOURIER, E.; REINERT, K. L.; BROWN, D.; SLACK, F. J. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. **Cell**, Cambridge, v. 120, n. 5, p. 635-647, 2005.

JUNQUEIRA, L. C. U., CARNEIRO, J. Biologia celular e molecular. 9. ed. Brasil: Guanabara Koogan, 2012. 376p., ISBN-108527720787.

KALRA, K.; TOMAR, P. Stem Cell: Basics, Classification and Applications. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v.2, n. 7, p. 919-930, 2014.

KASAI-BRUNSWICK, T. H.; SILVA DOS SANTOS, D.; FERREIRA, R. P.; ARAUJO, D. S.; DIAS, G. M.; COUTINHO, J. L. A.; CRUZ, F. E. S. F.; STERNICK, E. B.; GUBERT, F.; OLIVEIRA, J. C. G.; VAZ, I. M.; BORGONOVO, T.; BROFMAN, P. R. S.; MOURA-NETO, R. S.; SILVA, R.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C.; CARVALHO, A. B. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell lines from one patient with Jervell and Lange-Nielsen syndrome, one with type 1 long QT syndrome and two healthy relatives. **Stem Cell Research**, Kidlington, v. 31, p. 174-180, 2018.

KAWASHIMA, Y.; GÉLÉOC, G. S.; KURIMA, K.; LABAY, V.; LELLI, A.; ASAI, Y.; MAKISHIMA, T.; WU, D. K.; DELLA SANTINA, C. C.; HOLT, J. R.; GRIFFITH, A. J. Mechanotransduction in mouse inner ear hair cells requires transmembrane channel-like genes. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 121, n. 12, p. 4796-4809, 2011.

KIM, K.; DOI, A.; WEN, B.; NG, K.; ZHAO, R.; CAHAN, P.; KIM, J.; ARYEE, M. J.; JI, H.; EHRLICH, L. I.; YABUUCHI, A.; TAKEUCHI, A.; CUNNIFF, K. C.; HONGGUANG, H.; MCKINNEY-FREEMAN, S.; NAVEIRAS, O.; YOON, T. J.; IRIZARRY, R. A.; JUNG, N.; SEITA, J.; HANNA, J.; MURAKAMI, P.; JAENISCH, R.; WEISSLEDER, R.; ORKIN, S. H.; WEISSMAN, I. L.; FEINBERG, A. P.; DALEY, G. Q. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. **Nature**, Basingstoke, v. 467, n. 7313, p. 285-290, 2010.

KOLIOS, G.; MOODLEY, Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. **Respiration**, New York, v. 85, n. 1, p. 3-10, 2013.

KUEBLER, B.; ARAN, B.; MIQUEL-SERRA, L.; MUÑOZ, Y.; ARS, E.; BULLICH, G.; FURLANO, M.; TORRA, R.; MARTI, M.; VEIGA, A.; RAYA, A. Generation of integration-free induced pluripotent stem cell lines derived from two patients with X-linked Alport syndrome (XLAS). **Stem cell research**, Kidlington, v. 25, p. 291-295, 2017b.

KUEBLER, B.; ARAN, B.; MIQUEL-SERRA, L.; MUÑOZ, Y.; ARS, E.; BULLICH, G.; FURLANO, M.; TORRA, R.; MARTI, M.; VEIGA, A.; RAYA, A. Integration-free induced pluripotent stem cells derived from a patient with autosomal recessive Alport syndrome (ARAS). **Stem cell research**, Kidlington, v. 25, p. 1-5, 2017a.

La Spada A, Ntai A, Genovese S, Rondinelli M, De Blasio P, Biunno I. Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Wolfram Syndrome Type 2 Patients Bearing the c.103 + 1G>A CISD2 Mutation for Disease Modeling. *Stem Cells Dev.* 2018 Feb 15;27(4):287-295. doi: 10.1089/scd.2017.0158.

LATCHMAN, D. S. Transcription factors: an overview. **The international journal of biochemistry & cell biology**, Amsterdam, v. 29, n. 12, p. 1305-1312, 1997.

LAURENT, L. C.; ULITSKY, I.; SLAVIN, I.; TRAN, H.; SCHORK, A.; MOREY, R.; LYNCH, C.; HARNESS, J. V.; LEE, S.; BARRERO, M. J.; KU, S.; MARTYNOVA, M.; SEMECHKIN, R.; GALAT, V.; GOTTESFELD, J.; IZPISUA BELMONTE, J. C.; MURRY, C.; KEIRSTEAD, H. S.; PARK, H. S.; SCHMIDT, U.; LASLETT, A. L.; MULLER, F. J.; NIEVERGELT, C. M.; SHAMIR, R.; LORING, J. F. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSC during reprogramming and time in culture. **Cell stem cell**, Cambridge, v. 8, n. 1, p. 106-118, 2011.

LEZIROVITZ, K.; BRAGA, M. C.; THIELE-AGUIAR, R. S.; AURICCHIO, M. T.; PEARSON, P. L.; OTTO, P. A.; MINGRONI-NETTO, R. C. A novel autosomal dominant deafness locus (DFNA58) maps to 2p12-p21. **Clinical Genetics**, Copenhagen, v. 75, n. 5, p. 490-493, 2009.

LEZIROVITZ, K.; VIEIRA-SILVA, G. A.; BATISSOCO, A. C.; LEVY, D.; KITAJIMA, J. P.; TROUILLET, A.; OUYANG, E.; ZEBARJADI, N.; SAMPAIO-SILVA, J.; PEDROSO-CAMPOS, V.; NASCIMENTO, L. R.; SONODA, C. Y.; BORGES, V. M.; VASCONCELOS, L. G.; BECK, R. M.O.; GRASEL, S. S.; JAGGER, D. J.; GRILLET, N.; BENTO, R. F.; MINGRONI-NETTO, R. C.; OITICICA, J. A rare genomic duplication in 2p14 underlies autosomal dominant hearing loss DFNA58. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 1520-1536, 2020.

LI, R.; BASKFIELD, A.; BEERS, J.; ZOU, J.; LIU, C.; ALMÉCIGA-DÍAZ, C. J.; ZHENG, W. Generation of an induced pluripotent stem cell line (TRNDi005-A) from a Mucopolysaccharidosis Type IVA (MPS IVA) patient carrying compound heterozygous p.R61W and p.WT405del mutations in the *GALNS* gene. **Stem cell research**, Kidlington, v. 36, n. 101408, p. 1-5, 2019.

LI, Y.; MCCLINTICK, J.; ZHONG, L.; EDENBERG, H. J.; YODER, M. C.; CHAN, R. J. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. **Blood**, New York, v. 105, n. 2, p. 635-637, 2005.

LIE, A.; SKOGSTAD, M.; JOHANNESSEN, H. A.; TYNES, T.; MEHLUM, I. S.; NORDBY, K. C.; ENGDAHL, B.; TAMBS, K. Occupational noise exposure and hearing: a systematic review. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, Berlin, v. 89, n. 3, p. 351-372, 2016.

LINDNER, S. E.; SUGDEN, B. The plasmid replicon of Epstein-Barr virus: Mechanistic insights into efficient, licensed, extrachromosomal replication in human cells. **Plasmid**, New York, v. 58, n. 1, p. 1-12, 2007.

LIU, H.; ZHU, F.; YONG, J.; ZHANG, P.; HOU, P.; LI, H.; JIANG, W.; CAI, J.; LIU, M.; CUI, K.; QU, X.; XIANG, T.; LU, D.; CHI, X.; GAO, G.; JI, W.; DING, M.; DENG, H. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 3, n. 6, p. 587-590, 2008.

LU, H. E.; TSAI, C. L.; CHIU, I. M.; PAN, Y. L.; LIN, Y. F.; LIN, H. C.; HSU, Y. C. Generation of induced pluripotent stem cells MMCi001-A from a Taiwanese hearing loss patient carrying GJB2 pV37I mutation. **Stem cell research**, Oxford, v. 42, p. 101692, 2019.

MAHARAJAN, N.; CHO, G. W.; JANG, C. H. Therapeutic Application of Mesenchymal Stem Cells for Cochlear Regeneration. **In vivo**, Athens, v. 35, n. 1, p. 13-22, 2021.

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

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 78, n. 12, p. 7634-7638, 1981.

MASSUCCI-BISSOLI, M.; LEZIROVITZ, K.; OITICICA, J.; BENTO, R. F. Evidence of progenitor cells in the adult human cochlea: sphere formation and identification of ABCG2. **Clinics (São Paulo)**, São Paulo, v. 72, n. 11, p. 714-717, 2017.

MATIN, M. M.; WALSH, J. R.; GOKHALE, P. J.; DRAPER, J. S.; BAHRAMI, A. R.; MORTON, I.; MOORE, H. D.; ANDREWS, P. W. Specific knockdown of Oct4 and β 2-microglobulin expression by RNA interference in human embryonic stem cells and embryonic carcinoma cells. **Stem Cells**, Dayton, v. 22, n. 5, p. 659-668, 2004.

MATSUMOTO, A.; PASUT, A.; MATSUMOTO, M.; YAMASHITA, R.; FUNG, J.; MONTELEONE, E.; SAGHATELIAN, A.; NAKAYAMA, K. I.; CLOHESSY, J. G.; PANDOLFI, P. P. mTORC1 and muscle regeneration are regulated by the LINC00961-encoded SPAR polypeptide. **Nature**, London, v. 541, n. 7636, p. 228-232, 2017.

MCLENACHAN, S.; WONG, E. Y. M.; ZHANG, X.; LEITH, F.; MOON, S. Y.; ZHANG, D.; CHEN, S. C.; THOMPSON, J. A.; MCLAREN, T.; LAMEY, T.; DE ROACH, J. N.; ATLAS, M. D.; DILLEY, R. J.; CHEN, F. K. Generation of two induced pluripotent stem cell lines from a patient with compound heterozygous mutations in the *USH2A* gene. **Stem cell research**, Kidlington, v. 36, n. 101420, p. 1-5, 2019.

MORETTI, A.; LAUGWITZ, K. L.; DORN, T.; SINNECKER, D.; MUMMERY, C. Pluripotent stem cell models of human heart disease. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, Woodbury, v. 3, n. 11, p. a014027, 2013.

MOSER, T.; BRANDT, A.; LYSAKOWSKI, A. Hair cell ribbon synapses. **Cell and tissue research**, New York, v. 326, n. 2, p. 347-359, 2006.

MOSS, E. G.; LEE, R. C.; AMBROS, V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. **Cell**, Cambridge, v. 88, n. 5, p. 637-646, 1997.

MURA, M.; LEE, Y. K.; GINEVRINO, M.; ZAPPATORE, R.; PISANO, F.; BONI, M.; DAGRADI, F.; CROTTI, L.; VALENTE, E. M.; SCHWARTZ, P. J.; TSE, H. F.; GNECCHI, M. Generation of the human induced pluripotent stem cell (hiPSC) line PSMi002-A from a patient affected by the Jervell and Lange-Nielsen syndrome and carrier of two compound heterozygous mutations on the *KCNQ1* gene. **Stem cell research**, Oxford, v. 29, p. 157-161, 2018.

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

NAKAGAWA, M.; TAKIZAWA, N.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 32, p. 14152 – 14157, 2010.

NISHINO, J.; KIM, I.; CHADA, K.; MORRISON, S. J. Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. **Cell**, Cambridge, v. 135, n. 2, p. 227-239, 2008.

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

OHLEMILLER, K.K., JONES, S.M. AND JOHNSON, K.R. Application of mouse models to research in hearing and balance. **Journal of the Association for Research in Otolaryngology**, New York, v. 17, n. 6, p. 493-523, 2016.

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

OKITA, K.; NAKAGAWA, M.; HYENJONG, H.; ICHISAKA, T.; YAMANAKA, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. **Science**, New York, v. 322, n. 5903, p. 949-953, 2008.

OKITA, K.; MATSUMURA, Y.; SATO, Y.; OKADA, A.; MORIZANE, A.; OKAMOTO, S.; HONG, H.; NAKAGAWA, M.; TANABE, K.; TEZUKA, K.; SHIBATA, T.; KUNISADA, T.; TAKAHASHI, M.; TAKAHASHI, J.; SAJI, H.; YAMANAKA, S. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. **Nature methods**, New York, v. 8, n. 5, p. 409-412, 2011.

OMOLE, A. E.; FAKOYA, A. O. J. Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. **PeerJ**, Corte Madera, v. 6, n. e4370, p. 1-47, 2018.

OHNISHI, H.; SKERLEVA, D.; KITAJIRI, S.; SAKAMOTO, T.; YAMAMOTO, N.; ITO, J.; NAKAGAWA, T. Limited hair cell induction from human induced pluripotent stem cells using a simple stepwise method. **Neuroscience letters**, Amsterdam, v. 599, p. 49-54, 2015.

OTSU, K.; KUMAKAMI-SAKANO, M.; FUJIWARA, N.; KIKUCHI, K.; KELLER, L.; LESOT, H.; HARADA, H. Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. **Frontiers in Physiology**, Lausanne, v. 5, 2014.

PARK, I. H.; ZHAO, R.; WEST, J. A.; YABUUCHI, A.; HUO, H.; INCE, T. A.; LEROU, P. H.; LENSCH, M. W.; DALEY, G. Q. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. **Nature**, Basingstoke, v. 451, n. 7175, p. 141-146, 2008.

PETIT, C.; LEVILLIERS, J.; HARDELI, J. P. Molecular Genetics of Hearing Loss. **Annual review of genetics**, Palo Alto, v. 35, p. 589-646, 2001.

POLO, J. M.; LIU, S.; FIGUEROA, M. E.; KULALERT, W.; EMINLI, S.; TAN, K. Y.; APOSTOLOU, E.; STADTFELD, M.; LI, Y.; SHIODA, T.; NATESAN, S.; WAGERS, A. J.; MELNICK, A.; EVANS, T.; HOCHEDLINGER, K. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. **Nature Biotechnology**, New York, v. 28, n. 8, p. 848-855, 2010.

RASK-ANDERSEN, H.; BOSTRÖM, M.; GERDIN, B.; KINNEFORS, A.; NYBERG, G.; ENGSTRAND, T.; MILLER, J. M.; LINDHOLM, D. Regeneration of human auditory nerve. In vitro/in video demonstration of neural progenitor cells in adult human and guinea pig spiral ganglion. **Hearing research**, Amsterdam, v. 203, n. 1-2, p. 180-191, 2005.

RECILLAS-TARGA, F. Multiple strategies for gene transfer, expression, knockdown, and chromatin influence in mammalian cell lines and transgenic animals. **Molecular biotechnology**, Totowa, v. 34, n. 3, p. 337-354, 2006.

RICHARDSON, G. P.; DE MONVEL, J. B.; PETIT, C. How the genetics of deafness illuminates auditory physiology. **Annual review of physiology**, Palo Alto, v. 73, p. 311-334, 2011.

RIERA, M.; PATEL, A.; CORCOSTEGUI, B.; CHANG, S.; CORNEO, B.; SPARROW, J. R.; POMARES, E. Generation of an induced pluripotent stem cell line (FRIMOi002-A) from a retinitis pigmentosa patient carrying compound heterozygous mutations in *USH2A* gene. **Stem cell research**, Kidlington, v. 35, n. 101386, p. 1-4, 2019.

SANCHEZ, A. P.; SHARMA, K. Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. **Expert reviews in molecular medicine**, Cambridge, v. 11, 2009.

SANJURJO-SORIANO, C.; ERKILIC, N.; MANES, G.; DUBOIS, G.; HAMEL, C. P.; MEUNIER, I.; KALATZIS, V. Generation of a human iPSC line, INMi002-A, carrying the most prevalent *USH2A* variant associated with Usher syndrome type 2. **Stem cell research**, Kidlington, v. 33, p. 247-250, 2018.

SCHLAEGER, T. M. *et al.* A comparison of non-integrating reprogramming methods. **Nature biotechnology**, New York, v. 33, n. 1, p. 58–63, 2015.

SENN, P.; MINA, A.; VOLKENSTEIN, S.; KRANEBITTER, V.; OSHIMA, K.; HELLER, S. Progenitor cells from the adult human inner ear. **The anatomical record : advances in integrative anatomy and evolutionary biology**, Hoboken, v. 303, n. 3, p. 461-470, 2020.

SHI, G.; JIN, Y. Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. **Stem cell research & therapy**, London, v. 1, n. 5, p. 39, 2010.

SHI, Y.; DESPONT, C.; DO, J. T.; HAHM, H. S.; SCHÖLER, H. R.; DING, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. **Cell stem cell**, Cambridge, v. 3, n. 5, p. 568-574, 2008.

SIMMONS, D.D. Development of the inner ear efferent system across vertebrate species. **Journal of neurobiology**, New York, v. 53, n. 2, p.228-250, 2002.

SMITH, K. N.; SINGH, A. M.; DALTON, S. Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells. **Cell Stem Cell**, Cambridge, v. 7, n. 3, p. 343–354, 2010.

SMITH, R. J. H.; SHEARER, A. E.; HILDEBRAND, M. S.; VAN CAMP, G. *In*: PAGON, R. A.; ADAM, M. P.; ARDINGER, H. H.; WALLACE, S. E.; AMEMIYA, A.; BEAN, L. J. H.; BIRD, T. D.; LEDBETTER, N.; MEFFORD, H. C.; SMITH, R. J. H.; STEPHENS, K. Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. **GeneReviews**, Seattle, 14 Feb. 1999. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1434/>>. Acesso em: 09 mai. 2019.

SUMER, H.; LIU, J.; MALAVER-ORTEGA, L. F.; LIM, M. L.; KHODADADI, K.; VERMA, P. J. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 89, n. 9, p. 2708-2716, 2011.

TAKAHASHI, K.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; NARITA, M.; ICHISAKA, T.; TOMODA, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, Cambridge, v. 131, n. 5, p. 861-872, 2007.

TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 4, p. 663-676, 2006.

TAKAMIZAWA, J.; KONISHI, H.; YANAGISAWA, K.; TOMIDA, S.; OSADA, H.; ENDOH, H.; HARANO, T.; YATABE, Y.; NAGINO, M.; NIMURA, Y.; MITSUDOMI, T.; TAKAHASHI, T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer research**, Chicago, v. 64, n. 11, p. 3753-3756, 2004.

TANG, Z. H. *et al.* Genetic Correction of Induced Pluripotent Stem Cells From a Deaf Patient With MYO7A Mutation Results in Morphologic and Functional Recovery of the Derived Hair Cell-Like Cells. **Stem cells translational medicine**, Hoboken, v. 5, n. 5, p. 561-571, 2016.

TEKIN, M.; ARNOS, K. S.; PANDYA, A. Advances in hereditary deafness. **The Lancet**, London, v. 358, n. 9287, p. 1082-1090, 2001.

TESAR, P. J. Snapshots of pluripotency. **Stem cell reports**, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 163-167, 2016.

THOMAS, E. D.; LOCHTE, H. L. Jr.; CANNON, J. H.; SAHLER, O. D.; FERREBEE, J. W. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 38, n. 10, p. 1709-1716, 1959.

THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, New York, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998.

THOMSON, J. A.; KALISHMAN, J.; GOLOS, T. G.; DURNING, M.; HARRIS, C. P.; BECKER, R. A.; HEARN, J. P. Isolation of a primate embryonic stem cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 92, n. 17, p. 7844-7848, 1995.

TORIELLO, H. V.; SMITH, S. D. **Hereditary Hearing Loss and Its Syndromes**. Third Edition. USA: Oxford University Press, 2013. 756p. Series: Oxford Monographs on Medical Genetics. ISBN-10: 0199731969.

VALLEJO-DIEZ, S.; FLEISCHER, A.; MARTÍN-FERNÁNDEZ, J. M.; SÁNCHEZ-GILABERT, A.; BACHILLER, D. Generation of two induced pluripotent stem cells lines from a Mucopolysaccharydosis IIIB (MPSIIIB) patient. **Stem cell research**, Kidlington, v. 33, p. 180-184, 2018.

VAN CAMP, G.; SMITH, R. **Hereditary Hearing Loss**. Disponível em <<http://hereditaryhearingloss.org>>. Acesso em: 01 abr. 2021.

VARLAKHANOVA, N. V.; COTTERMAN, R. F.; DEVRIES, W. N.; MORGAN, J.; DONAHUE, L. R.; MURRAY, S.; KNOWLES, B. B.; KNOEPFLER, P. S. Myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. **Differentiation**, London, v. 80, n. 1, p.: 9–19, 2010.

VISWANATHAN, S. R.; DALEY, G. Q. Lin28: A microRNA regulator with a macro role. **Cell**, Cambridge, v. 140, n. 4, p. 445-449, 2010.

VONA, B.; NANDA, I.; HOFRICHTER, M. A.; SHEHATA-DIELER, W.; HAAF, T. Non-syndromic hearing loss gene identification: A brief history and glimpse into the future. **Molecular and cellular probes**, London, v. 29, n. 5, p. 260-270, 2015.

WAN, G.; GÓMEZ-CASATI, M. E.; GIGLIELLO, A. R.; LIBERMAN, M. C.; CORFAS, G. Neurotrophin-3 regulates ribbon synapse density in the cochlea and induces synapse regeneration after acoustic trauma. **eLife**, Cambridge, v. 3, p. e03564, 2014.

WANG, A. Y. L.; LOH, C. Y. Y. Episomal Induced Pluripotent Stem Cells: Functional and Potential Therapeutic Applications. **Cell transplantation**, Elmsford, v. 28, n. 1_suppl, p. 112S-131S, 2019.

WANG, P.; WANG, J.; XING, Y.; WANG, H.; YU, D.; FENG, Y.; WU, H.; WU, Y.; CHEN, Z.; WANG, J.; SHI, H. Establishment of an iPSC line (JTUi002-A) from a patient with Waardenburg syndrome caused by a SOX10 mutation and carrying a GJB2 mutation. **Stem cell research**, Oxford, v. 44, p. 101756, 2020.

WATTANAPANITCH, M. Recent Updates on Induced Pluripotent Stem Cells in Hematological Disorders. **Stem cells international**, London, v. 2019, n. 5171032, p. 1-15, 2019.

WEN, W.; CHENG, X.; FU, Y.; MENG, F.; ZHANG, J. P.; ZHANG, L.; LI, X. L.; YANG, Z.; XU, J.; ZHANG, F.; BOTIMER, G. D.; YUAN, W.; SUN, C.; CHENG, T.; ZHANG, X. B. High-level precise knockin of iPSC by simultaneous reprogramming and genome editing of human peripheral blood mononuclear cells. **Stem cell reports**, Cambridge, v. 10, n. 6, p. 1821-1834, 2018.

WEN, W.; ZHANG, J. P.; CHEN, W.; ARAKAKI, C.; LI, X.; BAYLINK, D.; BOTIMER, G. D.; XU, J.; YUAN, W.; CHENG, T.; ZHANG, X. B. Generation of integration-free induced pluripotent stem cells from human peripheral blood mononuclear cells using episomal vectors. **Journal of visualized experiments: JoVE**, Boston, n. 119, p.55091, 2017.

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

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Deafness and hearing loss**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs300/en/>>. Acesso em: 02 abr. 2021.

WILLIAMSON, K. A.; HEVER, A. M.; RAINGER, J.; ROGERS, R. C.; MAGEE, A.; FIEDLER, Z.; KENG, W. T.; SHARKEY, F. H.; MCGILL, N.; HILL, C. J.; SCHNEIDER, A.; MESSINA, M.; TURNPENNY, P. D.; FANTES, J. A.; VAN HEYNINGEN, V.; FITZPATRICK, D. R. Mutations in SOX2 cause anophthalmia-esophageal-genital (AEG) syndrome. **Human molecular genetics**, Oxford, v. 15, n. 9, p. 1413-1422, 2006.

WOOD, H. B.; EPISKOPOU, V. Comparative expression of the mouse Sox1, Sox2 and Sox3 genes from pre-gastrulation to early somite stages. **Mechanisms of development**, Shannon, v. 86, n. 1-2, p. 197-201, 1999.

WU, Y. T.; HSU, Y. H.; HUANG, C. Y.; HO, M. C.; CHENG, Y. C.; WEN, C. H.; KO, H. W.; LU, H. E.; CHEN, Y. C.; TSAI, C. L.; HSU, Y. C.; WEI, Y. H.; HSIEH, P. C. H. Generation of an induced pluripotent stem cell (iPSC) line from a 40-year-old patient with the A8344G mutation of mitochondrial DNA and MERRF (myoclonic epilepsy with ragged red fibers) syndrome. **Stem cell research**, Kidlington, v. 27, n. 10-14, p. 1-5, 2018.

YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTIR, G. A.; RUOTTI, V.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. **Science**, New York, v. 318, n. 5858, p. 1917-1920, 2007.

- YUAN, F.; WANG, S.; WANG, Y.; WANG, A.; WANG, C.; LUO, X.; XU, Q.; YIN, R.; CHENG, H.; WANG, C.; GUO, M.; ZHANG, Y.; XI, J.; YANG, J.; SUN, X.; YAN, J.; ZENG, F.; CHEN, Y. Generation and characterization of the induced pluripotent stem cell line SHCDNi004-A from a ten-year-old Chinese boy with X-linked mental retardation in IL1RAPL1 deficiency. **Stem Cell Research**, Kidlington, v. 53, p. 102292, 2021.
- ZAHERES, H.; LENSCH, M. W.; DAHERON, L.; STEWART, S. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; DALEY, G. Q. High efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. **Stem Cells**, Dayton, v. 23, n. 3, p. 299-305, 2005.
- ZEINEDDINE, D.; HAMMOUD, A. A.; MORTADA, M.; BOEUF, H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. **American journal of stem cells**, Madison, v. 3, n. 2, p. 74, 2014.
- ZENG, Y.; WANG, G.; YANG, E.; JI, G.; BRINKMEYER-LANGFORD, C. L.; CAI, J. J. Aberrant gene expression in humans. **PLoS genetics**, San Francisco, v. 11, n. 1, p. e1004942–e1004961, 2015.
- ZHANG, K. D.; COATE T. M. Recent advances in the development and function of type II spiral ganglion neurons in the mammalian inner ear. **Seminars in cell & developmental biology**, London, v. 65, p. 80-87, 2017.
- ZHANG, W. Y.; DE ALMEIDA, P. E.; WU, J. C. Teratoma formation: A tool for monitoring pluripotency in stem cell research. In: **StemBook [Internet]**, Cambridge, Harvard Stem Cell Institute, 2012.
- ZHANG, X. B. Cellular reprogramming of human peripheral blood cells. **Genomics Proteomics Bioinformatics**, Beijing, v. 11, n. 5, p. 264-274, 2013.
- ZHAO, J.; AKINSANMI, I.; ARAFAT, D.; CRADICK, T. J.; LEE, C. M.; BANSKOTA, S.; MARIGORTA, U. M.; BAO, G.; GIBSON, G. A burden of rare variants associated with extremes of gene expression in human peripheral blood. **American journal of human genetics**, Baltimore, v. 98, n. 2, p. 299–309, 2016.
- ZHOU, W.; FREED, C. R. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. **Stem cells**, Dayton, v. 7, n. 11, p. 2667-2674, 2009.
- ZURITA-DÍAZ, F.; ORTUÑO-COSTELA, M. D. C.; MORENO-IZQUIERDO, A.; GALBIS, L.; MILLÁN, J. M.; AYUSO, C.; GARESSE, R.; GALLARDO, M. E. Establishment of a human iPSC line, IISHDOi004-A, from a patient with Usher syndrome associated with the mutation c.2276G>T; p.Cys759Phe in the USH2A gene. **Stem cell research**, Kidlington, v. 31, p. 152-156, 2018.

9. ANEXOS

9.1 TERMO DE APROVAÇÃO CAPPesq

M.16-nº. 28/2018

São Paulo, 23 de março de 2018.

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. **ALFREDO JOSÉ MANSUR**
DD. Presidente da Comissão de Análise de Projetos
de Pesquisa - CAPPesq do Hospital das Clínicas da FMUSP

Prezado Professor,

Tem esta por fim solicitar da Comissão de Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a permissão para que a Dra. Karina.lezirovitz Mandelbaum – Clínica Otorrinolaringológica possa realizar a pesquisa: "Utilização de células iPS para elucidação da fisiopatologia de perda auditiva sensorineural pós-lingual de etiologia genética".

As informações necessárias sobre este projeto encontram-se em anexo.

Aguardando seu parecer, desde já colocamo-nos a sua inteira disposição.

Atenciosamente,

Prof. Dr. **RICARDO FERREIRA BENTO**
Professor Titular da Disciplina de
Clínica Otorrinolaringológica da FMUSP

APROVADO "AD REFERENDUM" PELO CHEFE DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA EM 23 DE MARÇO DE 2018

P/ Prof. Dr. **REMO SUSANNA JUNIOR**
Chefe do Departamento de
Oftalmologia e Otorrinolaringologia
Faculdade de Medicina da

9.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Pacientes Maiores de Idade)

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa: Estabelecimento de linhagem de células-tronco de pluripotência induzida (iPSC) de pacientes com perda auditiva hereditária.

Pesquisador principal: Karina Lezirovitz Mandelbaum

Departamento/Instituto: Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia, Disciplina de Otorrinolaringologia, Laboratório de Investigação Médica (LIM) 32.

Convidamos o(a) senhor(a) para participar de forma voluntária de nossa pesquisa científica, cujo objetivo é produzir uma linhagem celular para entendermos quais os fatores genéticos que estão levando a perda auditiva em você ou membros de sua família e como isto está acontecendo.

A perda auditiva é o problema sensorial mais comum em humanos que pode limitar as habilidades de comunicação, desenvolvimento social, intelectual e econômico. Entre as diversas causas, a origem genética representa até 60% dos casos.

Queremos olhar o seu material genético para ver se encontramos em você uma alteração no DNA que contém uma cópia a mais de três genes que podem ser os responsáveis por causar a dificuldade em ouvir em você. O material genético também chamado de DNA é a molécula responsável por todas as suas características como cor do cabelo, cor do olho, tamanho do nariz, cor da pele e todas as outras coisas que fazem de você uma pessoa única e parecida com seus pais, avós, tios e demais parentes.

Para entendermos os fatores genéticos que estão levando a essa perda auditiva, pretendemos coletar um pouco do seu sangue para que possamos extrair o seu DNA/RNA e realizar os testes moleculares. Com esse mesmo material pretendemos fazer células iguaizinhas as suas no laboratório, com as mesmas características e formas, para assim imitar o que acontece nas células da sua orelha a fim de entender o que está prejudicando a sua audição. Essas células são chamadas de células tronco de pluripotência induzida, nome comprido né, mas não se assuste, isso apenas quer dizer que essas células podem virar qualquer tipo de célula do nosso corpo, e é por isso que seremos capazes de fazer uma célula com todas características presentes em você. É possível que não encontremos a mesma alteração genética do seu familiar em você, o que pode significar que a sua perda auditiva foi causada por algum outro gene.

Esse estudo é muito importante para podermos entender o que está acontecendo com as células da sua orelha, assim no futuro, graças a sua ajuda poderemos verificar se outras pessoas da sua família (e até mesmo seus filhos, no futuro) e do mundo todo que também possuem dificuldades para ouvir poderão nascer com as mesmas características que você. Além disso, o conhecimento que iremos adquirir estudando suas células pode servir para tentarmos no futuro desenvolver algum tipo de tratamento para perda auditiva. A identificação da causa da perda auditiva irá possibilitar a

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável
Rubrica do pesquisador

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Pacientes Maiores de Idade)

conclusão do seu diagnóstico e do seu familiar, além de possibilitar calcular o risco de a perda auditiva acontecer de novo em outra pessoa da família. Esses exames não vão curar a perda auditiva, mas podem ajudar a escolher um tratamento mais adequado, como por exemplo, na escolha do aparelho auditivo.

Para os experimentos será necessário realizar coleta de amostras de sangue.

Para obtenção do sangue, um profissional capacitado irá realizar uma punção em uma das veias do seu antebraço com auxílio de uma agulha esteril. Você vai sentir um leve ardor e após a retirada da agulha será orientado a fazer pressão no local com algodão. Pode ocorrer dor no momento da punção, extravasamento de sangue com mancha na pele, sangramento local em caso de compressão inadequada após punção. Estes sintomas são leves e transitórios, podendo ser corrigidos no próprio ambiente hospitalar.

O único risco que você será submetido é a coleta de sangue para que possamos cultivar as suas células e realizar os testes moleculares. Os exames de sangue oferecem risco baixo, pois serão realizados através de punção venosa (picada de agulha) para coleta de sangue.

Você poderá acompanhar os estudos e o desenvolvimento das pesquisas entrando em contato quando quiser para saber os resultados. A equipe também fará a assistência entrando em contato por telefone, email ou ainda marcando retornos ao paciente para que as informações atualizadas sejam passadas e explicadas, sempre que necessário.

Você pode desistir ou interromper o seu consentimento neste estudo a qualquer momento, sem necessidade de qualquer explicação; sua desistência não irá trazer nenhum prejuízo à sua saúde ou bem-estar físico. Não irá interferir no atendimento ou tratamento médico. Garantimos a você que uma via deste termo de consentimento ficará em sua posse, com sua rubrica e a do pesquisador responsável.

Caso tenham sido tiradas fotografias

- () concordo que sejam incluídas em publicações científicas, se necessário
- () concordo que sejam apresentadas em aulas para profissionais da saúde
- () não concordo que sejam incluídas em nenhum tipo de publicação ou apresentação.

Os resultados obtidos serão mantidos em segredo, mas poderão ser divulgados em revistas ou encontros científicos, os seus dados pessoais não serão divulgados.

O (A) senhor (a) não vai ter despesas para participar do estudo. Também não vai ter nenhum apoio financeiro para participar. Qualquer despesa adicional será realizada com o orçamento da pesquisa. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Todavia, caso você sofra algum dano decorrente da pesquisa, tem o direito a indenização.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável
Rubrica do pesquisador

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (Pacientes Maiores de Idade)

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO
PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

1. NOME DO PARTICIPANTE:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável

Rubrica do pesquisador

9.3 TERMO DE APROVAÇÃO CIBio

Comissão Interna de Biossegurança em Organismos Geneticamente
Modificados – CIBio em OGM's

TERMO DE APROVAÇÃO

São Paulo, 27 de março de 2018.

CQB HCFMUSP: 0217/06

A Comissão Interna de Biossegurança da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU** *ad-referendum*, em 27 de março de 2018 o Protocolo de Pesquisa nº CIBIO-002/2018 para o Nível de Biossegurança **NB1** intitulado: ***“Utilização de células iPS para elucidação da fisiopatologia de perda auditiva sensorineural pós-lingual de etiologia genética”***, apresentado pelo(a) pesquisador(a) **Dra. Gleiciele Alice Vieira Silva**, LIM-32 – Laboratório de Investigação Médica Otorrinolagologia – HCFMUSP.

PROF. DR. LUIZ FERNANDO ONUCHIC
Presidente
CiBio em OGMs do HC-FMUSP